

氏 名	にし はら とし お 西 原 利 男
学位の種類	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 2683 号
学位授与の日付	平 成 16 年 3 月 23 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	Effects of the Tyrosine Kinase Inhibitor, Imatinib Mesylate on a Bcr-Abl-Positive Cell Line: Suppression of Autonomous Cell Growth but No Effect on Decreased Adhesive Property and Morphological Changes. (Bcr-Abl陽性細胞株におけるチロシンキナーゼ阻害剤イマチニブメシレートの効果：細胞増殖は抑制するが、接着性の低下や形態変化には影響を与えない)
論文調査委員	(主 査) 教 授 前 川 平 教 授 下 遠 野 邦 忠 教 授 内 山 卓

論 文 内 容 の 要 旨

(目的) bcr-ablキメラ遺伝子によって作られるキメラ蛋白Bcr-Ablは高いチロシンキナーゼ活性を持ち、白血病発症に関わっていると考えられている。一方チロシンキナーゼ阻害剤であるイマチニブメシレートはAblのチロシンキナーゼ活性を特異的に阻害し、現在臨床に使用されてBcr-Abl陽性白血病の治療に効果を発揮している。しかし慢性骨髄性白血病の急性転化例やBcr-Abl陽性急性白血病に対する効果は一時的であり、耐性化が問題となっている。Bcr-Abl蛋白は細胞増殖の他にもさまざまな細胞変化をもたらすことから、本研究ではbcr-abl遺伝子を発現させたヒト白血病細胞株を用いて、そのチロシンキナーゼ活性が自律性増殖以外の形質変化にも関係しているのかどうかを明らかにするために、細胞増殖および接着性、形態変化について検討した。

(方法) GM-CSF依存性ヒト白血病細胞株TF-1およびTF-1にbcr-abl遺伝子を発現させたTF-1Bcr-Ablにイマチニブメシレートを種々の濃度で加え、細胞増殖に与える影響をMTTアッセイで、また細胞増殖にかかわる細胞内蛋白のチロシンリン酸化および蛋白の会合・解離についてウエスタンブロット法にて検討した。細胞接着性の評価は、フィブロネクチンをコートした培養ウェル上にあらかじめ蛍光標識した細胞を接着させ、その蛍光量を測定しておこなった。接着に関わるインテグリンとしてVLA-4およびVLA-5の発現をフローサイトメトリーによって解析した。細胞形態についてはF-アクチンおよび微小管(α -チューブリン)の免疫染色をおこない、共焦点レーザー顕微鏡により観察した。

(結果と考察) TF-1Bcr-Ablは親株であるTF-1と異なりGM-CSF非存在下で旺盛に増殖したが、イマチニブメシレートにより増殖は阻害された。この増殖阻害効果はGM-CSF添加により解除された。イマチニブメシレート処理によりBcr-Ablのチロシンリン酸化は持続的に抑制されたが、その際他の細胞内蛋白のチロシンリン酸化も著明に減少し、CrklおよびCblはともにイマチニブメシレートの影響を強く受け、またBcr-Ablとこれらの蛋白の複合体も部分的に解離した。CrklおよびCblはいずれもサイトカインによる増殖や接着に関わっているとされているが、Bcr-Ablによる増殖因子非依存性の増殖にはこれらのチロシンリン酸化および複合体が関係している可能性が示唆された。MEK1/2, ERK1/2はイマチニブメシレートにより影響を受けなかったが、一方Stat5は著明に脱リン酸化され、GM-CSF添加によってTF-1Bcr-Ablの増殖が回復する際にStat5が再活性化されたことから、増殖シグナルとしてStat5は重要な役割を果たしていると考えられた。

次に細胞接着と形態変化について検討した。親株のTF-1はフィブロネクチンをコートした培養ウェル上に接着・伸展する傾向を示したが、TF-1Bcr-Ablは概ね類円形で培養ウェル上にほとんど接着しなかった。ただしVLA-4, VLA-5の発現量については、フローサイトメトリーで見る限り両細胞株間に有意な差は見られなかった。またTF-1Bcr-Ablの形態変化や接着性の低下はイマチニブメシレート処理によって影響を受けなかった。

以上の結果から、Bcr-Ablによる一連の細胞変化の中には、接着性の低下や形態変化のようにBcr-Abl蛋白のもつチロシ

ンキナーゼが関与していないものがあり、それらの変化にはチロシンキナーゼ阻害剤が無効であることが示された。

論文審査の結果の要旨

チロシンキナーゼ阻害剤であるイマチニブメシレートはBcr-Abl陽性白血病の治療に効果を発揮しているが、その多様な生物作用については十分に解明されていない。また耐性化の問題も生じている。そこで本研究ではbcr-abl遺伝子を発現させたヒト白血病細胞株TF-1Bcr-Ablを用いて、そのチロシンキナーゼ活性が自律性増殖以外の形質変化にも関係しているのかどうかを明らかにするために、(1)細胞増殖、(2)接着性と形態変化について検討した。

まず、細胞増殖に与える影響をMTTアッセイで、また細胞内蛋白のチロシンリン酸化および蛋白の会合・解離についてウエスタンブロット法にて検討した。TF-1Bcr-Ablは親株であるTF-1と異なり、イマチニブメシレートにより増殖は阻害され、Bcr-Abl、CrklおよびCblのチロシンリン酸化は減少し、またBcr-Ablとこれらの蛋白の複合体も部分的に解離した。そしてStat5も著明に脱リン酸化された。

次に、接着性の評価は、蛍光標識した細胞を接着させ、その蛍光量を測定して行い、またVLA4とVLA5の発現をフローサイトメトリーによって解析した。細胞形態についてはF-アクチンと微小管の免疫染色を行い、観察した。TF-1と違って、TF-1Bcr-Ablは類円形でほとんど接着しなかった。ただしVLA4とVLA5の発現量は、両細胞株間で差はなかった。またこれらの変化はイマチニブメシレートによって影響を受けなかったことから、イマチニブメシレートは細胞接着性の低下や形態変化に無効であることが示された。

本研究は、Bcr-Abl陽性白血病に対するイマチニブメシレートの作用機序の解明に貢献し、今後の治療の発展に役立つものと思われる。従って、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、本学位申請者は平成16年1月6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。