

医研第336号


(別紙様式第3号)

論文要旨

論文題目

Anti-adult T-cell leukemia effects of a novel synthetic retinoid, Am80 (Tamibarotene)

[新規合成レチノイド Am80 (タミバロテン) の抗成人 T 細胞白血病効果]

氏名 中野 昭郎 

論 文 要 旨

【背景と目的】成人 T 細胞白血病 (ATL) は、HTLV-I 感染によって引き起こされる既存の化学療法に抵抗性の T 細胞腫瘍である。レチノイドである *all-trans* レチノイン酸 (ATRA) の ATL に対する有効性が報告されているが、効果は十分ではない。新規合成レチノイドである Am80 (Tamibarotene) は、急性白血病において ATRA 耐性を克服する有効な薬剤である。本研究では、Am80 の抗 ATL 効果とその分子学的機序を明らかにした。

【方法】細胞は HTLV-I 感染 Tax 陽性 T 細胞株 (MT-2、MT-4、C5/MJ、SLB-1、HUT-102)、ATL 患者由来 Tax 陰性 T 細胞株 [MT-1、ED-40515(-)]、急性骨髄性白血病細胞株 (HL-60)、ATL 患者および健常人の末梢血単核球、HTLV-I 非感染 T 細胞株 (Jurkat) を用いた。細胞生存率の検討に WST-8 法を用いた。アポトーシスの検出にはアネキシン V 染色を、細胞周期の評価には PI 染色を行い、フローサ

イトメトリーで解析した。カスパーゼ活性は基質の切断によって生じる発色の測定とウェスタンブロット法によるカスパーゼ3およびPARPの切断で解析した。細胞周期およびアポトーシス関連タンパク質の発現をウェスタンブロット法で、mRNA発現をRT-PCR法で解析した。レチノイン酸受容体のmRNA発現もRT-PCR法で解析した。転写因子活性の評価にゲルシフトアッセイとレポーターアッセイを用いた。SCIDマウスの皮下にHUT-102細胞を移植し、Am80の抗ATL効果を*in vivo*で評価した。移植した腫瘍細胞のアポトーシスの検出にはTUNEL法を用いた。

【成績】Am80は用量依存性にHTLV-I感染細胞株およびATL細胞の生存率を抑制した。その効果はレチノイン酸受容体の発現とは相関しなかった。一方、健常人末梢血単核球に対する作用は軽微であった。Am80はHTLV-I感染細胞株にG1期での細胞周期停止とカスパーゼ3、8、9活性化によるアポトーシスを誘




導した。細胞周期停止は細胞周期関連タンパク質の cyclin D2、Cdk6 の発現低下、アポトーシス誘導はアポトーシス阻害タンパク質の XIAP、c-IAP2、Bcl-x_L、c-FLIP の発現低下によるものと考えられた。また、これらの分子の発現低下は転写抑制によるものであった。Am80 は IκBα のリン酸化抑制と JunD タンパク質の発現抑制により、HTLV-I 感染細胞の NF-κB 活性および AP-1 活性を阻害した。さらに、Am80 は SCID マウスに移植された HUT-102 細胞の増殖を有意に抑制し、アポトーシスを誘導した。

【結論】Am80 は HTLV-I 感染細胞株において、NF-κB および AP-1 活性を阻害し、その制御下にある細胞周期促進およびアポトーシス阻害タンパク質の発現を抑制し、細胞周期停止とアポトーシスを誘導した。また、*in vivo* での有効性も認められた。以上の結果から、Am80 は ATL に対する治療薬として期待できる薬剤と考えられた。

平成20年12月25日

(別紙様式第7号)

論文審査結果の要旨

報告番号	課程博 * 第 号 論文博	氏名	中里 哲郎
論文審査委員	審査日	平成 20年 12月 25日	
	主査教授	藤田 次郎 	
	副査教授	山本 秀幸 	
	副査教授	高山 千利 	
(論文題目) Anti-adult T-cell leukemia effects of a novel synthetic retinoid, Am80 (Tamibarotene)			
(論文審査結果の要旨) 上記論文に関して、研究に至る背景と目的、研究内容、研究成果の意義、学術的水準等につき検討し、以下の審査結果を得た。			
1. 研究の背景と目的 成人T細胞白血病(ATL)は、ヒトT細胞白血病ウイルスI型(HTLV-I)感染によって引き起こされるT細胞性腫瘍である。既存の化学療法に抵抗性で、いまだ確立した治療法が存在せず、新たな治療薬の開発が急務である。レチノイドである all-trans レチノイン酸(ATRA)のATLに対する有効性が報告されているが、その効果は十分ではない。新規合成レチノイド Am80 は、再発・難治性の急性前骨髄球性白血病に対する治療薬として認可され、ATRA 耐性を克服する有効な薬剤である。本研究では、Am80 のATLに対する有効性を検討し、その分子機序を解析した。			
2. 研究内容：方法、結果および結論 (方法) 用いた細胞は Tax を発現している HTLV-I 感染 T 細胞株である MT-2、MT-4、C5/MJ、SLB-1、HUT-102、ATL 患者由来で Tax を発現していない細胞株である MT-1、ED-40515(-)、ならびに急性骨髄性白血病細胞株の HL-60、ATL 患者および健常人の末梢血単核球、HTLV-I 非感染 T 細胞株の Jurkat。Am80 の細胞増殖抑制効果を WST-8 法で検討した。レチノイン酸受容体の mRNA の発現解析に RT-PCR 法を用いた。Am80 によるアポトーシス誘導はアネキシン V 染色を行い、フローサイトメトリーで解析した。また、カスパーゼ活性は基質の切断によって生じる発色の測定とウェスタンブロット法による切断されたカスパーゼ3およびPARPの確認で解析した。Am80 の細胞周期に与える影響は PI 染色後に、フローサイトメトリーで解析した。細胞周期およびアポトーシス関連タンパク質の発現をウェスタンブロット法で、また、mRNA 発現を RT-PCR 法で解析した。Am80 の転写因子に対する効果は、ゲルシフトアッセイとレポーターアッセイで評価した。また、Am80 の <i>in vivo</i> での有効性は、SCID マウスの皮下に HUT-102 細胞を移植後、Am80 を投与して評価した。移植した腫瘍細胞のアポトーシスの検出には TUNEL 法を用いた。			

- 備考 1 用紙の規格は、A4とし縦にして左横書きとすること。
2 要旨は800字～1200字以内にまとめること。
3 *印は記入しないこと。

(結果)

- 1) Am80はHTLV-I感染細胞株およびATL細胞の増殖を抑制した。
- 2) その効果はレチノイン酸受容体の発現と関連しなかった。
- 3) 健常人末梢血単核球に対する作用は軽微であった。
- 4) Am80はHTLV-I感染細胞株にG1期での細胞周期停止とカスパーゼ活性化によるアポトーシスを誘導した。
- 5) 細胞周期停止は細胞周期関連タンパク質 (cyclin D2, Cdk6) の発現低下、アポトーシス誘導はアポトーシス阻害タンパク質 (XIAP, c-IAP2, Bcl-x_L, c-FLIP) の発現低下によるものと考えられた。
- 6) これらの分子の発現低下は転写抑制によるものであった。
- 7) Am80はI κ B α のリン酸化抑制とJunDの発現抑制により、HTLV-I感染T細胞のNF- κ B活性およびAP-1活性を阻害した。
- 8) Am80はSCIDマウスに移植されたHTLV-I感染T細胞の増殖を抑制し、アポトーシスを誘導した。

(結論)

Am80は、*in vitro*および*in vivo*で抗ATL効果を有しており、ATLに対する治療薬として期待できる薬剤と考えられる。

3. 研究成果の意義と学術水準

本研究は新規合成レチノイドであるAm80の抗ATL効果を*in vitro*および*in vivo*で示し、その分子機序も明らかにした。ATLは標準治療が確立していない難治性疾患であり、Am80の新規治療薬としての可能性を示唆する本研究は、学術的価値があり、国際的に評価されるものであると判断する。

以上により、本論文は学位授与に十分に値するものであると判断した。

- 備考
- 1 用紙の規格は、A4とし縦にして左横書きとすること。
 - 2 要旨は800字~1200字以内にまとめること。
 - 3 *印は記入しないこと。