

氏 名（本籍）	むら 村      た 田      けい 慶      いち 一
学 位 の 種 類	博 士 （ 医 学 ）
学 位 記 番 号	医 博 第 1 2 0 5 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 6 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 条 件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 専 攻	東 北 大 学 大 学 院 医 学 研 究 科 （ 博 士 課 程 ） 内 科 学 系 専 攻
学 位 論 文 題 目	Taxotere の 抗 腫 瘍 効 果 と 作 用 機 序 に 関 す る 基 礎 的 研 究

（ 主 査 ）

論 文 審 査 委 員	教 授 金 丸 龍 之 介      教 授 今 野 多 助
	教 授 貫 和 敏 博

## 論 文 内 容 要 旨

癌化学療法に於ける治療効果の向上目的には新抗癌剤の開発は不可欠である。1971年に Taxol が西洋イチイの樹皮よりスクリーニングされたが、原木の伐採を必要とし供給量の限界という問題があった。しかし、微小管蛋白質の重合を促進させる独自の作用を認める為、誘導体の開発が進められていた。

Taxotere は Taxol の誘導体の 1 つに属する新規抗癌剤である。同剤は針葉抽出物が前駆体となり半合成される為、Taxol と異なり安定した供給が可能となった。しかしながら、その作用機序に関する報告は少なく、臨床応用に於ても作用機序並びに耐性機序を明らかにする事は重要である。今回、Taxotere の *in vitro* に於けるヒト腫瘍細胞に対する抗腫瘍効果とその作用機序について基礎的検討を行なった。ヒト骨髄性白血病細胞株 K562 細胞とその Adriamycin (以下 ADM) 耐性細胞、Vincristin (以下 VCR) 耐性細胞の 3 株に対する細胞増殖抑制効果を ADM、VCR と比較検討した。薬剤 72 時間持続接触による K562 細胞に対する 50% 細胞増殖抑制濃度 (以下  $IC_{50}$ ) は Taxotere が 4.2nM、ADM が 24.6nM、VCR が 5.0nM であり、Taxotere と VCR の  $IC_{50}$  は同程度であった。K562/ADM 細胞に対して Taxotere、ADM、VCR の  $IC_{50}$  値はそれぞれ 177.5nM、1546nM、310.0nM であり、Taxotere が最も抗腫瘍効果が高く、又耐性は 562/ADM 細胞に対して Taxotere は 42.3 倍、ADM は 62.8 倍、VCR は 62.0 倍であり、Taxotere が最も交叉耐性が低い結果となった。K562/VCR 細胞に対する Taxotere、ADM、VCR の  $IC_{50}$  値はそれぞれ 25.3nM、118.7nM、37.6nM であり、K562/VCR 細胞に対する交叉耐性は Taxotere が 6.0 倍、ADM が 4.8 倍、VCR が 7.5 倍であった。通常 VCR の臨床的投与量は 1~1.5mg/m<sup>2</sup> である。一方、Taxotere の最大耐量は 70mg/m<sup>2</sup> であり VCR の約 50 倍の投与が可能である為、より優れた抗腫瘍効果を認めるものと考えられる。しかしながら、ADM や VCR の耐性に比べ低いとはいえ交叉耐性を認めており、この耐性機序はノザンプロットによる結果、K562/ADM 細胞が多剤耐性遺伝子 *mdr1*-mRNA を発現しており、P-糖蛋白質による薬剤の排出が原因の一つであると考えられた。P-糖蛋白質を発現している多剤耐性細胞に対しては、*verapamil* 等のカルシウム拮抗薬やカルモジュリン阻害剤が耐性克服に有用であるという報告もあるが、臨床応用には心機能の抑制という副作用の問題が残されている。また、P-糖蛋白質に対するモノクローナル抗体を用いた耐性克服の研究等も進められている。作用機序の解析の為、最初に細胞周期に対する作用の検討を行なった。DNA histogram 上、G<sub>2</sub>M 期に細胞が蓄積し、また形態的に分裂中期の細胞が増加しており、細胞分裂の阻害が生じていることが明らかになった。そして微小管蛋白質の重合能に対する作用を検討した結果、従来の抗微小管薬であるコルヒチンやピンカアルカロ

イド等とは異なり，GTPが非存在下に於てtubulinの重合を促進した。またカルシウムイオンの添加にても脱重合を起こさなかった。即ち，Taxotereにより動的平衡状態の微小管が重合の方向に働き，細胞の有糸分裂時の紡錘体の機能を阻害する結果，細胞分裂を分裂中期で停止させ，細胞死に至らせると考えられた。Taxotereの作用機序として他に標的があるか検討してみたが，DNA，RNA，蛋白質合成に対する阻害作用は認めなかった。又，DNAの高次構造変換に際し，重要な酵素であるTopoisomeraseが癌化学療法剤の標的として最近注目されているが，その阻害作用も認めなかった。以上の検討からTaxotereの作用は微小管蛋白質に特異的に働く細胞分裂阻害剤であると考えられた。しかしながら微小管蛋白質は有糸分裂の紡錘装置の主成分として細胞分裂時に働く以外に，細胞の形態維持，細胞の運動，付着，細胞内輸送など多様な機能を備えており，又，微小管脱重合は細胞膜増殖因子受容体からの核内へのシグナル伝達の制御にも関係深く，静止期細胞に於ける増殖開始刺激に対してTaxotereが何らかの影響を及ぼしている可能性もあり，更なる検討と共に併用療法による効果増強の開発等が今後も必要であると考えられる。

## 審査結果の要旨

癌化学療法の進歩には新抗癌剤の開発が不可欠であり、その臨床導入が望まれている。本論文は植物由来の新抗癌剤である taxotere の抗腫瘍効果と作用機能の解析についての研究である。最初に taxotere の抗腫瘍効果を K562 細胞とその adriamycin 耐性細胞, vincristine 耐性細胞を用い、薬剤は 72 時間持続接触とし、50%細胞増殖抑制濃度を求めたところ既存の vincristine や adriamycin と比較し、同等以上の効果を認め、本薬剤の抗腫瘍効果の高いことを示した。また交差耐性、特に multidrug resistance (MDR) の P-糖蛋白を発現する多剤耐性細胞に対する効果を検討した結果、交差耐性を示すものの vincristine や adriamycin より耐性度は低く、その有用性が高いことが示された。そして本薬剤の作用機序の解析の為、ウシ脳から精製された微小管蛋白質を用い、その重合能に対する作用について検討している。Guanosine triphosphate (GTP) 非存在下において taxotere は微小管蛋白質の重合を促進させ、またカルシウムイオンを加えても脱重合を起こさず、形成された微小管束の安定化作用を有することが認められた。またフローサイトメトリーから得られた DNA histogram 上、18 時間後に G<sub>2</sub>M 期に細胞が集積し、Wright-Giemsa 染色において metaphase cell の著増を認め、濃度依存的に mitotic-index が増加した。これらのことから本薬剤の作用は微小管の動的平衡状態を重合の方向に働かせ細胞の有糸分裂時の紡錘体機能阻害の結果、細胞を分裂中期で停止させ、細胞死に至らせることを示した。微小管以外の作用標的についても検索がなされているが taxotere の作用機序は微小管重合促進作用が主であり、topoisomerase に対する阻害や DNA, RNA, 蛋白合成等に対する阻害も認められない従来の抗癌剤とは異なる独特な作用を有する分裂阻害剤であることを初めて明らかにした。以上の成果は癌化学療法の向上に寄与するものであり本論文は医学博士の授与に値するものと考えられる。