

氏名	おか だ まさ ゆき 岡 田 雅 行
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 2794 号
学位授与の日付	平成 17 年 1 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	医学研究科内科系専攻
学位論文題目	A novel mechanism for imatinib mesylate-induced cell death of BCR-ABL positive human leukemic cells — caspase-independent, necrosis-like programmed cell death mediated by serine protease activity (BCR-ABL 陽性ヒト白血病細胞に対する, メシル酸イマチニブによる細胞死誘導の新たな機序—セリンプロテアーゼ活性を介した, カスパーゼ非依存性かつネクロシス様のプログラムされた細胞死)
論文調査委員	(主 査) 教授 前 川 平 教授 米 原 伸 教授 内 山 卓

### 論 文 内 容 の 要 旨

<目的>チロシンキナーゼ阻害剤メシル酸イマチニブ(以下, イマチニブ)の細胞死誘導機序を詳細に解析することを目的とした。

<方法>BCR-ABL 陽性ヒト白血病細胞株; BV173, K562 および試薬; イマチニブ 1 $\mu$ M, zVAD-fmk(zVAD)40 $\mu$ M を用いて次の項目を検討した。1) 細胞死(propidium iodide; PI) 2) 細胞形態(光学および電子顕微鏡) 3) DNA 断片化, DNA 含量(電気泳動法, 細胞周期解析) 4) カスパーゼの活性(基質反応) 5) ミトコンドリア膜電位(3,3'-dihexyloxycarbocyanine iodide; DiOC6(3)-PI 二重染色) 6) 細胞内 reactive oxygen species; ROS(2',7'-dichlorofluorescein-diacetate; DCFH-DA) 7) 細胞内 apoptosis-inducing factor; AIF(免疫蛍光染色) 8) Omi/HtrA2 のミトコンドリアからの遊離(ミトコンドリア-細胞質分離および Western blot 法) 9) BCR-ABL のチロシンリン酸化(Western blot 法)

<結果>1) <カスパーゼ抑制下におけるイマチニブの細胞死誘導> 広域カスパーゼ阻害剤 zVAD 40 $\mu$ M で前処理された BV173, K562 をイマチニブ 1 $\mu$ M で培養すると, イマチニブ単独の場合よりやや遅れて, 死細胞が増加した。zVAD 40 $\mu$ M にてカスパーゼが完全抑制されることは確認された。2) <イマチニブによるカスパーゼ非依存性ネクロシス> イマチニブ単独により誘導されるアポトーシスとは異なり, zVAD+イマチニブで誘導される死細胞形態は, ピクノーシス, 核の断片化の欠如, 塊状のクロマチン, 細胞質の空胞形成を特徴とし, ネクロシスと思われた。また DNA 断片化や DNA 含量低下を認めないこともアポトーシスと異なる点であった。3) <本ネクロシスにおけるミトコンドリア膜電位の低下> zVAD+イマチニブによりネクロシスに到る過程において, 細胞死に到る以前にミトコンドリア膜電位の低下を認めた。このことより, ネクロシスにミトコンドリアが関与している可能性が示唆された。4) <ネクロシスの機序とミトコンドリア関連因子> カスパーゼ非依存性細胞死の伝達物質として, ROS, AIF, Omi/HtrA2 を検討した(本細胞死に核の断片化がみられないことよりエンドヌクレアーゼ G は除外)。その結果, ROS 過剰産生と AIF の核移行はみられず, Omi/HtrA2 のミトコンドリアから細胞質への遊離がみられた。5) <セリンプロテアーゼ阻害剤によるカスパーゼ非依存性ネクロシスの抑制> Omi/HtrA2 は, そのトリプシン様セリンプロテアーゼ活性によりアポトーシスとは異なった細胞死を誘導するとされている。トリプシン様セリンプロテアーゼの阻害剤 N-a-tosyl-L-lysine-chloromethyl ketone; TLCK を zVAD とともに細胞に前処理した後イマチニブを作用させると, 72 時間後に到るまで細胞死はきわめて効率よく抑制された。また, TLCK がイマチニブそのものに影響していないことは, BCR-ABL のチロシン脱リン酸化(イマチニブの下流シグナル)によって示された。

<考察>BCR-ABL 陽性白血病細胞がイマチニブにより細胞死に到る経路は, ミトコンドリアの下流において, カスパー

ーゼを介するアポトーシスと Omi/HtrA2 を介すると思われるネクローシスに分岐した。近年、ネクローシスの形態をとるプログラムされた細胞死が様々な系で注目されているが、ミトコンドリアの機能障害と intermembrane space に存在する Omi/HtrA2 が、新しい細胞死の機序に関与することが初めて示された。

#### 論文審査の結果の要旨

白血病細胞に対するチロシンキナーゼ阻害剤メシル酸イマチニブ（以下、イマチニブ）の細胞死誘導機序を詳細に解析し、アポトーシスのみでなく、ネクローシスによる細胞死による機序も併存していることを報告したものである。

申請者は、BCR-ABL 陽性ヒト白血病細胞株に対して、広域カスパーゼ阻害剤 zVAD を用いてイマチニブの細胞死誘導機序を解析した。イマチニブと zVAD を併用した場合、イマチニブ単独による細胞死と異なり、ピクノーシス、核の断片化の欠如、塊状のクロマチン、細胞質の空胞形成が見られた。この過程を詳細に検討し、(1)zVAD を併用することにより、細胞死に至る前にミトコンドリア膜電位の低下を証明した、(2)カスパーゼ非依存性の細胞死を担うシグナルとして、細胞内 reactive oxygen species (ROS), apoptosis-inducing factor, Omi/HtrA2 のミトコンドリアからの遊離を検討し、Omi/HtrA2 のミトコンドリアから細胞質への遊離のみが見られた、(3)トリプシン様セリンプロテアーゼ活性阻害剤を用いて Omi/HtrA2 の働きをブロックすると、細胞死は効率的に抑制されることを観察した。すなわち、BCR-ABL 陽性白血病細胞がイマチニブにより細胞死に至る経路は、ミトコンドリアの下流において、カスパーゼを介するアポトーシスと Omi/HtrA2 を介するネクローシスとに分岐することが示された。

以上の研究は、あたらしい細胞死の機序の解明に貢献し、新規のがん治療の開発に寄与するところが多い。したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。なお、本学位授与予定者は、平成16年10月25日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け合格と認められたものである。