

医研第311号


(別紙様式第3号)

## 論 文 要 旨

### 論 文 題 目

Bisphosphonate incadronate inhibits growth of human T-cell leukaemia virus type I-infected T-cell lines and primary adult T-cell leukaemia cells by interfering with the mevalonate pathway

(ビスホスホネートであるインカドロネートはメバロン酸経路を阻害することでヒト T細胞白血病ウイルス I型感染 T細胞株及び成人 T細胞白血病細胞の増殖を抑制する)

氏名 石川 穂 

## 論 文 要 旨

【背景と目的】骨吸収抑制剤であるビスホスホネート製剤(BPs)は、骨粗鬆症や骨転移を伴う悪性腫瘍の高Ca血症の治療に使用されている。BPsは骨に集積し、破骨細胞に取り込まれアポトーシスを誘導する。最近では破骨細胞のみならず、乳癌、前立腺癌、骨髄腫細胞といった癌細胞にもアポトーシスを誘導することが報告されている。一方、成人T細胞白血病(ATL)はヒトT細胞白血病ウイルス1型(HTLV-1)の感染によって引き起こされるリンパ系腫瘍であり、未だ有効な治療法はない。ATLでは骨病変や高Ca血症を伴いやすく、従来よりBPsが使用されてきた。そこで、BPsのATLに対する直接の抗腫瘍効果の有無、及びその作用機序について解析した。

【方法】BPsは第3世代のincadronateを用いた。HTLV-1感染T細胞株として、MT-4、C5/MJ、SLB-1、HUT-102を、又非感染T細胞株としてJurkat、MOLT-4を用いた。ATL症例と健常人




の末梢血単核球も実験に使用した。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はミトコンドリア膜上の7A6抗原の染色を、細胞周期解析は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分解により生じる比色を測定した。Rap1Aのプレニル化やアポトーシス関連蛋白質の発現変化はウェスタンブロット法で解析した。SCIDマウスの皮下にHUT-102細胞を移植し、対照群とincadronate皮下注射群の腫瘍重量並びに容積を比較することで抗腫瘍効果を検討した。

【結果】incadronateはHTLV-1感染T細胞株の増殖やATL細胞の生存を抑制したが、非感染T細胞株及び、健常人の末梢血単核球には影響を及ぼさなかった。HTLV-1感染T細胞株において、incadronateはS期での細胞周期の停止及びカスパーゼ3、8、9の活性増強やサイピンの発現低下によるアポトーシスを誘導した。BPsはメバロン酸代謝経路によっ

て合成されるファルネシルピロリン酸 (FPP) の合成酵素を阻害することで、FPP 及びゲラニルゲラニルピロリン酸 (GGPP) を枯渇させるが、incadronate の増殖抑制効果は FPP や GGPP のアナログ添加により阻害された。Ras 関連蛋白質は、癌の発生、進展の原因となることが知られており、FPP や GGPP といったプレニル基の修飾により細胞内での機能局在が可能となり、活性を持つ。incadronate は HTLV-1 感染 T 細胞株及び ATL 細胞において Ras 関連蛋白質、Rap1A のプレニル化を阻害した。SCID マウスにおいては、incadronate 注射群は対照群と比較して腫瘍容積および重量が減少していた。

【結論】incadronate は HTLV-1 感染 T 細胞において Ras 関連蛋白質のプレニル化を阻害することで、細胞周期の S 期停止とアポトーシスを誘導する。このように、incadronate には ATL の新たな分子標的薬としての位置づけも期待できる。

## 論文審査結果の要旨

報告番号	課程博 * 第 号 論文博	氏名	石川 千恵
論文審査委員	審査日	平成 20年 2月 6日	
	主査教授	高須 信行 	
	副査教授	金右文剛 	
	副査教授	山本秀幸 	
(論文題目)			
Bisphosphonate incadronate inhibits growth of human T-cell leukaemia virus type I-infected T-cell lines and primary adult T-cell leukaemia cells by interfering with the mevalonate pathway			
(論文審査結果の要旨)			
上記論文に関して、研究にいたる背景と目的、研究内容、および研究成果の意義と学術的水準について慎重に検討し、以下のような審査結果を得た。			
1. 研究の背景と目的			
骨吸収抑制剤であるビスホスホネート製剤 (BPs) は、骨粗鬆症や骨転移を伴う悪性腫瘍の高 Ca 血症の治療に使用されている。BPs は骨に集積し、破骨細胞に取り込まれアポトーシスを誘導する。最近では破骨細胞のみならず、乳癌、前立腺癌、骨髄腫細胞といった癌細胞にもアポトーシスを誘導することが報告されている。一方、成人 T 細胞白血病 (ATL) はヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (HTLV-1) の感染によって引き起こされるリンパ系腫瘍であり、未だ有効な治療法はない。ATL では骨病変や高 Ca 血症を伴いやすく、従来より BPs が使用されてきた。そこで、BPs の ATL に対する直接の抗腫瘍効果の有無、及びその作用機序について解析した。			
2. 研究内容			
BPs は第 3 世代の incadronate を用いた。HTLV-1 感染 T 細胞株として、MT-4、C5/MJ、SLB-1、HUT-102 を、又非感染 T 細胞株として Jurkat、MOLT-4 を用いた。ATL 症例と健常人の末梢血単核球も実験に使用した。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はミトコンドリア膜上の 7A6 抗原の染色を、細胞周期解析は PI 染色を行い、フローサイトメトリ			

一で解析した。カスパーゼ活性は基質の分解により生じる比色を測定した。Rap1A のプレニル化やアポトーシス関連蛋白質の発現変化はウェスタンブロット法で解析した。SCID マウスの皮下に HUT-102 細胞を移植し、対照群と incadronate 皮下注射群の腫瘍重量並びに容積を比較することで抗腫瘍効果を検討した。結果を以下に示す。

incadronate は HTLV-1 感染 T 細胞株の増殖や ATL 細胞の生存を抑制したが、非感染 T 細胞株及び、健常人の末梢血単核球には影響を及ぼさなかった。HTLV-1 感染 T 細胞株において、incadronate は S 期での細胞周期の停止を誘導した。また、サバイビンの発現低下やカスパーゼ 3、8、9 の活性を増強し、アポトーシスを誘導した。BPs はメバロン酸代謝経路によって合成されるファルネシルピロリン酸 (FPP) の合成酵素を阻害することで、FPP 及びゲラニルゲラニルピロリン酸 (GGPP) を枯渇させることが知られているが、incadronate の増殖抑制効果は FPP や GGPP のアナログ添加により阻害されたことから、メバロン酸代謝経路の阻害がその作用機序として考えられた。Ras 関連蛋白質は、癌の発生、進展の原因となることが知られており、FPP や GGPP といったプレニル基の修飾により細胞内での機能局在が可能となり、活性を持つが、ATL の発癌における関与は不明である。incadronate は HTLV-1 感染 T 細胞株及び ATL 細胞において Ras 関連蛋白質、Rap1A のプレニル化を阻害した。さらに、SCID マウスにおいては、incadronate 注射群は対照群と比較して腫瘍容積および重量が減少していた。

以上、incadronate は HTLV-1 感染 T 細胞において Ras 関連蛋白質のプレニル化を阻害することで、細胞周期の S 期停止とアポトーシスを誘導する。このように、incadronate には直接の抗 ATL 効果があることが証明された

### 3. 研究成果の意義と学術的水準

本研究は、ATL における BPs 治療の可能性について、動物実験も含めた複数の実験結果をもとに詳細に検討した報告である。ATL 治療に関する研究は多々あるが、いまだ治療法の確立には至っていない。このような現状の中で本研究の成果は分子標的療法としての一角を担うものであると期待される。本研究は Ras 関連蛋白質の関与を含めた ATL の発癌機能の解明や治療法の開発という点で、重要な研究であり、かつ、第 4 回感染症沖縄フォーラムにて、優秀プレゼン賞を受賞している。よって、その研究成果は国際的にも認められた高水準のものであると評価された。

以上により、本論文は学位授与に十分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。