

氏 名	武 内 美 紀
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	博 士 第 6 2 5 号
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
学 位 授 与 年 月 日	平 成 2 2 年 9 月 8 日
学 位 論 文 題 目	Glyoxalase-I is a novel target against Bcr-Abl+ leukemic cells acquiring stem-like characteristics in hypoxic environment (低酸素環境により幹細胞様形質を獲得した Bcr-Abl 陽性白血病細胞に 対する、Glyoxalase-I の新規治療標的としての有効性)
審 査 委 員	主 査 教 授 杉 原 洋 行 副 査 教 授 野 坂 修 一 副 査 教 授 三 浦 克 之

論文内容要旨

*整理番号	630	(ふりがな) 氏名	たけうち みき 武内 美紀
学位論文題目	<p>Glyoxalase-I is a novel target against Bcr-Abl⁺ leukemic cells acquiring stem-like characteristics in a hypoxic environment (低酸素環境により幹細胞様形質を獲得した Bcr-Abl 陽性白血病細胞に対する、Glyoxalase-I の新規治療標的としての有効性)</p>		
<p>【目的】慢性骨髄性白血病（Chronic myelogenous leukemia：CML）は、Bcr-Abl 融合蛋白の持つ異常なチロシンキナーゼ活性により過剰な細胞の自立増殖をもたらし、数年のうちに急性転化をきたす予後不良な疾患である。近年、Abl チロシンキナーゼ阻害剤（TKI）の臨床導入により CML 患者の予後は著しく改善したが、TKI のみでの白血病の根治は疑問視されている。なぜなら、白血病細胞を生み出す白血病幹細胞は骨髄内ニッチに潜み、静止期を維持することで TKI による細胞死刺激から守られるため、再発原因として残存すると考えられているからである。従って、白血病幹細胞やニッチを標的とする新たな治療法の開発が急務である。白血病細胞が生存、増殖の場とする骨髄は低酸素環境であることが知られており、白血病細胞もまた何らかの機序により低酸素環境に適応しているものと推測される。固形腫瘍においても、低酸素環境適応による代謝動態の変化が治療抵抗性獲得の要因であることから、我々は低酸素環境が CML 細胞に及ぼす影響を検討し、その適応機序の解明による新規分子標的治療戦略について研究を行った。</p> <p>【方法】2 種類の CML 細胞株 K562、KCL22 から 1%O₂ 下での長期培養に適応し、増殖可能となった亜株、K562/HA および KCL22/HA を樹立した。この HA 株及び CML 患者より得た白血病細胞を用いて以下の実験を行った。①免疫不全マウスに HA 株及び患者由来白血病細胞を移植し、骨髄内に生着した白血病細胞の酸素濃度を検討した。②フローサイトメトリーを用いた propidium iodide (PI) の単染色を用い、HA 株の細胞周期を解析した。また、細胞増殖速度をトリパンブルー染色による生細胞数測定で検討した。次に、これら HA 株と親株における TKI やアルキル化剤の治療効果を比較検討した。③ウェスタンブロッティング法により、低酸素適応による Bcr-Abl とその下流のシグナル伝達経路、アポトーシス関連蛋白の発現量の変化を検討した。④ATP と乳酸産生量、グルコース消費量を測定し、HA 株の解糖系への依存性を確認した。またその結果を踏まえて、解糖系における細胞障害性副産物 Methylglyoxal を乳酸に変換することで無毒化する酵素、Glyoxalase-I (Glo-I) の HA 株及び患者白血病細胞における発現、活性の変化を調べた。Glo-1 は、膵臓癌や肺癌などの固形腫瘍において、発現上昇と予後不良の関連がすでに報告</p>			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

されている酵素である(Sakamoto H, et al. *Clin Cancer Res.* 2001)。⑤3種類のGlo-1阻害剤、*S-p*-bromobenzylglutathione cyclopentyl diester (BBGC)、2-crotonyloxymethyl-4,5,6-trihydroxycyclohex-2-enone (COTC)及びmethyl-gerfelin (m-Ger)による*in vitro*でのHA株治療効果を検討した。また*in vivo*にて、K562/HA移植白血病モデルマウスを用いたBBGCによる生存期間延長効果を検討した。

【結果】①酸素濃度1.3%以下の細胞を特異的に染色するPimonidazoleを用いて白血病マウス大腿骨を染色したところ、骨髓内に生着したCML細胞はその解剖学的存在部位に関わらず、低酸素下で生存していることが明らかとなった。②親株と比較して、HA株は細胞増殖速度が1/3~1/4と緩やかであり、静止期の細胞数が増加していた。また、免疫不全マウスに親株とHA株をそれぞれ移植したところ、HA株はより高い生着効率を示した。一方、TKIやアルキル化剤に対してHA株は治療抵抗性を示した。③HA株において、Bcr-Ablリン酸化は親株に比し低下していたが、その下流のシグナル伝達経路には変化はなかった。また、アポトーシス関連蛋白の発現にも有意な相関は認められなかった。④HA株はATP産生をより解糖系に依存しており、Glo-Iは発現、活性ともに亢進していた。CML患者細胞においても、正常骨髓及び末梢血細胞と比べてGlo-Iの発現上昇が認められた。⑤Glo-I阻害剤であるBBGC、COTC、m-Gerに対して、HA株は親株に比してより高い感受性を示した。HA株移植マウスをBBGCで治療したところ、無治療群と比較して有意な生存期間延長効果が認められた。

【考察】低酸素環境は、CML細胞に一部“幹細胞様”の形質を示す細胞集団を増加させる。臨床上問題となる白血病幹細胞は従来の治療に抵抗性を示すことから、低酸素は白血病幹細胞の生存、維持に重要な因子であると考えられる。これらCML細胞の低酸素環境への適応と生存には、Glo-I過剰発現による解糖系毒性の回避が重要と考えられた。

【結論】骨髓内の低酸素環境下で治療抵抗性を示すCML細胞に対して、Glo-Iは次なる分子標的になりうる。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	630	氏名	武内 美紀
論文審査委員			
(学位論文審査の結果の要旨)			
<p>分子標的治療に対し感受性の低いがん幹細胞に対して新たな治療の標的分子を探索するため、本研究は幹細胞のニッチを構成する環境因子の一つである低酸素に着目した。低酸素環境に適応させた CML 細胞 (HA 株) を樹立し、親株に比べて発現の高い遺伝子を特定し、その発現を阻害することにより、がん幹細胞の治療感受性を上げることを試み、以下の点を明らかにした。</p> <p>(1) HA 株は親株に比べ、増殖を休止している細胞が多く、<i>in vivo</i> での生着率も高く、チロシンキナーゼ阻害剤やアルキル化剤に対して治療抵抗性であり、幹細胞的な性格を持っていた。</p> <p>(2) HA 株は親株に比べ、がん細胞のワールブルグ効果として知られる嫌氣的解糖系の亢進を反映して、毒性副産物の解毒に働く Glo-1 遺伝子の発現が亢進していた。</p> <p>(3) Glo-1 阻害剤に対して、HA 株は、<i>in vitro</i>, <i>in vivo</i> において、親株に比べてより高い感受性を示し、新たな治療薬として期待できた。</p> <p>本論文は、CML 患者のがん幹細胞に対する治療について新しい知見を与えたものであり、がん一般への応用も期待できる。最終試験として論文内容に関連した試問を受け、博士 (医学) の学位論文に値するものと認められた。</p> <p style="text-align: right;">(総字数 518)</p>			
(平成 22 年 8 月 31 日)			