

(別紙様式第3号)

論 文 要 旨

論 文 題 目

NIK-333, an acyclic retinoid, inhibits constitutive active NF- κ B, leading to apoptosis and suppression of cell growth of human T- cell leukemia virus type I-infected T- cell lines and primary adult T- cell leukemia cells

(非環式レチノイド NIK-333 は、恒常的 NF- κ B の活性を阻害し、ヒト T 細胞白血病ウイルス I 型感染 T 細胞株および成人 T 細胞白血病細胞に、アポトーシスの誘導と細胞増殖抑制をもたらす)

氏名 奥平多恵子



論 文 要 旨

【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) 感染により惹起される予後不良の 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) は新規治療薬として期待されたが、副作用の問題も含め十分な効果をあげていない。NIK-333 は長期連用にも耐えられる副作用の少ない合成非環式レチノイドであり、切除後肝細胞癌の再発を抑制することが報告され、現在臨床試験が開始されている。本研究では、NIK-333 の抗 ATL 効果を検討し、その分子機序を明らかにした。

【方法】細胞は ATL 症例や健常人の末梢血単核球 (PBMC)、HTLV-I 感染 Tax 陽性 T 細胞株 (MT-2、MT-4、C5/MJ、SLB-1、HUT-102)、ATL 由来 Tax 陰性 T 細胞株 [MT-1、TL-0mI、ED-40515(-)]、非感染 T 細胞株 (Jurkat) を用いた。細胞増殖能の測定は 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、細胞周期解析には PI 染色を用いてフローサイトメトリーで解析した。発現蛋

白の変化はウェスタンブロット法で解析した。HTLV-I トランスフォーミング蛋白 Tax による NF- κ B 転写活性と NIK-333 の作用は、Jurkat 細胞に Tax 発現プラスミドと NF- κ B によって制御されるルシフェラーゼ発現プラスミドを導入し、NIK-333 を添加培養後にレポーターアッセイを行い解析した。転写因子の DNA 結合は EMSA で解析した。SCID マウスの皮下に HUT-102 細胞を移植し、対照群と NIK-333 経口投与群の腫瘍重量ならびに容積を比較することで抗腫瘍効果を検討した。

【成績】 NIK-333 は濃度依存性に PHA 刺激 PBMC、HTLV-I 感染細胞株、ATL 細胞の生存率を低下させたが、ATRA と比較して健常人未刺激 PBMC への影響は軽度であった。NIK-333 は、HTLV-I 感染細胞株の細胞周期を G1 期で停止させ、アポトーシスを誘導した。レポーターアッセイにて、NIK-333 による Tax 依存性 NF- κ B 転写活性の抑制が明らかになった。感染細胞株において Tax 発現に関わらず、NIK-333 は NF- κ B の DNA 結合を抑制し

た。NF- κ B の阻害蛋白 I κ B α のリン酸化を阻害し、I κ B α を蓄積させ NF- κ B 制御下にある細胞周期関連蛋白 cyclin D1、D2 およびアポトーシス阻害蛋白 c-IAP2、XIAP の発現を NIK-333 は抑制した。なお、Tax の発現や AP-1 活性には影響を及ぼさなかった。SCID マウスの皮下に移植された HUT-102 細胞の増殖は NIK-333 投与群では対照群に比較し、有意に抑制された。

【結論】 NIK-333 は HTLV-I 感染細胞株において、I κ B α のリン酸化阻害により、NF- κ B の活性を抑制し、細胞周期関連蛋白およびアポトーシス阻害蛋白の発現を低下させた。その結果、細胞周期の G1 期停止とアポトーシスの誘導が起こり、腫瘍細胞の増殖が抑制されることが明らかになった。NIK-333 は ATRA に比べて、正常細胞に対する毒性が低く、in vivo においても十分な抗腫瘍効果が得られたことから、ATL に対する新規治療薬としての臨床応用が期待されると考えられた。

(別紙様式第7号)

論文審査結果の要旨

(1)

報告番号	* 課程博 論文博	第 号	氏名	奥平 多恵子
		審査日	平成 18 年 2 月 28 日	
論文審査委員	主査教授		太田 孝男	(印)
	副査教授		荻谷 研一	(印)
	副査教授		渡部 久実	(印)
(論文題目)				
NIK-333, an acyclic retinoid, inhibits constitutive active NF- κ B, leading to apoptosis and suppression of cell growth of human T- cell leukemia virus type I-infected T- cell line and primary adult T- cell leukemia cells				
(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)感染を原因とする予後不良のT細胞性腫瘍である。ATLは難治性であり、いまだ確立された治療法が存在せず、その対策は急務である。また、キャリアの発症予防、慢性型およびくすぶり型からの急性転化予防も重要な抗ATL対策である。新規治療法として、レチノイドであるall-transレチノイン酸(ATRA)のATLへの有効性を示す報告があるが、奏効率や副作用の問題もあり、汎用されてはいない。新規合成レチノイドであるNIK-333は、C型肝炎ウイルスを背景とした初発肝細胞癌切除後の残存肝において、有意に再発率を低下させ、明らかな副作用を認めないという特徴を有している。本研究では、NIK-333のATLに対する抗腫瘍効果を検討し、その分子機構を解析した。				
2. 研究内容：方法、結果および結論				
(方法)				
細胞はHTLV-I感染T細胞株であり、HTLV-IトランスフォーミングタンパクTax発現を認めるMT-2、MT-4、C5/MJ、SLB-1、HUT-102、ならびにATL由来Tax陰性T細胞株であるMT-1、TL-0mI、ED-40515(-)、およびHTLV-I非感染T細胞株であるJurkatを用いた。また、ATL症例や健常人末梢血単核球についても解析した。NIK-333の細胞増殖抑制効果をWST-8法で解析した。レチノイド				

備考 1 用紙の規格は,A4とし縦にして左横書とすること。

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。

レセプターmRNAの発現解析にはRT-PCRを用いた。細胞周期解析はPI染色後、DNA量をフローサイトメトリーで測定した。アポトーシスはアネキシンV染色を用いてフローサイトメトリーで解析した。NIK-333によるNF- κ B転写活性能抑制の解析にreporter assayを行った。NIK-333添加後のタンパク発現の変化はWestern blottingで解析した。NIK-333による転写因子のDNA結合能抑制の検討はゲルシフトアッセイで行なった。また、in vivoでの有効性は、SCIDマウスの皮下にHUT-102を移植後、NIK-333を100 mg/kg、隔日経口投与し、対照群と腫瘍重量および容量を比較することで検討した。

(結果)

- 1) NIK-333は、濃度依存性にHTLV-I感染T細胞株の増殖を抑制し、ATL細胞の生存率を低下させた。
- 2) NIK-333は、ATRAと比較し、HTLV-I感染T細胞株やATL細胞に対し高い選択的毒性を有していた。
- 3) レチノイドレセプターの発現とNIK-333の感受性に関連は認められなかった。
- 4) NIK-333処理により、HTLV-I感染T細胞株において細胞周期のG1期停止およびアポトーシス誘導が認められた。静止期リンパ球には作用せず、活性化リンパ球には細胞周期のG1期停止を誘導した。
- 5) NIK-333は、Taxの発現は変化させず、I κ B α のリン酸化を抑制することで、NF- κ B活性を阻害したが、AP-1活性には明らかな影響を及ぼさなかった。
- 6) NIK-333は、NF- κ B制御下の細胞周期関連タンパク (cyclin D1、cyclin D2) やアポトーシス阻害タンパク (c-IAP2、XIAP) の発現を抑制した。
- 7) SCIDマウスの皮下に移植したHUT-102細胞の増殖をNIK-333は有意に抑制した。

(結論)

NIK-333は、ATRAと同等の抗ATL効果を有し、その選択的毒性の高さから、新規ATL治療薬や発症予防薬としての効果が期待できる。

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NIK-333のATLに対する抗腫瘍効果をin vitroおよびin vivoにて示し、その作用機序も明らかにした。Agressive ATLの治療と同様、indolent ATLの急性転化予防およびキャリアの発症予防も重要であり、NIK-333の新規治療薬および発症予防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、国際的にも評価されるものであると判断される。

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。