

氏名(本籍)	瀬川 秀和(京都府)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博士第491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17年3月25日
学位論文題目	The anti-leukemic efficacy of the third generation bisphosphonate ONO5920/YM529  (第三世代ビスフォスフォネートONO5920/YM529の抗白血病効果)
審査委員	主査 教授 山路 昭 副査 教授 柏木 厚典 副査 教授 小笠原 一誠

## 論文内容要旨

※整理番号	495	(ふりがな) 氏名	せがわ ひでかず 瀬川 秀和
学位論文題目	The anti-leukemic efficacy of the third generation bisphosphonate ONO5920/YM529 (第三世代ビスフォスフォネート ONO5920/YM529 の抗白血病効果)		
<p>〔目的〕ビスフォスフォネート製剤 (BPs) は臨床的に骨吸収阻害剤として広く用いられているが、最近 BPs に乳がん、前立腺がんおよび骨髄腫に対する直接的な抗腫瘍効果があることが報告された。一方、Ras 関連蛋白は白血病においてしばしば高発現し、進展に深く関わっている。BPs は現在第3世代まで開発され、われわれは最も強い骨吸収抑制作用をもつ第3世代 BP ゾレドロネート (ZOL) が、<i>in vitro</i> および <i>in vivo</i> で Ras 関連蛋白を阻害することで、抗白血病作用を有することをすでに報告した (Kuroda <i>et al.</i> Blood 102: p2229; 2003)。今回もうひとつの第3世代 BPs であり、日本で開発された YM529 の抗白血病効果について検討した。</p> <p>〔方法〕5種の白血病細胞株および5例の患者新鮮白血病細胞を用いて、以下の実験を行った。1) 白血病細胞株に対する YM529 の増殖抑制効果を MTT アッセイで検討した。2) YM529 によってもたらされる細胞死の機序がアポトーシス誘導によるものか明らかにするため、フローサイトメトリーを用いた propidium iodide (PI) の単染色および AnnexinV/PI の二重染色での解析に加え、Hoechst33342 による核染色を行い蛍光顕微鏡で形態学的観察を行った。3) YM529 の作用機序について、3例の慢性骨髄性白血病患者細胞から蛋白を抽出し、Ras 関連蛋白の変化をウエスタンブロット法で検討した。4) 多剤耐性を誘導された P 糖蛋白高発現株 (K562/D1-9) に対する YM529 の効果を、トリパンブルーによる生細胞数測定で検討した。5) 2例の急性リンパ性白血病患者細胞を移植した免疫不全である NOD/SCID マウスを YM529 で治療し、フローサイトメーターを用いて末梢血中白血病細胞を測定し、<i>in vivo</i> での YM529 の効果を検討した。6) MTT アッセイを用い YM529 と既存の抗癌剤 (パクリタキセル、ダウノマイシン、シタラビン) との併用効果について調べた。</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。

〔結果〕 1) 5種の白血病細胞株に対する YM529 の  $IC_{50}$ (half-maximal inhibitory concentrations)は 22-65 $\mu$ M であり、用量時間依存性に増殖を阻害し、ZOL と同程度の効果を有していた。しかし正常造血細胞に対しては 50  $\mu$ M でも増殖抑制はみられなかった。2) YM529 は、ヒト慢性骨髄性白血病細胞株 BV173 にアポトーシスを誘導した。3) YM529 は、P 糖蛋白高発現株に対しても、親株と同等の増殖抑制効果を示した。4) ウェスタンブロット法による検討で、YM529 投与により患者白血病細胞で Ras 関連蛋白のプレニル化が阻害された。5)患者新鮮白血病細胞移植マウスで、YM529 は有意に白血病細胞増殖を抑制し、マウス生存期間を延長した。6) YM529 はパクリタキセルおよびダウノマイシンの効果を相乗的に、またシタラビンの効果を相加的に増強した。

〔考察〕今回 YM529 にも抗白血病効果があることが明らかとなり、Ras 関連蛋白のプレニル化が白血病において重要な役割を果たし、白血病治療を行ううえでよい分子標的となることが明らかとなった。同時に抗白血病作用は ZOL に特異的に認められるのではなく、強力なプレニル化阻害作用を有する第3世代BPsに広くみられると考えられた。また YM529 の抗白血病作用は P 糖蛋白によって阻害されないこと、また患者新鮮白血病細胞に対してもその作用を発揮したことより、臨床的に耐性を有している患者にも有効である可能性が示唆された。しかし、YM529 単剤では完全に白血病の進展を抑えることはできず、さらに YM529 の効果を増強する併用薬剤の検討を行った。現在臨床的に白血病治療に用いられているダウノマイシンだけでなく、主に固形癌の治療に用いられているパクリタキセルとも相乗効果を認め、YM529 は白血病治療において新たな治療薬剤となりうると考えられた。

BPs は臨床的に用いられている用量を投与しても末梢血中濃度はせいぜい数 $\mu$ M にしか到達しない。第3世代 BPs (ZOL、YM529) の白血病細胞株に対する  $IC_{50}$  はおよそ 20-80 $\mu$ M であり *in vivo* での効果は疑問視されていた。しかし本研究で *in vivo* での YM529 の著明な効果が示され YM529 は高い骨親和性のために、白血病細胞の増殖の場である骨髄中で、末梢血中に比して高い濃度が維持されていることが示唆された。

〔結論〕第3世代 BPs である YM529 は、ZOL と同等の抗白血病作用をもち、今後血液悪性疾患の治療薬として有用な薬剤であると考えられた。

### 学位論文審査の結果の要旨

整理番号	495	氏名	瀬川 秀和
<p>(学位論文審査の結果の要旨)</p> <p>ビスフォスフォネート製剤 (BPs) は臨床的に骨吸収阻害剤として広く用いられてきた。一方、Ras 関連蛋白は白血病においてしばしば活性化されており、進展に深く関わっていることが知られている。</p> <p>本研究は、最も強い骨吸収抑制作用をもつ第 3 世代 BPs である ONO5920/YM529 (YM529) が、強力な Ras 関連蛋白不活化効果を有することに着目して、その抗白血病作用について検討したものである。</p> <p>その結果、YM529 は白血病細胞株において濃度時間依存性に増殖を抑制し、その作用は P 糖蛋白によって阻害されず、また患者新鮮白血病細胞に対しても同様の効果を示したことより、臨床的に薬剤耐性を有している患者にも有効である可能性が示唆された。</p> <p>また YM529 は、現在臨床的に白血病治療に用いられているダウノマイシンとだけでなく、固形腫瘍に用いられているパクリタキセルとも相乗効果を認め、新たな治療薬剤となりうると考えられた。</p> <p>本研究は、白血病に対する Ras 関連蛋白を標的とした新たな分子標的治療の可能性に言及したもので、今後の臨床での発展性もあり、博士 (医学) の学位授与に値するものと認められた。</p> <p style="text-align: right;">(平成 17 年 2 月 15 日)</p>			