



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Dasatinibの一時的曝露による持続的細胞増殖抑制効果の検討および胸水発症メカニズムの解明〔論文内容及び審査の要旨〕
Author(s)	青山, 剛
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(臨床薬学)
Dissertation Number	甲第13967号
Issue Date	2020-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/77986
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Tsuyoshi_AOYAMA_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士(臨床薬学) 氏 名 青山 剛

学 位 論 文 題 名

Dasatinib の一時的曝露による持続的細胞増殖抑制効果の検討
および胸水発症メカニズムの解明

慢性骨髄性白血病 (CML) は血液がんの一種で、その病因であるフィラデルフィア染色体 (Ph⁺) の最終産物である BCR-ABL 融合タンパク質のもつチロシンキナーゼ活性が持続的に活性化されることにより、芽球などが無秩序に増殖し発症する。現在、本邦では BCR-ABL Tyrosine kinase inhibitor (TKI) が CML 薬物治療のファーストラインとして使用されており、従来の治療方法より高い治療効果および安全性が報告されている。

近年、TKI により一定期間効果を持続した症例に対し、服用中止による治療効果の維持の可否を検討する臨床試験が実施されている。TKI の服用中止は有害事象のリスクを減少させ、患者の QOL が向上するというメリットはあるが、患者の多くが再燃により治療を再開していることが報告されている。そのため、このような治療方法は患者にとって最適であるとは言えない。そこで、TKI の投与中止による効果の維持ではなく、隔日投与などの方法により治療効果を維持できる可能性を考えた。

また、TKI の治療効果にはいくつかの耐性が報告されており、耐性には細胞内濃度を低下させる薬物排出トランスポーターの Multi Drug Resistance-1 (MDR-1, P-gp) が寄与していると考えられるため、TKI の治療効果を検討する場合は P-gp の影響を考慮する必要がある。

本研究ではヒト慢性骨髄性白血病由来である K562 細胞に対し TKI (Imatinib, Nilotinib および Dasatinib) を一時的曝露後、その細胞増殖抑制効果が持続するかを観察し、その効果に MDR-1 が影響を与えるかを検討した。

まず、K562 細胞に対する各 TKI の細胞増殖に影響を与えない濃度を確認するために、臨床で観察される血中濃度範囲内で TKI を長時間曝露し、細胞生存率を評価した。その結果、検証した全 TKI は曝露濃度 0.01 ng/mL 付近で細胞増殖抑制効果が観察されなかったため、一時的曝露実験では TKI 曝露後の培養液中残存濃度が細胞増殖に影響を与えない濃度となるように薬物を洗浄除去し、実施した。

次に、TKI の 0.5 hr の一時的曝露後細胞生存率を算出し、細胞増殖抑制効果が持続するかを検討した。その結果、Imatinib では検討した全ての曝露濃度でその効果は確認されなかったが、Dasatinib および Nilotinib では高濃度による一時的曝露で持続的細胞増殖抑制効果が観察された。第二世代 TKI である Dasatinib および Nilotinib は Imatinib よりも強い持続的細胞増殖抑制効果を有することが示されたが、この効果に対する耐性の寄与は不明である。そこで、次に Dasatinib および Nilotinib の持続的細胞増殖抑制効果に P-gp が影響を与えるかを検討した。その結果、Dasatinib では P-gp によってその効果が減弱することが示されたが、Nilotinib では P-gp による影響を受けず、その効果が維持されることが示された。これらの結果から、Dasatinib は P-gp の影響を考慮する必要があるものの、特に Dasatinib および Nilotinib では隔日投与による治療手法の導入の可能性が示された。

MDR-1 などの耐性以外にも、治療効果に影響を与える因子に、胸水をはじめとする Vascular adverse event (VAE) がある。これらは治療中断の主要因であるため、最適な治療効果の獲得にはこれら有害事象も回避する必要がある。そのためには、TKI による VAE の詳細なメカニズムの解明は急務である。CML 薬物治療で使用する TKI は標的分子である BCR-ABL チロシンキナーゼを強く阻害するが、第二世代である Dasatinib などではそれ以外のキナーゼも強く阻害することが報告されており、それにより血管有害事象が生じている可能性が高いと考えられる。血管透過性の制御に関わる重要なキナーゼとしては、Src や Tie-2 などがあり、Dasatinib や Bosutinib は Src を強く阻害する薬剤であるため、これらキナーゼを阻害する

ことによって胸水などの VAE を発症している可能性が先行研究によって報告されている。しかし、その先行研究においては、Dasatinib では血管透過性が亢進するのに対し、同じく Src を同程度阻害する Bosutinib では血管透過性に変化がないことが報告されており、矛盾が生じている。Bosutinib においても臨床において胸水の発症が報告されているが、それらの症例では Bosutinib 導入前に Dasatinib を服用した患者であることが報告されており、胸水の発症が Dasatinib に強く依存する有害事象であることが考えられる。

そこで、Dasatinib による胸水発症のメカニズムには Src 以外の因子が関与している可能性が高いと考え、TKI ごとの血管内皮細胞への影響や血管透過性に関わるタンパク質発現の変動などを検討した。

まず、Dasatinib で観察されている血管への影響が他の上皮細胞では観察されないかを確認するために、血管内皮細胞としてヒト臍帯静脈内皮細胞 HUVEC を使用し、比較する上皮細胞としてヒト網膜色素上皮細胞 ARPE-19 を使用し、細胞増殖への影響を細胞生存率アッセイにて観察した。その結果、Dasatinib でのみ、細胞生存率の減少が観察され、その現象は HUVEC においてのみ観察された。次に TKI を曝露した場合の HUVEC の形態変化を経時的に観察した。その結果、Bosutinib では大きな形態変化は観察されなかったが、Dasatinib でのみ、細胞間隙の増大が観察された。さらに、細胞間接着を形成し、血管透過性を制御する因子である VE-cadherin の発現が TKI によって変動するかを確認した。その結果、その発現に変動は観察されなかったため、Dasatinib で観察された現象は VE-cadherin 発現の変動に起因する可能性が低いことが示された。そこで、血管透過性制御に関与する因子を阻害した場合に Dasatinib 様の細胞形態変化が生じるかを確認し、Dasatinib が影響を与えている可能性のある因子を抽出することとした。その結果、cAMP および Tie-2 を阻害した場合に、同様の現象が確認された。しかし、Tie-2 は胸水発症報告の少ない Ponatinib で阻害されることが報告されているため、関与の可能性は低いと考えられる。次に Dasatinib の透過性亢進および細胞形態変化に cAMP が影響を与えるかを観察することとした。その結果、cAMP シグナルの活性化により Dasatinib による透過性亢進および細胞形態変化は抑制されることが示された。これにより、Dasatinib の胸水発症には cAMP が直接的または間接的に関与し、cAMP シグナル経路を活性化することにより胸水発症を予防できる可能性が示された。

本研究で得られた知見が CML 薬物治療の効果および安全性のさらなる向上に貢献できることを期待する。