京都大学	博士（　医科学　）	氏　名	長　尾　里　奈
論文題目	Growth inhibition of imatinib-resistant CML cells with the T315I mutation and hypoxia-adaptation by AV65 - a novel Wnt/β-catenin signaling inhibitor. （新規 Wnt/β カテニンシグナル伝達阻害剤 AV65 による、T315I 遺伝子変異と低酸素環境への適応によってイマチニブ耐性を獲得した CML 細胞の増殖抑制）		

Bcr-Abl キメラ蛋白の異常活性化が原因で生じる慢性骨髄性白血病（CML）は、メシル酸イマチニブ（IM）の出現により予後が劇的に改善された。しかし、Abl チロシンキナーゼドメインの 315 番目のスレオニンがイソロイシンに置換された T315I 変異を有する CML 細胞は IM や第二世代 Abl チロシンキナーゼ阻害剤に対し抵抗性を示す。また、これらの分子標的治療薬は CML 幹細胞には効果がなく、残存した CML 幹細胞は再発の大きな要因とされている。CML では Wnt/β カテニンシグナルが活性化しており、さらにβカテニンが CML 幹細胞の維持に重要である。本研究では、新規に開発された新規 β カテニン阻害剤 AV65（米国 PGX Health MD 社）の IM 感受性および耐性 CML 細胞株に対する有効性を検討した。

まず、CML細胞株K562, BV173, KT-1, MYLは健常人の骨髄細胞に比べβカテニンの発現が高く、K562 にAV65 を投与するとβカテニン、cyclinD1 やsurvivinなどの下流の蛋白が濃度・時間依存的に減少することを確認した。AV65 はIM感受性CML細胞 7 株（K562, BV173, KT-1, MYL, KU182, MEG01, KBM5）に対し、IC_{50}が 9.8～33.1 nMと低濃度で増殖阻害効果を示した。また、健常人由来骨髄細胞に比べ、慢性期のCML患者由来細胞では約 5 倍の増殖阻害効果を示した。K562 とBV173 にAV65 を 30 nM、12 時間投与し、細胞周期と同時にDNA断片化をTUNEL染色で観察したところ、$TUNEL^+$細胞がG_1期～S期にかけて検出された。AV65 投与後、G_1期～subG_1期にある細胞の比率が増加し、G_1期に働くサイクリン依存性キナーゼ（CDK）阻害因子（CKIs）、p21、p27、p57 のいずれの転写量も増加した。AV65 は濃度・時間依存的にK562 とBV173 のアポトーシスを誘導し、カスパーゼ阻害剤Z-VADを添加するとBV173 のアポトーシスは阻害された。一方、K562 はZ-VADを添加してもアポトーシスが誘導された。したがって、AV65 によるアポトーシスのカスパーゼ依存性は細胞株ごとに異なると推察された。以上の結果から、AV65 はCML細胞株のβカテニンおよび下流タンパクを減少させ、G_1期でのCKIsの増加によりG_1期に細胞周期を停止させ、アポトーシスを誘導することが明らかになった。さらに、AV65 はcombination indexでの解析から、5.9 nM以上の濃度でIMと相乗効果を認めた。

IM耐性CML細胞株に対しては、T315I変異を有するKBM5/STI-R、Lyn過剰発現株MYLR1、さらにBcr-Abl増幅株K562/IMRに対しても、AV65 は親株と同程度の濃度で効果を示した。最後に、低酸素環境（1% O_2）適応CML細胞株（CML/HA）に対するAV65 の効果を検討した。樹立したCML/HA細胞株は、G_0期の比率とβカテニンの発現が高く「幹細胞様」の性質を持ちIM抵抗性を示すが、AV65 はCML/HA細胞に対しても親株と同程度の濃度で増殖阻害効果を示した。以上の結果から、AV65 はT315I変異や低酸素環境に適応することでIM耐性を獲得したCML/HA細胞株にも効果を有することが明らかになった。

今回の研究結果によって、Wnt/β カテニンシグナルが CML の新たな治療標的となりうると考えられ、AV65 が CML、とくに IM 耐性のものにも有効である可能性が示唆された。

（論文審査の結果の要旨）

慢性骨髄性白血病（CML）において、Bcr-Abl の T315I 遺伝子変異および、再発の要因である CML 幹細胞が、イマチニブ（IM）や第二世代の薬剤に耐性を示し問題となっている。CML 幹細胞の維持には Wnt/βカテニンシグナルが重要であることから、申請者は新規β カテニン阻害剤 AV65 の CML 細胞株に対する有効性を検討した。

AV65 がCML細胞株のβカテニン、および下流の蛋白を減少させ、IC_{50} 9.8～33.1 nMと低濃度で細胞の増殖を阻害することを確認した。CML細胞株にAV65 を投与した際、TUNEL陽性細胞がG_1期～S期にかけて検出され、G_1期に働くサイクリン依存性キナーゼ阻害因子（CKIs）の転写量が増加し、本薬剤がCKIsを増加させて細胞周期をG_1期に停止させアポトーシスを誘導することを明らかにした。さらに、IM併用によりその効果が増強されることを確認し、加えてT315I変異、Lyn・Bcr-Abl過剰発現によりIM耐性となったCML細胞株に対しても親株と同程度の濃度で効果を示すことを明らかにした。また、低酸素環境（1% O_2）への適応により幹細胞様の性質を持ちIM耐性を示すCML細胞株にもAV65 が奏効することを示した。

以上の研究は、Wnt/β カテニンシグナルが CML の治療標的となり得ること、およびAV65 が IM 耐性の難治性 CML にも有用であることを示唆する。

したがって、本論文は博士（医科学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 24 年 1 月 13 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。

要旨公開可能日：　　年　　月　　日　以降