

|         |                                                                                                        |
|---------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名     | 樋口 富彦<br>ひぐち とみ ひこ                                                                                     |
| 学位の種類   | 医学博士                                                                                                   |
| 学位記番号   | 論医博第593号                                                                                               |
| 学位授与の日付 | 昭和50年5月23日                                                                                             |
| 学位授与の要件 | 学位規則第5条第2項該当                                                                                           |
| 学位論文題目  | <b>Phosphorylation of 6-Mercaptopurine in Leukemic Cells</b><br>(白血病細胞における抗白血病剤 6-Mercaptopurine の磷酸化) |

論文調査委員 (主査) 教授 沼 正 作 教授 翠 川 修 教授 脇坂 行 一

### 論 文 内 容 の 要 旨

目的：6-mercaptopurine (6MP) は急性白血病の化学療法に当初から用いられ、その有用性が認められている。しかし、その効果は必ずしも普遍的または理想的であるとは云い難い現況にある。著者は白血病細胞における 6MP の代謝と治療効果との関連性について検討し本剤の合理的使用法、耐性発現機序とその対策を考察することにより白血病化学療法の成績を向上せしめる事を目標に以下実験を行なった。

方法：白血病細胞浮遊液または白血球 Homogenate と  $6MP-^{14}C$  または  $Hypoxanthine-^{14}C$  とを反応せしめ、その反応液の Paperchromatography, Dowex-I column chromatography あるいは高圧電気泳動法を行ない metabolites を分離定量し Thioinosinic acid (TIMP) 産生量、6MP 磷酸化酵素活性、Hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase (HGPRTase) 活性、Phosphoribosylpyrophosphate (PRPP) 等を算出し臨床効果との関連性を検討した。

結果：6MP の活性化の機序を明らかにするため白血病細胞浮遊液における 6MP の TIMP への磷酸化量と当該磷酸化酵素活性との関連性を検討した。白血球 Homogenate の 6MP 磷酸化酵素活性、あるいは HGPRTase 活性は、急性白血病患者 7 例の平均値でそれぞれ  $329 \pm 56$  および  $765 \pm 77$   $m\mu$  moles/ $3 \times 10^7$  cells/hr. で両者は同じ order の値を示し且つ症例間にもほとんど差異がなかった。しかしこれと同一濃度の白血球浮遊液による磷酸化量は 0.01 より 0.52  $m\mu$  moles/ $3 \times 10^7$  cells/hr. で当該磷酸化酵素活性に比し極めて低値であり且つ症例により広範な変動を示した。TIMP 産生量が低値を示した症例は臨床的に 6MP が無効で、TIMP 産生量とその臨床効果との関連性が示唆された。6MP より TIMP を産生する反応には PRPP を必要とするが、白血病細胞内 PRPP 濃度は被検全例が 0.03  $m\mu$  moles/ $3 \times 10^7$  cells 以下と云う低値を示し且つその反応の PRPP に対する  $K_m$  は  $2.0 \times 10^{-4} M$  で同反応の 6MP に対する  $K_m$   $1.1 \times 10^{-5} M$  に比し約 20 倍の高値を示し 6MP の活性化における PRPP の必要性を示唆した。さらに人白血病細胞内 PRPP 濃度が TIMP 産生量に比し極めて低値であることは白血病細胞と 6MP との Incubation 中に新たに PRPP を産生する可能性を暗示した。そこで白血病細胞を無機磷酸 60 mM の

存在下で incubate するとかなりの割合で PRPP 濃度が上昇することが認められたが、その増加率は症例間に著明な差異を示し急性白血病10例の PRPP 産生量は5より  $38 \text{ m}\mu \text{ moles}/3 \times 10^7 \text{ cells/hr.}$  で PRPP 産生量が高値を示す症例は TIMP 産生量が高い傾向を示した。細胞内 PRPP 濃度が高値を示した L1210 細胞では TIMP 産生量, 6MP 磷酸化酵素活性, HGPRTase 活性は, それぞれ  $1.95 \text{ m}\mu \text{ moles}/3 \times 10^7 \text{ cells/hr.}$ ,  $483 \text{ m}\mu \text{ moles}/3 \times 10^7 \text{ cells/hr.}$ ,  $1,805 \text{ m}\mu \text{ moles}/3 \times 10^7 \text{ cells/hr.}$  であり, 人白血病細胞のそれらと比較すると, 酵素活性には大差がないが, TIMP の産生量が有意に高値を示した。この所見からも 6MP の磷酸化における PRPP 供給の重要性が示唆された。尚 L1210 細胞 Extract を酵素液として PRPP  $0.1 \mu \text{ moles/ml}$  存在下では 6MP の磷酸化は glutamine の添加により有意に低下し glutamine と PRPP を Preincubation することにより, さらに低下が増強するのが認められ, 6MP の磷酸化には PRPP の産生量はもとより PRPP を消費する他の反応系の活性とも密接に関係していることが推定された。

結論: 6MP の白血病細胞増殖抑制効果発現には, 当該磷酸化酵素活性より PRPP の供給がより重要な役割を演じていることが示唆された。これら所見は 6MP の使用に際し感受性試験および耐性発現予知にも利用しうる。細胞内 PRPP は解糖系より合成され種々の nucleotide 産生に複雑に関連するが, これらの代謝系に作用して PRPP の濃度を維持する方法が 6MP の効果増強に有効であると考えられる。

#### 論文審査の結果の要旨

著者は白血病細胞における 6MP の活性化型 (TIMP) への転換の機序の一端を明らかにするため, 人白血病細胞, マウス L1210 細胞の浮遊液または homogenate と  $6\text{MP-}^{14}\text{C}$  または  $\text{hypoxanthine-}^{14}\text{C}$  とを反応せしめ, metabolites を分離定量し, TIMP 産生量と, 6MP 磷酸化酵素活性, hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase (HGPRTase) 活性, PRPP との関係を検討した。その結果, 白血球 homogenate の 6MP 磷酸化酵素活性あるいは HGPRTase 活性は急性白血病の各症例間で大差がないが, 同一濃度の白血球浮遊液による磷酸化量は症例間に著しい差があることを認めた。さらに TIMP 産生量に影響を及ぼす因子を検索し, 6MP より TIMP を産生する反応に必要な PRPP の量が 6MP の活性化に重要な役割を演ずること, 白血病細胞を無機磷酸の存在下で incubate すると PRPP が増加し, かつこの PRPP 産生量の高い症例は TIMP の産生量が高いことを証明した。また L1210 細胞 extract を用いた場合, 6MP の磷酸化は glutamine の添加によって低下することから, 6MP の磷酸化には PRPP を消費する他の反応系の活性も関係することを示唆した。以上本論文は白血病細胞において, 6MP が TIMP に転換される場合, TIMP 産生量に PRPP の供給量が重要な関係を有することを明らかにしたもので, 6MP の活性化機序の解明に寄与する所が多い。

よって, 本論文は医学博士の学位論文として価値あるものと認める。