

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士 (医学)		氏名	美濃 達治
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1・2 項該当			
論文題目 A novel anticancer quinolone, (R)-WAC-224, has anti-leukemia activities against acute myeloid leukemia (新規キノロン系抗がん薬 (R)-WAC-224 は、急性骨髄性白血病に対し抗白血病活性を示す)				
論文審査担当者				
主査	教授	檜井 孝夫	印	
審査委員	教授	岡本 渉		
審査委員	准教授	川口 浩史		
〔論文審査の結果の要旨〕				
<p>急性骨髄性白血病(AML)は、造血幹細胞や前駆細胞の遺伝子やエピジェネティックな変化の蓄積によるクローン性疾患であり、加齢とともに発症率が上昇する難治性の造血器悪性腫瘍である。標準的な治療によるシタラビン(Ara-C)とアントラサイクリン系薬剤の併用療法によって、病型に応じて約 50～85%の患者が完全寛解に到達するが、造血細胞移植が実施されない場合、そのうち約 60～80%は最終的には再発する。高齢者に発症する AML においては、造血細胞移植の適応となりにくい上に、若年者と比較して寛解率も低く、再発率・治療毒性による早期死亡率とも高い。したがって、予後は著しく不良であり、長らく毒性の少ない新規治療薬の開発が待望されてきた。</p> <p>抗菌薬として広く使用されているキノロン系薬剤は、細菌のトポイソメラーゼIV[ヒトのトポイソメラーゼ II (Top2)に相当]を阻害する作用を有しており、アントラサイクリン系薬剤と異なり腫瘍細胞の耐性因子である P 糖蛋白質(P-gp)の過剰発現の影響を受けない。今回の研究では、Top2 を標的としたキノロン系抗腫瘍薬の候補として合成された新規化合物(R)-WAC-224(R-WAC)の AML 細胞株に対する抗腫瘍活性をマウスモデルを含む種々の実験系で評価した。</p> <p>まず、R-WAC が有する Top2 に対する阻害作用を、スーパーコイル状 DNA 基質を用いたアッセイキット(Human Topo II α Relaxation Assay Kit, Inspiralis 社)で確認した。R-WAC による Top2 阻害作用の IC50 は 2.26 μM であり、先行して臨床開発されているキノロン系抗白血病薬である vosaroxin(Vos)の IC50 1.10 μM と同等であった。次いで、AML 細胞株である MV4-11 を用いて、R-WAC の細胞増殖阻害作用を検討した。R-WAC は用量依存的に MV4-11 の細胞増殖を抑制し、その効果は 2 つの代表的な Top2 阻害薬[daunorubicin(DNR)および doxorubicin(DOX)]、Vos、Ara-C と同等であった。また、アネクシン V 染色を用いた検討により、R-WAC は、MV4-11 に対して、DOX や Vos と同程度にアポトーシスを誘導していることが確認された。以上の結果より、R-WAC は、Top2 阻害効果を介して直接的な殺白血病細胞作用を発揮している可能性が示された。</p> <p>P-gp は薬物排出トランスポーターであり P-gp の過剰発現はアントラサイクリン系薬剤等に対する耐性と関連している。そこで、P-gp を過剰発現するヒト子宮肉腫細胞株 P-SA 細胞と MES-SA/Dx5 細胞を用いて、Top2 阻害薬に対して P-gp を介した抵抗性に対する相</p>				

対抵抗値(P-gp 過剰発現細胞の IC50/コントロール細胞の IC50)を評価した。R-WAC 投与細胞の相対抵抗値は、アントラサイクリン系薬剤よりも低く、Vos に匹敵した。以上より、R-WAC は P-gp による薬剤耐性を克服する可能性があることが示された。

これらの *in vitro* での検討結果に基づき、マウスモデルを用いた R-WAC の毒性ならびに有効性の評価を行った。まず、BALB/c マウスを用いて、0 および 7 日目に溶媒のみ(12.5 mM の NaOH と生理食塩水)、DOX(10 mg/kg)、R-WAC(20 mg/kg)を静脈内投与した。DOX 投与マウスでは 14 日目に血清トロポニン T が有意に増加したが、R-WAC 投与マウスは血清トロポニン T の増加を示さず、R-WAC による心筋毒性は生じにくいことが示唆された。次に、1 匹のマウスあたり 10 切片を観察し、腸内陰窩数にて腸管毒性の評価を行った。DOX 投与マウスの陰窩数は、溶媒のみ投与マウスと比較して有意に減少していたが、R-WAC 投与マウスでは減少を示さず、R-WAC は腸管毒性も生じにくいことが示された。

次いで、B6C3F1 マウスに C1498 細胞(B6 マウス由来 AML 細胞)を脛骨内注射し、R-WAC 単剤療法の抗白血病効果を調べた。注射後 3 日目に体重によりマウスをそれぞれ 8 匹ずつの 5 群に分けた。溶媒のみ(12.5 mM の NaOH と生理食塩水)、DNR(10 mg/kg)、R-WAC(15、20、30 mg/kg)を注射後 3 および 10 日目に静脈内投与した。すべての群は、治療期間中に体重減少または重篤な毒性を示さなかったが、R-WAC 30 mg/kg 投与マウスは、溶媒のみ投与、DNR 投与、R-WAC 15 mg/kg 投与マウスよりも有意に長い生存率を示した。すなわち、R-WAC が毒性を増加させることなく用量依存的に *in vivo* で抗白血病効果を有することが示唆された。さらに R-WAC のヒト AML 細胞株に対する有効性を検討するため、MV4-11 を ICRnu/nu マウスに皮下接種して形成される異種髄外白血病腫瘍モデルを作成した。MV4-11 の接種当日、接種後 7 日目、14 日目に溶媒のみ、DNR 7.5 mg/kg、R-WAC 35 mg/kg の投与を行ったところ、R-WAC は DNR 投与群と同等の腫瘍増殖を抑制したことより、R-WAC 単剤療法が *in vivo* で抗ヒト白血病効果を有することが示された。

最後に、ヒト初代 AML 細胞に対する R-WAC の有効性を、治療抵抗性 AML の患者 3 名から同意を得て取得した Li-CD34+CD38-細胞のコロニー形成アッセイを用いて検討した。DMSO 存在下で培養した Li-CD34+CD38-細胞では、それぞれ 2×10^5 個、 2×10^5 個、 4×10^3 個のコロニーが観察されたのに対し、R-WAC 存在下におけるコロニー数はそれぞれ、0、0、1 個であり、R-WAC は AML 幹細胞のコロニー形成能を強く抑制することが示唆された。

以上の結果から本論文は、R-WAC が抗骨髄性白血病作用ならびに毒性プロファイルのいずれにも優れ、今後の臨床開発を検討するに値する有望な新規の抗白血病薬であることを示した重要な研究と考えられる。

よって審査委員会委員全員は、本論文が美濃達治に博士(医学)の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。