

学 位 論 文 要 旨

氏名 池邊 詠美

論 文 題 目

..... Oral administration of an HSP90 inhibitor, 17-DMAG, intervenes tumor-cell infiltration
..... into multiple organs and improves survival period for ATL model mice.
..... (HSP90 阻害剤(17-DMAG)は ATL 細胞の Tax 分解とアポトーシスを誘導し、
..... ATL モデルマウスにおけるプロウイルス産生・多臓器浸潤を阻止する)

要 旨

【緒言】熱ショックタンパク質の一つである HSP90 は、翻訳直後の蛋白質(クライアント蛋白質)と複合体を形成し、立体構造の安定化と機能発現を保証する役割を担う分子シャペロンである。HSP90 のクライアント蛋白質には、蛋白質リン酸化酵素やステロイドホルモン受容体などの細胞増殖や分化に重要な役割を果たすシグナル伝達分子が多く含まれるため、HSP90 の癌細胞増殖への関与が近年注目されている。17-DMAG は、HSP90 の ATP 結合領域に干渉し HSP90 の分子シャペロン機能を阻害するゲルダナマイシンの誘導體で、水溶性化および代謝効率化により毒性が軽減された経口投与可能な第 3 世代化合物である。17-DMAG 投与による HSP90 クライアント蛋白質の機能阻害活性を利用し、再発性の乳癌や卵巣癌患者への治療効果を検証する臨床試験が行われ、単剤および抗体治療薬との併用効果などが報告されている。ATL (成人 T 細胞白血病・リンパ腫) は、レトロウイルスである HTLV-1 (ヒト T 細胞白血病ウイルス) の感染が原因の難治性血液腫瘍であり、HTLV-1 感染者や ATL 患者の末梢血リンパ球 (PBL) では、細胞のアポトーシス抵抗性などを司る転写因子 NF- κ B が恒常的に活性化されている。これは、HTLV-1 から産生されるガン遺伝子産物 Tax が、NF- κ B の活性を負に制御す

る I- κ B α を無力化するリン酸化酵素 IKK に結合し IKK を恒常的に活性化するからである。HSP90 による IKK の安定化は以前から知られており、Tax-IKK 複合体を 17-DMAG で不安定化すれば ATL 細胞の増殖を抑制できる事が期待される。そこで、株化した ATL 細胞を中心に、様々な白血病細胞の 17-DMAG への感受性の検討とモデルマウスを用いた抗 ATL 効果の検討を行った。

【研究対象及び方法】 ATL 及び非 ATL 血液腫瘍細胞株 1, 2 例、ATL 患者由来 PBL 4 例を用い、17-DMAG 投与後のアポトーシス誘導、増殖阻止効果について健常人 PBL 3 例と比較した。また、2 系統の ATL モデルマウス (Tax-Tg、hNOG/JEX) を用い、17-DMAG 経口投与によるウイルス感染細胞の増殖抑制効果、マウスの延命効果を検証した。

【結果】 Tax 発現性の ATL 細胞に 17-DMAG を投与すると、IKK のみならず Tax の濃度依存的な分解の誘導が観察された。HEK293 細胞への Tax 遺伝子導入による癌化シグナルの増幅 (NF- κ B、HTLV-1-LTR、及び AP-1 の転写活性化) においても、Tax 分解による転写阻害効果が確認された。17-DMAG はさらに、健常人 PBL では影響が観察されない濃度域で ATL 細胞にのみアポトーシスを誘導し、また MDM-2 を阻害し p53 の抗腫瘍効果を増強する Nutlin-3a との併用では、単剤の 1/10 用量でアポトーシス誘導効果を示した。2 系統の ATL モデルマウス (Tax-Tg、hNOG/JEX) に対する 17-DMAG 経口投与試験では、用量依存的に Tax 腫瘍細胞の多臓器浸潤が抑制され (Tax-Tg マウス)、HTLV-1 感染リンパ球の増殖抑制と半数の個体に明確な延命効果 (hNOG/JEX マウス) が観察された。

【考察】 17-DMAG はその作用機序から広範な細胞に影響を与えられ考えられるが、今回特に ATL 細胞に対する選択的増殖抑制効果が観察された。Nutlin-3a の併用により 1/10 量で単剤投与時と同等のアポトーシス誘導効果が得られたことから、17-DMAG の抗 ATL 薬剤としての可能性が示された。

【結語】 国内の標準的抗 ATL 化学療法である mLSG15 は、入院治療が必要な侵襲度の高い治療法であるにもかかわらず 3 年生存率は僅かに 22% である。同種造血幹細胞移植療法では 3 年生存率は 40% に達するが、移植拒絶反応などの重篤な副作用は解決されておらず、近年使用が認可された抗 CCR4 抗体でも同様の副作用の問題がある。今回前臨床モデルにおいて低用量の 17-DMAG・Nutlin-3a 併用による抗 ATL 効果が確認されたので、HSP90 阻害剤の新規 ATL 治療薬としての応用の可能性が示された。

学位論文審査の結果の要旨

審査区分 課・論	第336号	氏名	池邊詠美
審査委員会委員	主査氏名	門田淳一	Ⓜ
	副査氏名	中川幹子	Ⓚ
	副査氏名	石崎 眞理	Ⓢ
論文題目 Oral administration of an HSP90 inhibitor, 17-DMAG, intervenes tumor-cell infiltration into multiple organs and improves survival period for ATL model mice. (HSP90 阻害剤(17-DMAG)は ATL 細胞の Tax 分解とアポトーシスを誘導し、ATL モデルマウスにおけるプロウイルス産生・多臓器浸潤を阻止する)			
論文掲載雑誌名 Blood Cancer Journal			
論文要旨 Human T-lymphotropic virus type-1 (HTLV-1)は成人 T 細胞白血病(ATL)の原因ウイルスである。HTLV-1 から産生されるガン遺伝子産物 Tax は NF- κ B 活性化 I κ B キナーゼ(IKK)に結合して恒常的に IKK を活性化し、I κ B 活性を抑制することで転写因子 NF- κ B の核内移行(活性化)を促進させ、ウイルス感染細胞のアポトーシスを抑制するなどの役割を果たしている。一方、熱ショック蛋白質である HSP90 は IKK を安定化させる分子シャペロンであり、癌細胞増殖への関与が近年注目されている。そこで本研究では、HSP90 の阻害剤である 17-DMAG を用い、Tax-IKK 複合体を不安定化させることで ATL 細胞の Tax 依存性細胞内シグナルを阻害し、 <i>in vitro</i> 、 <i>ex vivo</i> における腫瘍細胞増殖抑制効果および ATL マウスモデルにおける延命効果を検討した。 ATL および種々の非 ATL 白血病細胞株、ATL 患者由来末梢血リンパ球(PBL)を用いて、2.5 μ M 濃度の 17-DMAG と培養後、アポトーシス誘導(caspase 3/7 assay)と細胞の増殖抑制効果(cell viability assay)について健常人由来 PBL と比較検討した。また、Tax トランスジェニック SCID マウス(Tax-Tg)と HTLV-1 感染細胞移入 huNOG マウスの 2 系統の ATL マウスモデルを作成し、17-DMAG 経口投与によるウイルス感染細胞の増殖抑制効果およびマウスの延命効果について組織学的、flowcytometry による検討を行った。 17-DMAG は健常人 PBL に影響を与えない濃度域で、Tax 発現性 ATL 細胞内の Tax-IKK-HSP90/CDC37 複合体の形成を阻害して Tax を分解し、ATL 細胞のアポトーシスや増殖抑制を促進した。また、17-DMAG は Tax を分解することで、Tax 遺伝子導入 HEK293 細胞内における NF- κ B などの転写因子活性を阻害した。2 系統の ATL マウスモデルに対する 17-DMAG の経口投与は、用量依存的にウイルス感染腫瘍細胞の増殖を抑制し、生存期間も非投与群の平均 8.33 週に比して投与群 14.75 週と延命効果が認められた。さらに他の抗腫瘍薬である Nutlin-3a と 17-DMAG を併用することで、17-DMAG は 1/10 の濃度でアポトーシス誘導効果を示した。 この結果から、17-DMAG は ATL 細胞内シグナルに重要である Tax を分解し転写因子活性を阻害することで抗腫瘍効果を示していると考えられる。 本研究は、未だ効果的な治療法が確立していない ATL に対する治療薬として、HSP90 阻害剤が新規機序を介した治療薬候補となり得ることを明らかにした重要な研究であると考えられ、審査員の合議により本論文は学位論文に値するものと判定した。			

~~最終試験~~

の結果の要旨

学力の確認

審査区分 課・ 	第336号	氏名	池邊詠美
審査委員会委員	主査氏名	明田淳一	
	副査氏名	中川幹子	
	副査氏名	石川一和理	
<p>学位申請者は本論文の公开发表を行い、各審査委員から研究の目的、方法、結果、考察について以下の質問を受けた。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Geldanamycin (GA)はマクロライド系抗菌薬か。 2. HSP90のco-chaperon (STIP1, PP5, AHA1, p23, TAH1, PIH1, SGT1, FKBP52, FKBP52など)を複数存在することが知られているが、Cdc37に着目した根拠はどのような理由なのか。また、HMW-IKK complexには他のco-chaperonは存在しないのか。 3. 本研究において、17-DMAGの安全性、特に肝毒性についての検討は行ったか。 4. <i>in vitro</i>での17-DMAGの濃度は<i>in vivo</i>の血清中や肺などの局所の濃度と同程度と考えるとよいのか。 5. 17-DMAGは抗腫瘍薬としての性質を持っているが、どのような性質の癌細胞の増殖を阻害するのか。 6. HSP90-CDC37複合体はprotein kinaseに対して機能を発揮し、signal transductionやtumorigenesisに関与することが知られているが、HSP90阻害によりTAXの不安定化を誘導するとともに、内在性のprotein kinaseの阻害が生じていると考えられるが、HTLV-1感染細胞ではどのようなkinaseの安定化(活性化)に寄与しているのか。 7. 17-DMAG処理によりTaxは安定性を失いdegradationされるようであるが、これはTaxのfoldingが不完全のためdegradationされているのか、または複合体形成によって安定化されているTaxがHSP90阻害によりその後の反応が阻害されるため、TaxがHSP90上にとどまり、新しいTaxを結合できなくなり不安定になるのか。 8. CDC37はco-chaperonとしてkinaseの機能を調節するが、なぜTaxを調節するのか。Taxとkinaseで構造上の類似点があるのか。 9. 細胞によって17-DMAG処理後のTax degradationに差が生じるとの報告があるが、その分子機序はどのようなことが考えられるか。 10. 17-DMAGで効果がみられるATL細胞と効果が認められない細胞での相違点は何か。 11. Lck-Tax細胞の浸潤を抑制したと述べているのか。末梢血中も細胞は減少しているので、浸潤の抑制ではなく、細胞自体の減少ではないか。 12. 本研究には国内外に23名の共著者がいるが、彼らとの打ち合わせやdiscussionはどのように行い、申請者自身はどう関わったか。 <p>これらの質疑に対して、申請者は概ね適切に回答した。よって審査委員の合議の結果、申請者は学位取得有資格者と認定した。</p>			

(注) 不要の文字は2本線で抹消すること。