

論 文 内 容 の 要 旨

氏 名	山 口 晃 史
学位の種類	博 士 (医学)
学位記番号	医 第 8 6 6 号
学位授与の日付	平 成 17 年 9 月 15 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	Dichotomy of all- <i>trans</i> retinoic acid inducing signals for adult T-cell leukemia (成人T細胞白血病に対する全トランスレチノイン酸によって誘導されるシグナルの分枝する作用機序)
論文審査委員 (主 査)	教 授 金 丸 昭 久
(副主査)	教 授 義 江 修
(副主査)	教 授 福 岡 正 博

【目的】		
成人 T 細胞白血病 (ATL) は HTLV-1 ウイルス感染 T 細胞のクローナルな増殖に基づく極めて予後不良の疾患であり、未だ有効な治療法がない。これまでビタミン A 誘導体である全トランスレチノイン酸(ATRA)によって HTLV-1 感染 T 細胞株や ATL 患者由来白血病細胞に対し、細胞増殖抑制効果が認められることを報告してきたが、その作用機序の詳細は不明である。今回 ATRA に分枝する 2 つのシグナルを介する作用機序をみとめ、その詳細を説明することで、ATL に対する新たな治療戦略の確立を目指すことを研究目的とした。		
【材料と方法】		
使用する HTLV-1 感染細胞株として ATL-2, HUT102, MT-2, MT-4, ED40515 の五つを、試薬に etoposide (VP-16), azidothimidine (AZT), ATRA を用いた。方法としては五つの HTLV-1 感染細胞株の ATRA による増殖抑制効果を MTS Assay で測定した。次に HTLV-1 proviral DNA load, HTLV-1 genes mRNA load (pol. gag. tax) と sIL-2 mRNA load を real time PCR により、また逆転写酵素活性と sIL-2R を ELISA によりそれぞれ検討した。さらに NF-κB 転写活性を CAT assay で測定した。		
【結果】		
感染細胞株に対し ATRA により増殖抑制効果が認められた。次に ATRA の効果として proviral DNA load や HTLV-1 genes mRNA load の低下が観察できた。以上より ATRA によるウイルス (HTLV-1) 複製の抑制が示唆され、ウイルス複製の抑制機序について逆転写酵素阻害に着目したところ、ATRA は逆転写酵素活性を抑制する現象がみとめられた。興味深いことに、AZT は HTLV-1 proviral DNA や HTLV-1 genes mRNA を抑制するも NF-κB 転写活性は抑制しなかったことから、ATRA は逆転写酵素阻害の作用だけではなく NF-κB 阻害作用を有していることが判明した。さらに ATL の病勢の指標となる sIL-2R に関して検討したところ、ATRA 添加により抑制されたが AZT では抑制されなかったことから sIL-2R の抑制は NF-κB/sIL-2R 伝達経路が関与している可能性が示唆された。		
【結論】		
ATL に対する ATRA の増殖抑制効果は逆転写酵素阻害と NF-κB 転写活性抑制の分枝する二つのシグナルに基づいて作用することが明らかとなった。ATRA はすでに急性前骨髄性白血病に対する標準の治療薬として使用されており、内服可能という点と安全性の点でより有用であり、今後 ATRA が ATL の新たな治療戦略の一つとして組み入れられる上で論理的根拠が示された。		
博士論文の印刷公表	公 表 年 月 日	出版物の種類及び名称
	2005 年 6 月 日 公表予定	出版物名 Leukemia
	公 表 内 容	2005 年 6 月 日 掲載予定
	全 文	

論文審査結果の要旨

【目的】

成人T細胞白血病(ATL)はHTLV-1感染T細胞のクローナルな増殖に基づく本邦に特有な極めて予後不良の疾患であり、有効な治療法がない。当教室ではビタミンA誘導体である全トランスレチノイン酸(ATRA)によってHTLV-1感染T細胞株やATL患者由来白血病細胞に対し、細胞増殖抑制効果が認められることをこれまで報告してきたが、その作用機序の詳細は不明であった。今回ATRAに対する作用機序を解明することで、ATLに対する新たな治療戦略の確立を目的とした。

【方法】

HTLV-1感染T細胞株としてATL-2, HUT102, MT-2, MT-4, ED40515の五つ、HTLV-1未感染T細胞株としてJurkat, MOLT-4の二つを使用した。試薬に抗腫瘍剤としてetoposide(VP-16); 2 μ g/ml, 逆転写酵素阻害剤としてazidothymidine(AZT); 64 μ M, ATRA 10^{-6} Mを用いた。方法としてはHTLV-1感染T細胞株とHTLV-1未感染T細胞株に対しATRA, AZT, VP-16の試薬をそれぞれ投与し24, 48, 72時間と培養し増殖抑制効果をMTS Assayで測定した。次にウイルス複製抑制作用を検討するため、感染T細胞株にそれぞれ試薬投与し48, 72時間培養しHTLV-1 proviral DNA load, HTLV-1 genes mRNA load (pol, gag, tax)の発現をreal time PCRにより測定した。また同様に感染T細胞株の培養後、ウイルス分離のためPEG沈殿を行い、逆転写酵素活性をELISAで測定した。さらにHIV-1の組み替え逆転写酵素とATRA; 10^{-6} M, 10^{-7} MやAZT; 64 μ Mを各々を同時に加えて直接的な逆転写酵素阻害率を同様のキットにて測定した。次に感染T細胞株とPMAで刺激した未感染T細胞株にNF- κ B-CATベクターとcontrol-CATベクターをDEAEデキストラン法にて遺伝子導入し、さらにその後ATRAとAZT添加し48時間培養し、CATalyse AssayによってNF- κ B転写活性を測定した。最後に感染T細胞株にATRA, AZT添加し48時間培養した細胞を回収しsIL-2R mRNA loadとその細胞上清のsIL-2R蛋白をELISAにより検討した。

【結果】

HTLV-1感染T細胞株に対しATRA, AZT, VP-16添加により増殖抑制効果が認められたが、HTLV-1未感染T細胞株ではVP-16添加のみ増殖抑制効果が認められ、ATRAでは認められなかった。次にATRAの効果としてHTLV-1感染T細胞株においてproviral DNA loadやHTLV-1 genes mRNA loadの低下が認められ、逆転写酵素阻害剤であるAZTにおいても同様の結果であったが、抗腫瘍剤であるVP-16の添加では

proviral DNAの低下が認められなかった。以上よりAZTと同様にATRAにはウイルス(HTLV-1)複製の抑制作用の可能性が示唆され、ウイルス複製の抑制機序について逆転写酵素阻害に着目したところ、ATRAは逆転写酵素活性を抑制する現象が観察された。さらにATRAは逆転写酵素を直接的に20%前後、AZTでは40%前後抑制することが認められた。次にATRA添加によりNF- κ B転写活性を抑制し、AZT添加ではNF- κ B転写活性は抑制しないことが認められた。さらにPMA刺激にて強発現させた未感染T細胞株においてNF- κ B転写活性はATRA添加では抑制しなかった。最後に可溶性IL-2R (sIL-2R)については、mRNAレベルでも細胞上清上の蛋白レベルでもATRA添加により抑制されたがAZTでは抑制されなかった。

【考察】

当教室においてこれまで新鮮ATL細胞やHTLV-1感染T細胞株に対し、ATRAが増殖抑制効果があることを報告してきたが、作用機序は不明でありこの新しい治療薬として可能性のあるATRAの作用機序を解析した。HTLV-1感染T細胞株に対し、ATRA添加によりHTLV-1 proviral DNA loadとHTLV-1 mRNA loadの低下が認められたことからウイルス複製抑制作用を有する可能性が示唆された。さらにATRAのウイルス複製抑制作用の詳細について逆転写酵素阻害剤として直接的作用を有することを初めて明らかにし、元来ATLに恒常的に発現しているNF- κ Bへの効果についても、ATRA添加によりNF- κ B転写活性を抑制することが認められた。逆転写酵素阻害剤のAZTではNF- κ B転写活性を抑制しなかったことからATRAが逆転写酵素阻害作用とはまた別にHTLV-1特異的なNF- κ B転写活性を抑制することが明らかになった。さらにsIL-2Rに関してもNF- κ B転写活性の結果と同様にAZT添加では抑制されずATRA添加にて抑制されたことからATRAのsIL-2Rへの作用機序としてはNF- κ B/sIL-2R伝達経路が関与している可能性が示唆された。以上のことからATRAはAZTに比べより効果的なATL細胞増殖抑制作用が期待できる。

【結論】

ATLに対するATRAの増殖抑制効果は逆転写酵素阻害とNF- κ B転写活性抑制の分枝する二つのシグナルに基づいて作用することが初めて明らかになった。

ATRA はすでに急性前骨髄球性白血病に対する標準的治療薬として使用されており、内服可能という点と安全性の点でより有用であり、今後 ATRA が ATL の新たな治療戦略の一つとして組み入れられる上で合理的根拠をあたえるものであり、以上の点から本研究成果は医学博士の学位を授与するに値するものと判断される。

氏 名	上 田 晴 彦 <small>うえ た はる ひこ</small>
学位の種類	博 士 (医学)
学位記番号	医 第 8 6 8 号
学位授与の日付	平成 18 年 3 月 22 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	Microsatellite Status and Immunohistochemical Features of Ovarian Clear-cell Carcinoma (卵巣明細胞腺癌におけるマイクロサテライト領域の遺伝子不安定性と免疫組織学的特徴)
論文審査委員 (主 査)	教授 星 合 昊
(副主査)	教授 戸 村 隆 訓
(副主査)	教授 福 岡 正 博