氏　名（本籍）	横　山　明　子 (よこ やま あき こ)
学位の種類	博　士（医　学）
学位記番号	医　第　3062　号
学位授与年月日	平成10年3月4日
学位授与の条件	学位規則第4条第2項該当
最終学歴	昭和62年3月10日 福島県立医大医学科卒業
学位論文題目	ヒト白血病細胞株 K562 に対する Dolastatin 10 誘導体，TZT-1027 の抗腫瘍効果の検討
論文審査委員	(主査) 教授 金丸龍之介　教授 佐藤靖史 教授 今野多助

論　文　内　容　要　旨

Dolastatin 10は海洋生物を起源とする生理活性物質の探索中，西インド洋で採取されたタツナミガイ（*Dolabella auricularia*）から分離された抗腫瘍性ペプチドである。Dolastatin 10の誘導体の研究から新規化合物TZT-1027が本邦で合成された。TZT-1027はDolastatin 10を上回る抗腫瘍作用及び幅広い抗腫瘍スペクトルを示し，現在第1相臨床試験が本邦で進行中である。TZT-1027はDolastatin 10同様チュブリンに結合し微小管蛋白質の重合を阻害することで細胞増殖を抑制すると考えられているが，作用機序については十分な検討はなされていない。そこで，ヒト白血病細胞株K562を用いてTZT-1027が腫瘍細胞の増殖を抑制する効果及び，主に細胞周期に及ぼす影響から作用機序を検討した。更に臨床応用を考え耐性機構についても検討した。

K562細胞に対するTZT-1027，ADM，VCRのIC_{50}値はそれぞれ0.0087nM，24nM，2.7nMでありTZT-1027の抗腫瘍作用は他の2剤に比べて高かった。多剤耐性株K562/ADM細胞に対するTZT-1027，ADM，VCRのIC_{50}値はそれぞれ27.0nM，1512nM，153.3nMであり，親株と比べTZT-1027は3103倍，ADMは63倍，VCRは57倍の交差耐性を示した。またK562/VCR細胞に対するTZT-1027，ADM，VCRのIC_{50}値はそれぞれ1.3nM，165nM，66.7nMであり，こちらも親株と比べTZT-1027は149倍，ADMは7倍，VCRは25倍の交差耐性を示した。本実験で用いたK562/ADM細胞，K562/VCR細胞は，P-糖蛋白質を発現していることがRT-PCR法により確認されており，TZT-1027がP-糖蛋白質を介した多剤耐性に関わっている可能性が示唆された。

細胞周期上の作用機序を明らかにするためフローサイトメーターを用いてPI染色によりDNAヒストグラムを検討した。K562細胞は1nMのTZT-1027存在下培養でG2/M delayを，10nMではG2/M arrestを示した。10nMで更に培養を続けると48時間後からsub G1と8Cの細胞群が見られるようになった。次に細胞同調培養法を用いてTZT-1027のS期進行阻害作用の有無を検討した。チミジンダブルブロック法によりearly S期に同調したK562細胞をTZT-1027 10mMで1時間処理しても，S期の延長は見られず8時間後までコントロール群と同様に細胞周期が進行し，G2/M期で細胞周期が停止した。

顕微鏡下での形態学的観察ではprometaphaseの細胞集積が観察された。抗チュブリン抗体を用いた免疫染色でも紡錘体は殆ど観察されず，TZT-1027が微小管重合を阻害していることが示唆された。またTZT-1027はDNA，RNA，蛋白などの高分子物質の合成を阻害せず，M期において2本鎖の切断と再結合を介して構造変換を行うトポイソメラーゼII酵素の活性も阻害しなかったことから，K562細胞に対するTZT-1027の抗腫瘍作用の主要なメカニズムはチュブリン重合

阻害による細胞分裂阻止と考えられた。

K562 細胞を 10nM の TZT-1027 存在下で培養し続けると 48 時間以降 DNA ヒストグラム上に sub G1 細胞が出現することから，これらの細胞においてアポトーシスが誘導されている可能性が示唆された。PI/FITC 標識 Annexin V の二重染色を行ったところ 36 時間後からアポトーシス初期細胞が，48 時間後からアポトーシス後期細胞が見られた。これらの細胞から DNA を抽出し電気泳動パターンを検討したところ，48 時間以降 DNA fragmentation が見られた。TZT-1027 による細胞死の最終経路がアポトーシスを介する可能性が示唆された。

審査結果の要旨

本研究はTZT-1027の作用機序について検討している。TZT-1027はタツナミガイから分離された抗腫瘍性ペプチドDolastatin 10の誘導体であり，強力かつ幅広い抗腫瘍スペクトルを示し，現在第1相臨床試験が進行中の新規抗腫瘍性化合物である。作用機序としては試験管内でチュブリンに結合しその重合阻害に働くことが知られている。筆者はヒト白血病細胞株K562を用いてTZT-1027が腫瘍細胞増殖抑制効果，細胞周期に及ぼす影響，およびその耐性機構について培養細胞レベルの実験で検討している。

MTT assayを用いた感受性試験の結果TZT-1027はADM，VCRとくらべてIC_{50}値で1000倍以上の強力な抗腫瘍活性を示した。細胞周期に対する作用では1nMでG2/M delayを，10nMでは強力なG2/M arrestを示し，10nMでは48時間後からapoptosisによる細胞死が顕著に観察された。顕微鏡下での形態学的観察ではprometaphaseの細胞集積が確認され，抗チュブリン抗体を用いた免疫染色で紡錘体形成がほぼ完全に阻害されていた。筆者はさらにチミジンダブルブロック法による細胞周期同調培養系を用いて本剤が細胞周期の他のポイントに影響を与えないこと，さらに試験管内でDNA，RNA合成阻害およびtopoisomerase II阻害作用のないことを確認し本剤の主たる作用機序がチュブリン重合阻害による細胞分裂阻害によるものと結論している。

また薬剤耐性機序に関してはK562細胞由来の多剤耐性株K562/ADM，K562/VCR細胞を用いて感受性試験を行った結果，これらの耐性株はTZT-1027に対しそれぞれ親株の3103倍，149倍の交差耐性を示し，少なくともP-糖蛋白質を介した多剤耐性が本剤の薬剤耐性に関わっていることを示した。MRP耐性やチュブリン結合性に伴う耐性の検討は行っていないが文献的考察が加えられている。

本研究では新規抗腫瘍化合物TZT-1027を用いて主にその細胞生物学的作用機序に関して検討している。実験結果はG2-M期細胞周期停止による細胞分裂阻害であり，試験管内のチュブリン合成阻害という既知の作用から予測される結果であったが，それを同調培養系や共焦点レーザー顕微鏡を用いた免疫組織学的所見から詳細に確認しており，精度の高い実験結果となっている。また本剤の薬剤耐性機序の一部を明らかにし，さらに本剤によるapoptosis誘導に関してもpreliminaryな実験結果を示した上で，これらの点について文献を引用しながら今後の検討課題を論理的に整理してある。以上の点から本論文は学位論文としての水準に達しており，筆者に対する学位授与に値するものと判断する。