

氏 名	稲垣 彬 いながき あきら
学位の種類	医学博士
学位記番号	医博第445号
学位授与の日付	昭和48年9月25日
学位授与の要件	学位規則第5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	Studies on the Mechanism of Action of 1-β-D-Arabinofuranosylcytosine as an Inhibitor of DNA Synthesis in Human Leukemic Leukocytes (ヒト白血病細胞における DNA 合成阻害剤としてのサイトシンアラビノサイトの作用機序に関する研究)
論文調査委員	(主査) 教授 深瀬政市 教授 沼正作 教授 脇坂行一

論文内容の要旨

〔研究目的〕 Cytosine arabinoside (Ara-C) は急性白血病に有効な薬剤として臨床的に使用されている。従来その作用機序として, CMP→dCMP への reduction 阻害による DNA 合成阻害が提唱されていたが (Chn and Fischer, 1962), 1968年に直接酵素レベルの実験に於て本剤が CMP→dCMP への reduction を行なう CDP reductase に阻害効果を示さない事が報告され (Moor and Cohen), 両者いずれの説がより可能性があるか大きな問題となった。適確な臨床的使用の為に本剤の作用機作を明らかにする事は極めて重要であり, 本研究はヒト白血病細胞を用いた Whole Cell 及び Enzyme Level の実験によって Ara-C の作用機序を追求する事を目的として遂行され, Ara-C は DNA polymerase を阻害する事によって DNA 合成阻害を来す事を明らかにした。

〔方法〕 ① Cell Incubation: 白血病患者より得られたヒト白血病細胞を Tyrode Solution に suspend し radioactive precursor (oridine ^3H etc) 及び ara-C と共に incubate した後, 細胞を遠心分離し, DNA, RNA 及び酸可溶性分画 (核酸中間代謝物) に対する radioactivity のとりこみを検討した。酸可溶性分画に含まれる核酸中間代謝物は Dowex 50 column chromatography 及び tetraborate system による paper chromatography により分離した。

② DNA Polymerase 阻害実験: DNA polymerase はヒト白血病細胞の Homogenate の 105,000g 上清又は Ehrlich ascite tumor cell の 105,000g 上清より Phospho cellulose column chromatography 及び硫酸分画により部分精製したものを使用した。阻害実験には Ara-C の他にその 5'-triphosphate である Ara-CTP を有機合成し使用した。

〔結果〕 ① ara-C の CDP→dCDP への reduction 及び RNA, DNA 合成に対する効果をヒト白血病細胞の whole cell をもちいた in vitro の実験により検討した。Uridine- ^3H を radioactive precursor として使用しその結果を Hydroxyurea の効果と比較した。Hydroxyurea は CMP→dCMP への reduction の阻害剤として知られている。Ara-C (20 μM) 及び Hydroxyurea (10 mM) は RNA 合成阻害を

全く示さずに DNA 合成を各々70%及び80%阻害した。同じ条件下で Ara-C は酸可溶性分画の CMP- $^3\text{H}^*$ 及び dCMP- $^3\text{H}^*$ のレベルに有意の変化を来さなかった。一方 Ara-C と対症的に Hydroxyurea は CMP- $^3\text{H}^*$ のレベルに変化なしに dCMP- $^3\text{H}^*$ の著しい低下を来した。以上の実験からヒト白血病細胞に於て Ara-C の基本的な作用部位は CDP→dCDP への reduction ではない事が明らかにされた。

② 従って Ara-C の他の作用機序を検討した。上記実験より DNA polymerase のレベルに於ける阻害が強く示唆された為にヒト白血病細胞及び Ehrlich Ascites tumor cell より分離した DNA Polymerase に対する Ara-C 及び Ara-CTP の効果を検討した。Ara-C は crude なヒト白血病細胞及び Ehrlich tumor cell の DNA polymerase に対し 0.16 mM 及び 0.18 mM の濃度で酵素活性を各々26%及び31%阻害した。DNA polymerase の基質がヌクレオシドトリリン酸である事から ara-C より ara-CTP がより効果のある事が推定されるが、事実 ara-CTP は部分精製した Ehrlich ascites tumor cell の DNA polymerase を 0.33 mM の濃度に於て95%阻害する事が示された。

〔結語〕 以上の結果よりヒト白血病細胞に於ける ara-C の作用機序は DNA polymerase 阻害による DNA 合成阻害であると考えられる。ara-C が DNA polymerase そのものに直接作用する事は他の白血病治療剤に比して極めて特異的な性質である。これは本剤の使用、他剤との併用に際して留意すべき点であると考えられる。又、ara-C の最終的な active form が ara-CTP であると考えられ、この点は本剤に対する耐性発現機序の研究に際して忘れてならないであろう。

注 *CMP- ^3H 及び *dCMP- ^3H は酸可溶性分画を IN perchloric acid の酸性条件下で 100 °C 10分処理した後得られたものであり、従って各々 CDP, CTP 及び dCDP, dCTP を含んだものである。

論文審査の結果の要旨

抗白血病剤 Cytosine arabinoside (Ara-C) の作用機序については、CMP より dCMP への Reduction を阻害するという説と、CDP reductase に阻害効果を示さないという説がある。著者はこの何れが妥当性があるかを検討するため、ヒト白血病細胞浮遊液について、 ^3H -uridine の DNA, RNA および酸可溶性分画へのとりこみに対する Ara-C の影響を、CMP より dCMP への Reduction の阻害剤として知られている Hydroxyurea のそれと比較した。その結果、Ara-C および Hydroxyurea は RNA 合成阻害を全く示さずに、DNA 合成を阻害したが、同じ条件下で Ara-C は酸可溶性分画の CMP- ^3H および dCMP- ^3H のレベルに有意の変化をきたさないのに対し、Hydroxyurea は CMP- ^3H のレベルの変化なしに d-CMP- ^3H の著しい低下を示したことから、ヒト白血病細胞において Ara-C の基本的作用部位は CMP より dCMP への Reduction の部位ではないことを明らかにした。さらにヒト白血病細胞および Ehrlich ascites tumor cell より分離した DNA polymerase に対する Ara-C および Ara-CTP の効果を検討した結果、Ara-C は両者を有意に阻害し、とくに Ara-CTP は後者を著明に阻害することを証明した。本論文はヒト白血病細胞における Ara-C の作用機序は DNA polymerase 阻害による DNA 合成阻害であることを明らかにしたもので、Ara-C の臨床応用に有益であり、医学博士の学位論文として価値あるものと認める。