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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13967
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/94378
Type	doctoral thesis
File Information	Tsuyoshi_AOYAMA.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文

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

北海道大学大学院生命科学院

臨床薬学専攻

薬物動態解析学研究室

青山　剛

2020 年 3 月

目次

略語表 1
序論 3
第一章　TKI の持続的細胞増殖抑制効果 5
第一節　緒言 5
第二節　実験材料と実験方法 6
第一項　実験材料 6
1)　使用薬物 6
2)　使用機器 6
3)　使用細胞 7
第二項　細胞培養法 7
第三項　TKI 長時間曝露実験 7
第四項　hMDR-1 導入 K562 細胞の P-gp 輸送機能確認 8
第五項　TKI 一時的曝露実験 8
第六項　WST-8 assay 9
第七項　TKI 曝露後の細胞内蓄積量の評価 9
第八項　統計解析 10
第三節　実験結果 11
第一項　TKI 長時間曝露後の細胞生存率 11
第二項　TKI 一時的曝露による持続細胞増殖抑制効果 13
1)　TKI 一時的曝露による持続的細胞増殖抑制効果 13
2)　Imatinib の持続的細胞増殖抑制効果の時間依存性 15
第三項　第二世代 TKI の持続的細胞増殖抑制効果に対する hMDR-1 の影響 17
1)　hMDR-1 導入 K562 細胞の P-gp 機能確認 17
2)　Nilotinib および Dasatinib の持続的細胞増殖抑制効果に与える P-gp の影響 18
第四項　TKI の細胞内蓄積量評価 20
1)　第二世代 TKI の短時間曝露後細胞内蓄積量に及ぼす P-gp 発現の影響 20
2)　Imatinib 曝露時間による細胞内蓄積量 22
第四節 考察 23
第五節　小括 26

第二章　Dasatinib による胸水発症メカニズムの解明 27
第一節　緒言 27
第二節　実験材料と実験方法 29
第一項　実験材料 29
1)　使用薬物 29
2)　使用機器 30
第二項　細胞培養法 31
1)　HUVEC の培養 31
2)　ARPE-19 細胞の培養 31
第三項　ヒト血管内皮細胞および正常組織上皮細胞への TKI 長時間曝露 31
第四項　WST-8 assay による細胞生存率の測定 31
第五項　Western blot による TKI 曝露後細胞接着タンパク質 VE-cadherin 発現確認 32
1)　HUVEC からの総タンパク質抽出 32
2)　SDS-PAGE 32
3)　PVDF 膜への転写 32
4)　一次抗体反応、二次抗体反応および化学発光検出 32
第六項　TKI および透過性制御キナーゼ阻害剤による細胞形態変化の観察 33
1)　HUVEC の膜および核染色 33
2)　薬物曝露および蛍光観察 33
第七項　血管透過性アッセイ 34
1)　HUVEC の Transwell®への培養 34
2)　TEER 測定による単層形成確認 34
3)　透過性アッセイ 34
第八項　統計解析 34
第三節　実験結果 35
第一項 TKI 曝露が上皮細胞に与える影響 35
1)　各 TKI 曝露が HUVEC 細胞増殖に与える影響 35
2)　ARPE-19 細胞に対する TKI 曝露が細胞増殖に与える影響 37
第二項　TKI 曝露が HUVEC の VE-cadherin 発現に与える影響 40
第三項　TKI 曝露による細胞形態変化 41
1)　TKI 曝露による細胞形態変化 41
2)　血管透過性制御に関わるキナーゼ阻害剤曝露による細胞形態変化 45
3)　Dasatinib 細胞形態変化の cAMP による抑制 46

第四項　TKI 曝露が血管透過性に与える影響 48
1)　TKI 曝露による血管透過性 48
2)　血管透過性制御因子の阻害による血管透過性の変化 50
3)　cAMP シグナル活性化による Dasatinib 血管透過性亢進の抑制 51
第四節　考察 52
第五節　小括 55
総括 56
引用文献 58
謝辞 66

略語表

本論文中では以下の略語を用いた。

ABC	: ATP-binding cassette
ARPE-19	: Adult Retinal Pigment Epithelial cell line-19
BSA	: Bovine serum albumin
cAMP	: Cyclic adenosine monophosphate
CCyR	: Complete Cytogenetic Response
C_{max}	: Maximum blood concentration
C_{trough}	: Trough blood concentration
CML	: Chronic myeloid leukemia
DMSO	: Dimethyl sulfoxide
EDTA	: Ethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid
Epac	: Exchange protein activated by cyclic AMP
ESI	: Electrospray ionization
FAK	: Focal adhesion kinase
FBS	: Fetal bovine serum
FITC	: Fluorescein isothiocyanate
HEPES	: 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid
HRP	: Horseradish peroxidase
HUVEC	: Human Umbilical Vein Endothelial Cell
IC_{50}	: Inhibitory concentration 50
IFN	: Interferon
IPP	: Inhibitory potential at peak concentration
MDR1	: Multidrug resistance 1
NMⅡ	: Non-muscle myosinⅡ
PAGE	: Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis
P-gp	: P-glycoprotein
Ph	: Philadelphia chromosome
PBS	: Phosphate buffered saline
Rh123	: Rhodamine 123
ROCK	: Rho-associated kinase
S.D.	: Standard deviation

SDS : Sodium dodecyl sulfate
TBS : Tris buffered saline
TDM : Therapeutic drug monitoring
Tie-2 : Tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains
TKI : Tyrosine kinase inhibitor
Tris : Tris(hydroxymethyl)aminomethane
UPLC-MS/MS : Ultra High performance liquid chromatography-Mass spectrometry/Mass spectrometry
UV : Ultraviolet
VAE : Vascular adverse event
VEGFR : Vascular endothelial growth factor receptor
WST-8 : 2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt

序論

慢性骨髄性白血病(Chronic myeloid leukemia：CML)は、多能性幹細胞の腫瘍化により主に好中球などが無秩序に増殖し芽球を形成する血液がんの一種であり、その多くの症例にはフィラデルフィア染色体(Philadelphia chromosome：Ph)という異常染色体が観察される。[1, 2] その発症メカニズムとして、9 番と 22 番の染色体の相互転座によって生じる Ph が起点となり、その最終生成物である 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ことが報告されている。[3]

従来の CML 薬物治療は、IFN-α 単独または化学療法との併用が主流であり、奏効率は一定の水準を示すが、投与後の副作用により長期の治療継続が困難であった。しかし、近年、BCR-ABL Tyrosine kinase inhibitor(TKI)である Imatinib が登場し、その治療効果だけでなく、安全性も飛躍的に上昇した。[4, 5]

現在、わが国では BCR-ABL TKI が CML 薬物治療のファーストラインとして使用されている。Imatinib をはじめとする TKI により、CML 薬物治療の効果および安全性が飛躍的に向上したが、その治療効果には個体間変動が報告されている。[5, 6] 治療効果の個体間変動要因には、血中濃度、有害事象やコンプライアンスなどが挙げられる。実際に、先行研究おいて、Imatinib ではコンプラインスと治療効果が相関するということが報告されている。[7, 8] また、Imatinib は C_{trough}>1,000 ng/mL と効果が相関性を示すことが報告されており、血中濃度を一定に維持することが必要な TDM の対象薬剤である。[5, 6]

さらに、薬物治療により一定期間効果が持続した症例に対し、Imatinib 服用中止による治療効果の維持の可否を検討している臨床試験も実施されている。[9-11] しかし、これら臨床試験は、薬物治療により一定期間効果の得られた症例において、その治療効果が持続するという理論に基づいているが、現状では被験者の多くが治療を再開しているため、現在の標準治療は治療中止という手法ではなく、薬剤を毎日服用することで治療効果を維持することが一般的である。[9, 11] 治療中止による効果の維持は現状では難しいことが示されているが、一定の効果が得られた後で投与量の減量または間欠投与などにより治療効果を維持できるかは検討されていない。[9, 11, 12]そこで、TKI の投与中止による効果の維持ではなく、間欠投与により TKI の細胞増殖抑制効果がどの程度維持されるかを確認することが重要であると考えた。

TKI による細胞増殖抑制効果には、細胞内薬物濃度が重要である。TKI は様々な薬物耐性の原因でもある Multidrug resistance-1(MDR-1;P-gp)の基質であり、先行研究では MDR-1 過剰発現と治療効果との関係についても報告されている。[13-17] そのため、TKI の治療耐性の原因である MDR-1 が間欠投与による治療効果の維持に影響を与える可能性も考慮する必要がある。そこで、TKI の治療効

果に関する検討では、ヒト CML 由来である K562 細胞に対し TKI を短時間曝露させ、薬物洗浄除去後に TKI の細胞増殖抑制効果が持続するかを検討した。

さらに、治療効果に影響を与える因子として、TKI による胸水や肺動脈高血圧をはじめとする Vascular adverse event(VAE)があり、治療中断の主要因でもあるため、患者に最適な治療効果をもたらす為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 発症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 はその治療標的分子である 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 Nilotinib や Dasatinib では治療標的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 VAE が生じている可能性が高いと考えられる。[18-20)]

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 を強く阻害する薬物であるため、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。[21, 22)]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、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、その症例のほとんどが以前に Dasatinib を服用した患者であるため、胸水の発症が Dasatinib に強く依存する VAE であることが考えられる。[23, 24)]

そこで本研究では、Dasatinib による胸水発症のメカニズムには Src 以外のチロシンキナーゼやその他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することとした。

第一章では、K562 細胞を使用し、TKI を短時間曝露し、薬物を洗浄除去した後に経時的に細胞生存率を測定し、薬物消失後も細胞増殖抑制効果が持続するかを検討した。

第二章では、ヒト臍帯静脈内皮細胞である HUVEC を使用し、TKI ごとに細胞生存率や血管透過性、およびその関連タンパク質の発現への影響を評価することで、胸水が Dasatinib で有意に生じている原因を究明することとした。

第一章　TKI の持続的細胞増殖抑制効果[25)]

第一節　緒言

TKI の細胞増殖抑制効果を検討する際には長時間曝露した場合の細胞生存率を評価することが一般的である。[13, 14, 26)]しかし、臨床条件を考えた場合に高濃度が一定して長時間持続することはなく、これまで報告されている実験系は実際の状況からは乖離していると言える。たとえば、CML 薬物治療のファーストラインの一つである Dasatinib はその半減期が 3 時間程度と短いため、長時間高濃度で血中に維持されることはない。それにもかかわらず、Dasatinib は Imatinib よりも高い治療効果を持つことが報告されている。[27-29)]

そこで、体内から薬物が消失した場合においても、一定時間は細胞増殖抑制効果が持続するのではないかと考えた。また、近年では TKI－STOP 試験のように一定の効果が得られた場合には治療を中止し、効果が持続するかどうかを検討する臨床試験が行われている。[9-11)]しかし、これら臨床試験では、被験者の多くが再燃し、治療を再開している。これらは治療中止期間を設けることで、服薬による副作用発症リスクは軽減するが、最終的に再燃するリスクがあるため、標準治療化は難しいことを示している。そこで、服薬中止という極端な手法ではなく、間欠投与や投与量減量といった手法で治療効果を維持できるのではないかと考えた。

そこで本章では、TKI が体内から消失した場合、その細胞増殖抑制作用がどの程度持続するかを確認するために、CML 由来細胞である K562 に TKI を一時的に曝露し、その細胞増殖抑制効果が持続するかを検討した。

第二節　実験材料と実験方法

第一項　実験材料

1)　使用薬物

Acetonitrile (LC/MS 用)	Kanto Chemical
Ammonium formate	FUJIFILM Wako pure chemical
Benzylpenicillin potassium	FUJIFILM Wako pure chemical
BSA	Sigma-Aldrich
1-Butanol	FUJIFILM Wako pure chemical
Calcium chloride dehydrate	FUJIFILM Wako pure chemical
Cell Counting Kit-8	DOJINDO
Dasatinib	Ark pharm
DMSO	FUJIFILM Wako pure chemical
Ethyl acetate	FUJIFILM Wako pure chemical
FBS	Biosera
Imatinib mesylate	Ark pharm
Nilotinib	Ark pharm
Potassium chloride	Kanto Chemical
Potassium dihydrogenphosphate	FUJIFILM Wako pure chemical
RPMI-1640 medium	Sigma-Aldrich
Sodium chloride	FUJIFILM Wako pure chemical
Streptomycin	FUJIFILM Wako pure chemical
Tris	Kanto Chemical
Methanol (LC/MS 用)	Kanto Chemical
NaOH (1N)	Kanto Chemical

上記以外の試薬は市販の特級品もしくは生化学用のものを使用した。

2)　使用機器

遠心機

Himac CF 15RX	HITACHI
Himac CR22	HITACHI
KUBOTA 5800	KUBOTA

マイクロプレートリーダー

Infinite M200	TECAN

Cold trap	
UT-2000	TOKYO RIKAKIKAI
Evaporator	
CVE-3110	TOKYO RIKAKIKAI
UHPLC-MS/MS system	
ACQUITY UPLC™	Waters
Quaternary solvent manager	Waters
Sample Manager-FTN	Waters
Xevo TQ-S	Waters
Vacuum pump	
DA-40S	ULVAC

3) 使用細胞

ヒト CML 由来である K562 細胞は理化学研究所より購入した。また、レトロウイルス感染法にて P-gp をコードする MDR-1 遺伝子を安定発現させた hMDR-1 導入 K562 細胞は鹿児島大学 古川龍彦教授ならびに慶應義塾大学 杉本芳一教授より提供していただいたものを使用した。[30)]

第二項　細胞培養法

1) K562 および hMDR-1 導入 K562 細胞の培養

K562 細胞および hMDR-1 導入 K562 細胞は非働化した FBS を 10%、ペニシリンを 100 IU/mL、ストレプトマイシンを 100 μg/mL 添加した RPMI-1640 medium を培養液とした。培養は CO_2 インキュベーター内で、37℃、5% CO_2 条件下で実施した。培養液交換は 2 日間おきに実施し、播種後 3-5 日目で継代した。

第三項　TKI 長時間曝露実験

細胞懸濁液を 2.0×10^5 cells/mL に調製し、96 well 平底マイクロプレートに 50 μL/well ずつ播種した。さらに、培養液 48 μL を添加した後、各薬物の終濃度に合わせて調製した薬液を 2 μL/well ずつ添加した。薬液添加後、CO_2 インキュベーター内で 24、48、72、96 hr 曝露し、第六項 WST-8 assay を実施した。

第四項　hMDR-1 導入 K562 細胞の P-gp 輸送機能確認

野生型 K562,MDR1 導入 K562 細胞を回収し、95×g, 3 min, 4℃で遠心後培養液を吸引除去し、Transport buffer (25 mM HEPES、140 mM NaCl、5.4 mM KCl、1.8 mM $CaCl_2$、0.8 mM $MgSO_4$、5 mM Glucose at pH 7.5) を用いて 2 回洗浄した。

細胞懸濁液(1.0×10^7 cells/mL)を 200 μL ずつ分注して 37℃で 15 min インキュベートした。Rh123 の終濃度(5 または 10 μM)に合わせて調製した薬液を 200 μL 添加し、37℃で 1 hr インキュベートした。氷冷した Transport buffer を加え、95×g、3 min、4℃で遠心して吸引除去後、同様の操作を 2 回行い洗浄した。0.1 N NaOH を 200 μL 加えてよく懸濁し、この懸濁液 100 μL を 96 穴プレートに加え、励起波長 488 nm、測定波長 530 nm としてマイクロプレートリーダーで蛍光強度を測定した。Rh123 取り込み量はタンパク質量で補正した。サンプル中のタンパク質定量は Lowry 法に準拠し、BSA を標準タンパク質として行った。Transport buffer の組成を Table 1 に、Reagent mix の組成を Table 2 に示す。

Table 1　Transport buffer の組成

組成	濃度
HEPES	25 mM
NaCl	140 mM
KCl	5.4 mM
$CaCl_2$	1.8 mM
$MgSO_4$	0.8 mM
Glucose	5 mM
pH 7.5 with Tris	

Table 2 Reagent mix の組成

成分	比
2% $NaCO_3$	100
2% $K_2C_4H_4O_6$	1
2% $CuSO_4$	1

第五項　TKI 一時的曝露実験

上記第三項の方法で 96 well 平底マイクロプレートリーダーに細胞を播種した後、各 TKI を 0.5 hr 曝露させた。各 well 中の溶液 100 μL を全て回収し、新鮮培養液 1,900-2,000 μL を添加し、95×g、4℃、5 min 遠心分離した。遠心分離後、その上清 1,900-2,050 μL を除去し、これを洗浄の一工程とした。第三項で求めた細胞増殖に影響を与えない曝露濃度以下になるように洗浄を繰り返し、その後の細胞を再び 96 well 平底マイクロプレートに播種し、CO_2 インキュベーター内で 24、48、72、96 hr 培養後、第六項 WST-8 assay を実施した。

第六項　WST-8 assay

第三項および第五項の曝露実験後の細胞生存率を測定するために、WST-8 assay を実施した。まず、曝露および培養一定時間後、各 Well に Cell counting Kit(WST-8)溶液を 10 μL ずつ添加し、3 hr 発色させた。反応後、マイクロプレートリーダーにて波長 450 nm における吸光度を測定した。細胞生存率は以下の式で算出し、Blank は培養液のみの吸光度を示し、Control は薬物無含有の溶液を添加した細胞における吸光度を示している。

$$細胞生存率(\%)=\frac{A\,(TKI)-A(Blank)}{A(Control)-A(Blank)}\times 100$$

A：absorbance

第七項　TKI 曝露後の細胞内蓄積量の評価

K562 細胞および hMDR-1 導入 K562 細胞に各 TKI を 0.5 または 24 hr 曝露した後の薬物細胞内蓄積量を LC-MS/MS 法にて定量した。測定する細胞破砕サンプルは第五項で実施した洗浄除去方法で洗浄し、その際タンパク質等の混入を避けるために培養液ではなく PBS を用いた。洗浄後、リン酸 Buffer(10 mM Na_2HPO_4・12 H_2O、10 mM KH_2PO_4、pH 7.4)に細胞を懸濁し、-80℃で凍結破砕した。

測定サンプルの調製は Scheme 1 に示した方法で実施し、各 TKI の UPLC および MS 測定条件は Table 3 および 4 に示す。

測定した TKI 細胞内蓄積量は Lowry 法により求めたサンプル中タンパク質量で補正し、ng/ mg protein として算出した。

Scheme 1.測定サンプル調製法

測定サンプル 100 μL or 1/10 希釈測定サンプル 100 μL	
↓	Added 10 μL internal standard in methanol (imatinib or dasatinib)
↓	Added 10 μL standard sample in methanol
↓	Added 30 μL 2 M Tris
5 sec Voltexed	
↓	Added 1.5 mL ethyl acetate:butanol＝4：1
↓	Added 100 μL water
30 sec Voltexed	
↓	Centrifuged 21,500×g (4℃、20 min)
↓	Picked up 1.3 mL suparnatant
supernatant	
↓	Evaporated 1 hr at 45℃、

↓	Added mobile phase
30 sec Vortexed	
To LC/MS	

Table 3 UPLC 測定条件

Column	ACQUITY UPLC® BEH C18 1.7 μm (2.1×100 nm) [Waters]
Mobile phase	Acetnitrile：methanol：0.5% Ammonium formate[pH 2.5] (20：25：55)
Wave length	267 nm
Flow rate	0.4 mL/min
Colum temperature	40℃
Injection volume	10.0 μL

Table 4 TKI の MS 条件

	Dasatinib	Imatinib	Nilotinib
ESI	Positive mode	Positive mode	Positive mode
Precursor ion	490.06 m/z	495.0 m/z	530.15 m/z
Production (Main)	402.6 m/z	394.0 m/z	261.10 m/z
Production (Sub)	231.91 m/z	378.0 m/z	289.09 m/z
Cone voltage	30 V	30 V	50 V
Capillary voltage	1 V	1 V	2.5 V
Collision energy	28 V	30 V	40 V

第八項　統計解析

統計学的有意差の検定には、Welch の t 検定を実施し、$p<0.05$ を統計学的有意であるとした。

第三節　実験結果

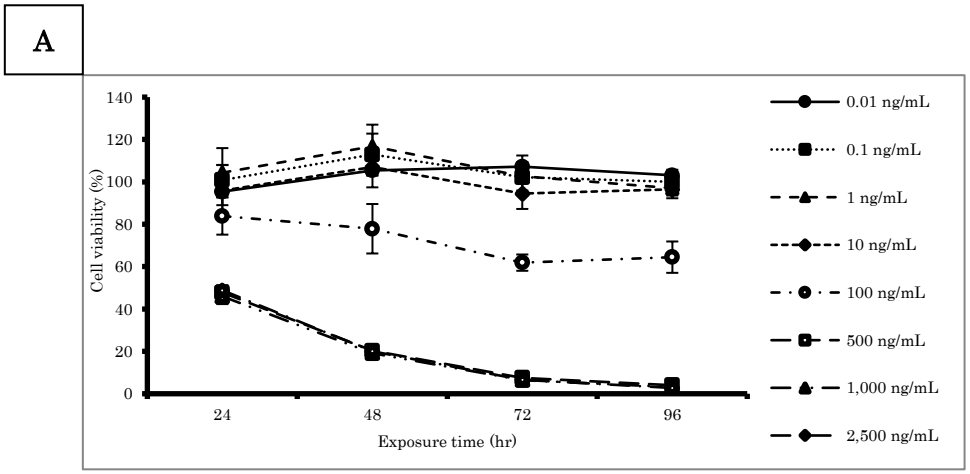
第一項　TKI 長時間曝露後の細胞生存率

K562 細胞に対する各 TKI の細胞増殖抑制効果を発現する濃度と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 を長時間曝露した後の細胞生存率を評価した。

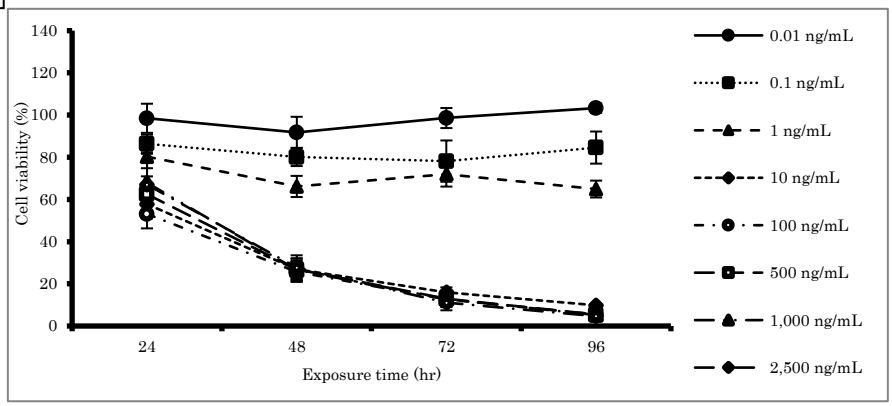
Imatinib は 100 ng/mL で細胞増殖を抑制した一方で、10 ng/mL 以下の低濃度では細胞増殖に影響を与えなかった(Figure 1A)。100 ng/mL 以上の濃度の細胞増殖抑制効果は 24 hr から 96 hr まで維持され、効果の時間依存性も確認された。

第二世代 TKI の Nilotinib および Dasatinib は Imatinib と比較してより低濃度で細胞増殖を抑制し(Figure 1B Nilotinib：10 ng/mL、Figure 1C Dasatinib：1 ng/mL)、両者の細胞増殖に影響を与えない濃度もまた、Imatinib と比較してより低濃度であった(≦0.01 ng/mL)。

これら 3 つの薬物に共通した細胞増殖に影響を与えない濃度は 0.01 ng/mL であったため、第三節第二項で実施する一時的曝露実験で行う洗浄は、残存濃度が本項で求められた濃度になるように実施することとした。



B



C

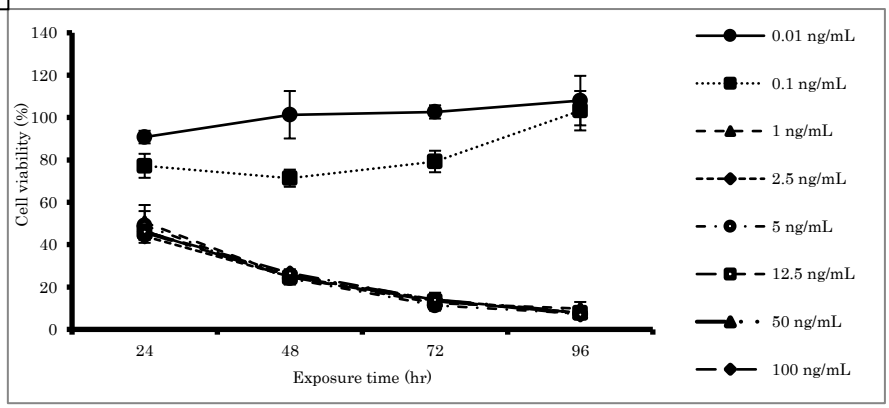


Figure 1 （A）Imatinib、（B）Nilotinib および（C）Dasatinib の K562 細胞への長時間曝露後の細胞生存率

K562 細胞に上記の濃度で Imatinib、Nilotinib および Dasatinib を曝露し、 K-562 細胞に対する TKI の細胞増殖抑制効果を、TKI 曝露 24、48、72 および 96 hr 後に WST-8 assay により測定した（n=6, mean±S.D.）

第二項　TKI 一時的曝露による持続細胞増殖抑制効果

1)　TKI 一時的曝露による持続的細胞増殖抑制効果

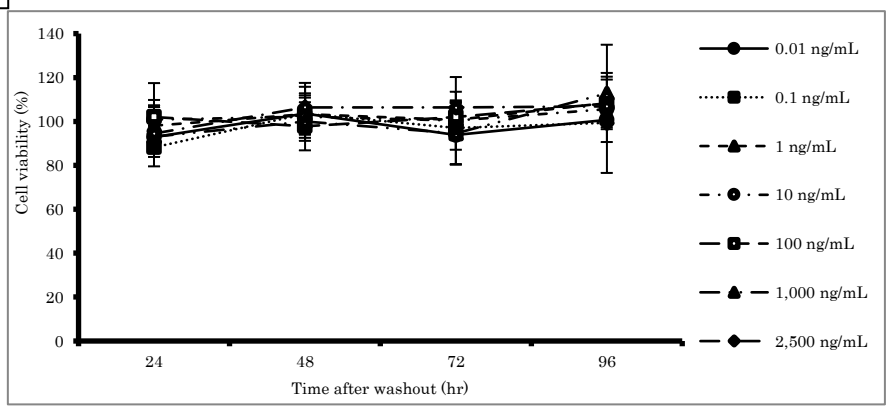
K562 細胞に各 TKI を 0.5 hr 曝露させ、第三節第一項で確認された残存濃度まで薬物を洗浄除去し、再度細胞を培養した場合において、その細胞増殖抑制効果が維持されるかを検討した。

Imatinib では 0.01-2,500 ng/mL を 0.5 hr の一時的曝露後に培養した場合、細胞生存率に曝露濃度依存性は認められなかった(Figure 2A)。

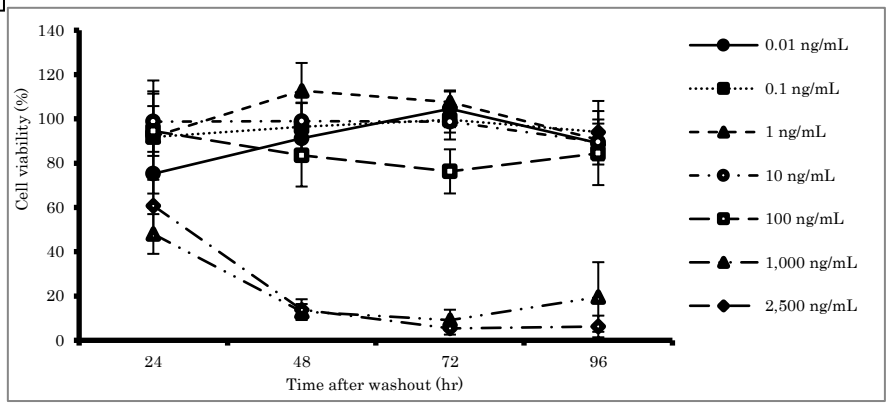
Nilotinib では曝露濃度 0.01-10 ng/mL の範囲では細胞生存率 100%付近を示したが、1,000 ng/mL 以上の高濃度では洗浄除去後にも関わらず、長時間曝露で観察された細胞増殖抑制効果と同等の結果が示された(Figure 2B)。その効果は観察した全ての培養時点で維持された。

Dasatinib は 0.01-12.5 ng/mL の曝露濃度範囲では経時的な細胞生存率の減少は観察されなかった。曝露濃度 50 ng/mL では洗浄除去後 48 または 72 hr までは細胞生存率に減少傾向が観察されたが、それ以降では細胞増殖が観察された。また、さらに高濃度である 100 ng/mL 曝露では、薬物洗浄除去後 96 hr まで細胞生存率の上昇は認められなかった。したがって、Dasatinib は高濃度で一時的に曝露された場合は持続的細胞増殖抑制効果を示し、その効果は 48-96 hr までは維持されることが示された(Figure 2C)。

A



B



C

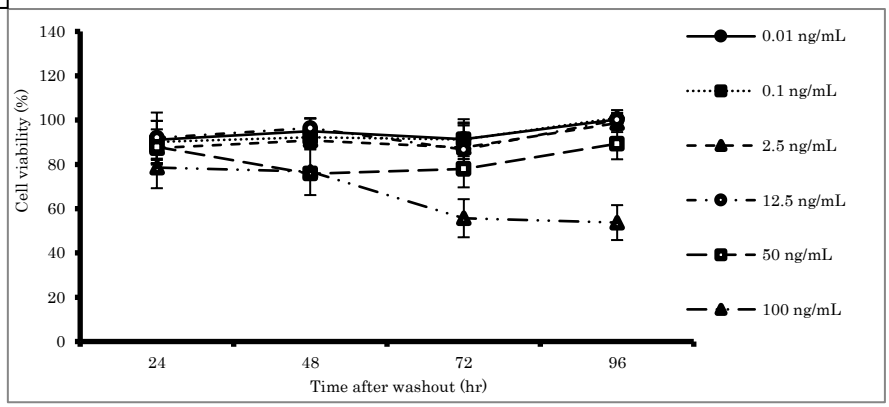


Figure 2（A）Imatinib、（B）Nilotinib、（C）Dasatinib 一時的曝露後の持続的細胞増殖抑制効果

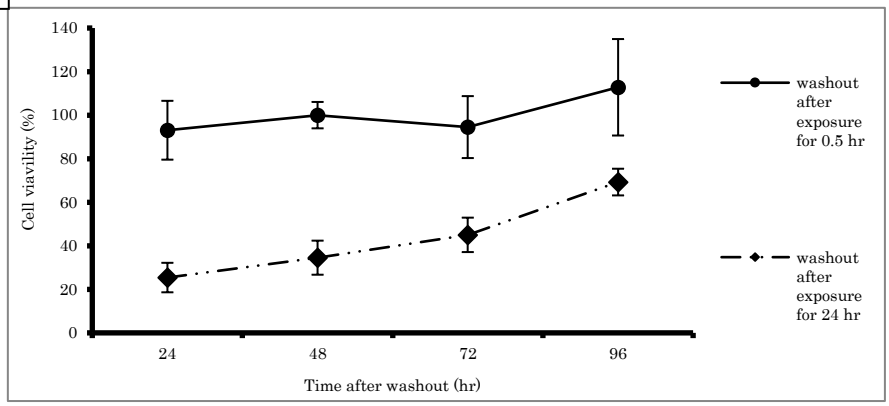
TKI を K562 細胞に 0.5 hr 曝露後、細胞懸濁液を回収し、新鮮培養液で洗浄除去した。 薬物洗浄除去後、細胞懸濁液を 96 well 平底マイクロプレートに播種し、24、48、72 および 96 hr 後に WST-8 assay を実施し、細胞生存率を測定した。(n=6, mean±S.D.)

2) Imatinib の持続的細胞増殖抑制効果の時間依存性

第三節第二項 1)において、Imatinib は他の TKI と異なり、検討した全ての濃度において、持続的細胞増殖抑制効果が確認されなかった(Figure 2A)。Imatinib は標準治療において、C_{trough}>1,000 ng/mL に維持することが推奨されており、その効果が曝露濃度よりも曝露時間の方が重要であると考えられる。そこで、Imatinib を高濃度で 24 hr 曝露し、薬物を洗浄除去後に持続的細胞増殖抑制効果が観察されるかを検討した。

Imatinib を長時間曝露し、洗浄除去した場合、短時間曝露では観察されなかった持続的細胞増殖抑制効果が検討した全ての濃度で培養 48 hr まで観察された(Figure 3A,B)。しかし、培養 72 hr 以降では細胞生存率の明らかな上昇が観察された。これらの結果より、Imatinib もまた持続的細胞増殖抑制効果を示すものの、その効果は他の TKI よりも弱いことが示唆された。

A



B

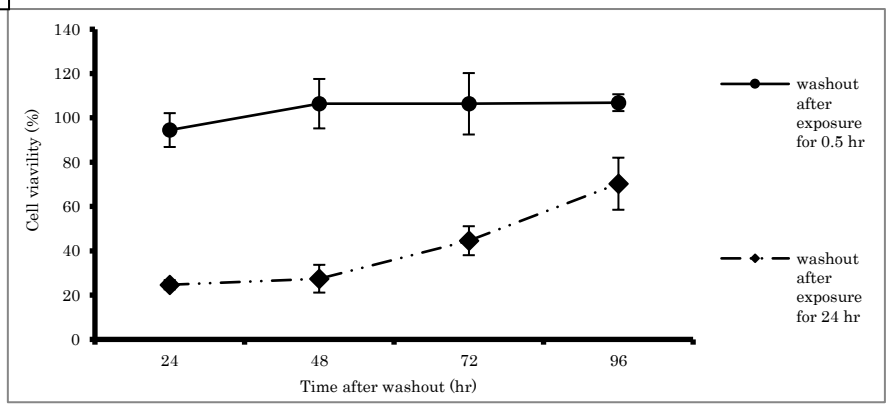


Figure 3　Imatinib（A）1,000 ng / mL および（B）2,500 ng / mL による持続的細胞増殖抑制効果の曝露時間依存性

TKI を 0.5 または 24 hr 曝露後、細胞懸濁液を回収し、新鮮培養液で洗浄した。 薬物洗浄除去後、細胞懸濁液を 96 well 平底マイクロプレートに播種し、24、48、72 および 96 hr 後に WST-8 assay を実施し、細胞生存率を測定した。（n=6, mean±S.D.）

第三項　第二世代 TKI の持続的細胞増殖抑制効果に対する hMDR-1 の影響

1)　hMDR-1 導入 K562 細胞の P-gp 機能確認

TKI の細胞内蓄積量に及ぼす P-gp 発現の影響を検討する前に、使用する細胞の P-gp 輸送活性を確認することとした。

P-gp の基質である Rh123 細胞内蓄積量は、検討した濃度いずれにおいても、hMDR-1 導入 K562 細胞の方が野生型 K562 細胞よりも有意に低下した(Figure 4)。これらの結果より、レトロウイルス感染法によって導入された hMDR-1 導入 K562 細胞 P-gp の輸送活性が野生型よりも高いことが示された。

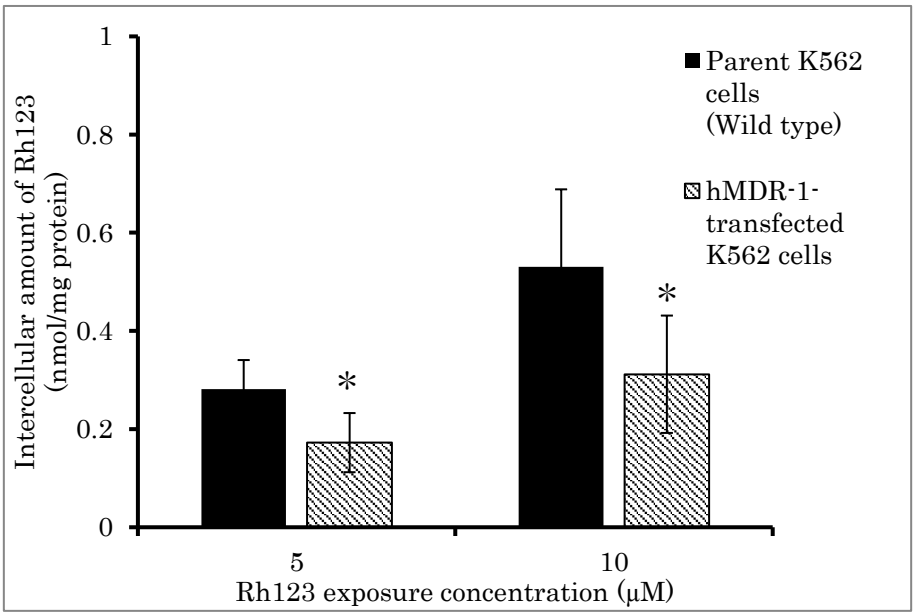


Figure 4　K562 および hMDR-1 導入 K562 細胞の Rh123 細胞内蓄積量による P-gp 輸送機能評価

Rh123 (終濃度 5 または 10 μM)を添加後、細胞懸濁液を 95×g、4℃、3 min 遠心分離し、上清を吸引した。 そして、細胞を Transport buffer（25 mM HEPES、140 mM NaCl、5.4 mM KCl、1.8 mM $CaCl_2$、0.8 mM $MgSO_4$、5 mM グルコース、pH7.5）で洗浄した。 その後、上清を完全に除去し、細胞を 0.1 M NaOH で溶解し、細胞サンプルを獲得した。 そのサンプル中 Rh123 蓄積量を測定するために、マイクロプレートリーダーで Em 488、Ex 530 nm の条件下での蛍光強度を測定した。 Rh123 蓄積量は Lowry 法によって測定したサンプル中タンパク質量で補正した。(n=6, mean±S.D.) *野生型との比較, $p < 0.05$

2) Nilotinib および Dasatinib の持続的細胞増殖抑制効果に与える P-gp の影響

第三節第二項 1)で持続的細胞増殖抑制効果が確認された Nilotinib および Dasatinib において、その効果に対し P-gp が影響を与えるかを検討するため、hMDR-1 導入 K562 細胞を使用して第三節第二項と同様の検討を実施し、野生型群と比較した。

Nilotinib では、1,000 ng/mL 曝露群において、野生型群と hMDR-1 導入細胞群間の細胞生存率に有意な差はなかった(Figure 5A)。

一方、Dasatinib は曝露濃度 50 ng/mL において、培養 48-72 hr までは両群間に有意な差が認められたが、培養 96 hr では両群間に差は認められなかった(Figure 5C)。そして、曝露濃度 100 ng/mL においては、培養 72 hr から 96 hr まで、両群間に有意な差が認められ、培養 96 時間時点での細胞生存率は野生型群で 53.7±7.9%、hMDR-1 導入細胞群で 92.7±6.9%と hMDR-1 導入細胞において大きな上昇が認められた(Figure 5D)。

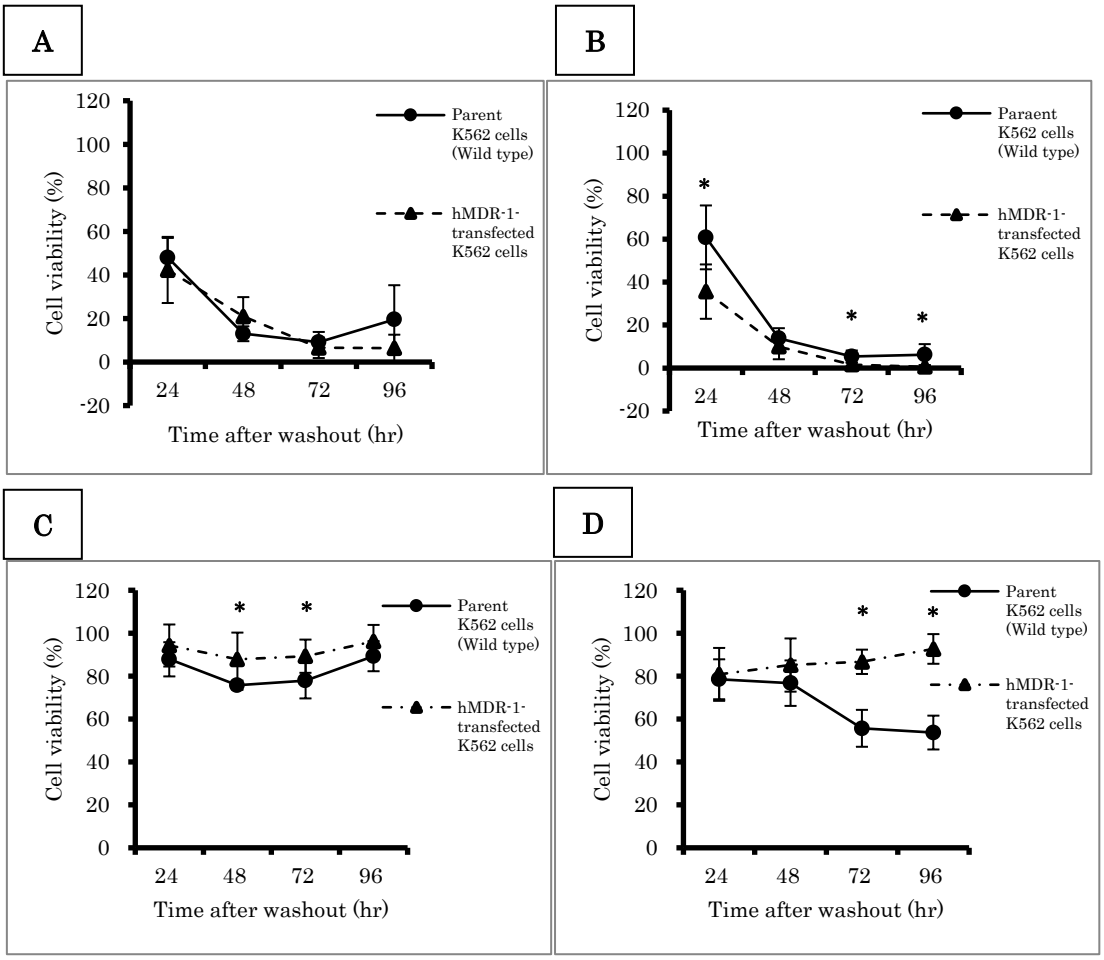


Figure 5 K562 細胞への Nilotinib（A.1,000 ng / mL、B.2,500 ng / mL）および Dasatinib（C.50 ng / mL、D.100 ng / mL）の持続的細胞増殖抑制効果に対する hMDR-1 の寄与

TKI に 0.5 hr 曝露後、各細胞懸濁液を回収し、新鮮培養液で洗浄した。洗浄後、細胞懸濁液を 96 well 平底マイクロプレートに播種し、24、48、72 および 96 hr 後に WST-8 assay により細胞生存率を測定した。(n=6, mean±S.D.)

*野生型との比較, $p < 0.05$

第四項　TKI の細胞内蓄積量評価

1)　第二世代 TKI の短時間曝露後細胞内蓄積量に及ぼす P-gp 発現の影響

薬物洗浄除去後においても細胞増殖抑制効果が観察された濃度を曝露した時の細胞内 Nilotinib および Dasatinib 蓄積量を測定した。

Nilotinib を K562 細胞(野生型)に 0.5 hr 曝露した後の細胞内蓄積量は曝露濃度依存的に増加しており、100 ng/mL 曝露群と比較して 2,500 ng/mL 曝露群では細胞内蓄積量が 15.6 倍に増加した。そして、2,500 ng/mL 曝露群の細胞内蓄積量は 1,000 ng/mL 曝露群と比較して増加し、濃度依存的な細胞内蓄積量の増加が観察された。(Figure 6A)。Dasatinib においても、野生型 K562 細胞内蓄積量は曝露濃度依存的に増加しており、10 ng/mL 曝露群よりも 100 ng/mL 曝露群で 7.1 倍と高かった(Figure 6B)。

一方、野生型と MDR-1 発現細胞の細胞内蓄積量を比較すると Nilotinib は C_{max} 相当濃度 2,500 ng/mL で曝露した場合、MDR-1 発現細胞内蓄積量は野生型の 87.4±19.9%であり、有意な差は認められなかった(Figure 6A)。それに対し、Dasatinib は C_{max} 相当濃度である 100 ng/mL で曝露した場合、hMDR-1 導入細胞群の細胞内蓄積量は野生型群の 38.9±11.7 であり、有意な差が認められた(Figure 6B, $p < 0.05$)。

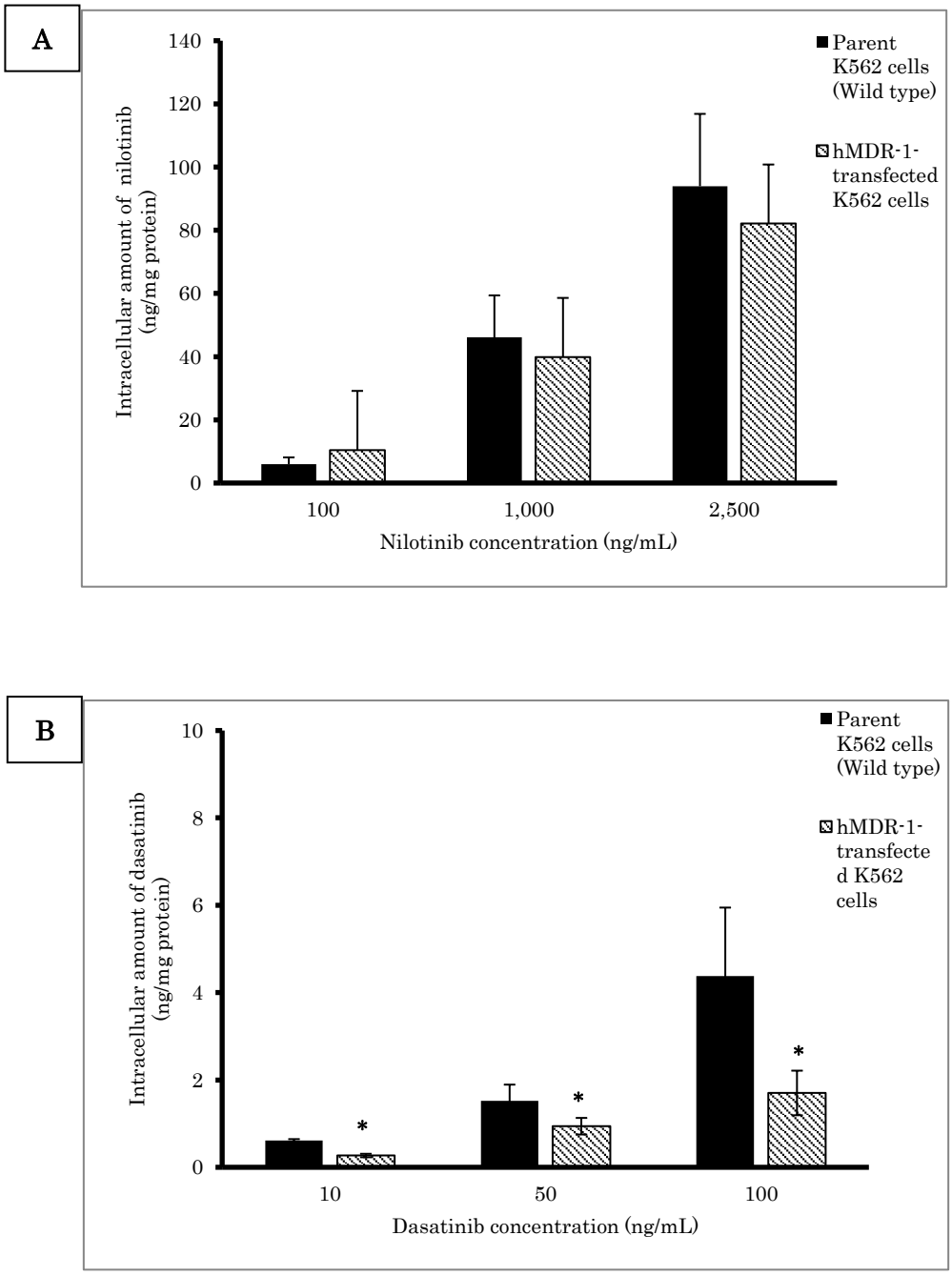


Figure 6　K562 細胞における（A）Nilotinib および（B）Dasatinib の細胞内蓄積に及ぼす hMDR-1 発現の影響

TKI に 0.5 hr 曝露後、各細胞懸濁液を回収し、十分に洗浄した。 その後、細胞懸濁液を-80℃で凍結および破砕し、測定まで細胞破砕サンプルとして凍結保存した。測定は LC / MS / MS 法で実施し、細胞サンプル中の TKI 量を定量した。 取り込み量は、Lowry 法で測定したサンプル中タンパク質量で補正し、ng / mg protein で示した。（n=6, mean±S.D.）

*野生型との比較, $p < 0.05$

2) Imatinib 曝露時間による細胞内蓄積量

第三節第二項 2)において、Imatinib による持続的細胞増殖抑制効果は曝露濃度ではなく曝露時間依存的であることが示された。そこで、Imatinib 細胞内蓄積量の曝露時間依存性から、この効果と細胞内蓄積量との関係を検討した。

Imatinib を長時間曝露した場合の細胞内蓄積量は、短時間曝露した場合と同程度であり(Figure 7)、細胞内蓄積量と曝露時間依存性に直接的な関係性は認められなかった。

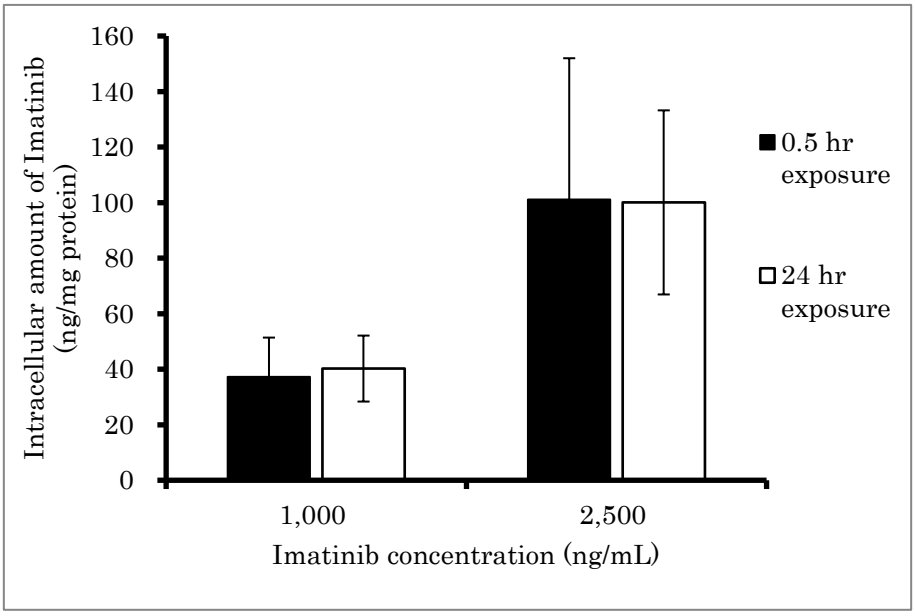


Figure 7　K562 細胞における Imatinib 細胞内蓄積への曝露時間依存性

K562 細胞に Imatinib 1,000 または 2,500 ng / mL を 0.5（黒）または 24 hr（白）曝露後、細胞懸濁液を回収し、十分に洗浄した。測定は LC / MS / MS 法で実施し、細胞サンプル中の Imatinib 量を定量した。 取り込み量は、Lowry 法で測定したサンプル中タンパク質量で補正し、ng / mg protein で示した。

第四節 考察

TKI の登場は CML 治療において、革新的であった。第一世代の TKI である Imaitnib は IFN-α による従来の治療方法よりも、高い効果と安全性を示した。[4-6] 一方、第二世代の Dasatinib や Nilotinib などは、Imatinib よりも BCR-ABL チロシンキナーゼ阻害効果が高く、治療効果において劣らないことが示されている。[27, 31, 32]

これら TKI は治療効果を飛躍的に上昇させたものの、治療効果の維持には毎日服用する必要がある。しかし、現在、一定の治療効果が認められた患者において、服薬を中止するという臨床試験が試みられているが、それら試験では被験者の多くが再発することが確認されている。[9-11] このことから、服用中止による治療効果の維持という試験コンセプト自体に問題があると考え、投与量の減量または間欠投与という方法であれば、現在の治療方法よりも治療効果だけでなく、安全性も向上させることができるのではないかという仮説を立て種々検討した。その結果、本研究により、今回研究対象とした TKI のうち、Imatinib 以外は一時的曝露においても強い細胞増殖抑制効果を持つことが裏付けられた。

Imatinib は現在 CML 治療におけるファーストラインで、TDM において唯一有効血中濃度が設定された BCR-ABL TKI であり、血漿中トラフ濃度が 1,000 ng/mL 以下の場合は治療失敗する例が散見される。[5, 6, 33] さらに、Imatinib はコンプライアンス不良が治療効果低下と相関することも報告されており、この薬物の十分な治療効果を得るためには、薬物血中濃度を治療域に維持する必要がある。[34] 実際、本研究結果において、Imatinib の持続的細胞増殖抑制効果には細胞内蓄積量よりも曝露時間が重要であることが示された(Figures 3A,B)。それに加え、先行研究において、Imatinib は曝露時間が長いほど細胞死を強く誘導するということが報告されている。[35] これらの結果より、Imatinib が持続的細胞増殖抑制効果を示すためには曝露濃度だけでなく、曝露時間も重要であることが示された。

一方、Nilotinib や Dasatinib では、その治療効果と血中濃度の相関性を検討している先行研究はあるが、CML 薬物治療の標準治療となるような結果を得られていないのが現状である。[36, 37] 特に、Dasatinib は他の TKI と比較して半減期が短く、血中濃度を長時間維持できない特性を持つ。しかし、Dasatinib による治療効果は他の TKI に劣らないことが報告されている。[27-29] 先行研究において、Dasatinib が BCR-ABL チロシンキナーゼ以外にも SRC キナーゼファミリーを強く阻害することや免疫調節作用を有することも報告されており、Imatinib や Nilotinib にはないメカニズムが治療効果に影響を及ぼしている可能性がある。[38, 39] 本研究の結果では、Dasatinib を K562 細胞に終濃度 100 ng/mL で曝露し、洗浄除去した後においても、96 hr までは細胞増殖抑制効果が

持続していることを明らかにし、このことは Dasatinib が一定の血中濃度を維持する必要性が低いことを支持している(Figure 2C)。

Vainstein らは、Inhibitory concentration 50 (IC_{50})と C_{max} から算出される Inhibitory potential at peak concentration (IPP)で閾値以上を示す Dasatinib 治療患者が、閾値以下を示す患者よりも Complete Cytogenetic Response (CCyR) 達成率が有意に高いことを報告した。[40] それらの結果は、Dasatinib の治療効果には C_{max} が CCyR と同様に重要であることを示唆した。しかしながら、彼らの研究では、IC_{50} と IPP は、TKI を長時間曝露した結果から算出されており、彼らの研究条件は、臨床条件をよく反映しているとは言えない。一方、CML 細胞に TKI を C_{max} 相当の曝露濃度で短時間曝露するという臨床条件を反映した本研究では、Dasatinib の細胞増殖抑制効果が一時的曝露においても持続することが示された。したがって、本研究の結果は、Vainstein らによって得られた結果である C_{max} 相当の濃度で曝露されることが重要であるということを部分的に支持している。

次に、Imatinib をはじめとする TKI は P-gp の基質であることが報告されているため、P-gp 発現はその治療効果に大きな影響を与えると考えられている。[13-17] 本研究では、終濃度 100 ng/mL の Dasatinib で一時的に曝露した場合において、野生型 K562 細胞群では完全に細胞増殖を抑制しているが、hMDR-1 導入細胞群では細胞増殖を抑制しなかったことを示した(Figure 5D)。一方、高濃度の Nilotinib で一時的に曝露した場合において、強い細胞増殖抑制効果が観察され、その細胞増殖抑制効果は P-gp の影響を受けないことが示唆された(Figure 5A and B)。さらに、Nilotinib および Dasatinib の細胞内蓄積量に及ぼす P-gp の影響を検討した結果、Dasatinib 100 ng/mL を一時的に曝露した後の野生型 K562 細胞の細胞内蓄積量が hMDR-1 導入細胞の 2.6 倍であったが、Nilotinib を曝露した検討では野生型と hMDR-1 導入細胞との間に細胞内蓄積量の差は認められなかった(Figure 6A and B)。この結果は、Imatinib や Dasatinib と比較して、Nilotinib が P-gp に輸送されにくいという報告と一致する。[13, 14, 41, 42] また、今回 Nilotinib は Dasatinib よりも強く長い持続的細胞増殖抑制効果を示した。これは、Nilotinib は Dasatinib よりも半減期が長く P-gp に対しての親和性が低いため、Dasatinib よりも細胞内蓄積量が多いことが要因と考えられる。

今日までの先行研究では、臨床で CML 薬物治療に使用される TKI の薬効に対する ABC トランスポーター(ABCB1,ABCG2)による影響を検討した *in vitro* 研究の報告はあるが、そのほとんどが実際の臨床で観察されている薬物血中濃度または曝露時間を十分に考慮できていない。[13,14,26]本研究では、臨床条件をよく反映させた実験条件で Dasatinib と Nilotinib が一時的曝露後においても持続的細胞増殖抑制効果を示すことを明らかにした。また、P-gp 発現が TKI の細胞

増殖抑制効果にどのように影響するかを検討し、Dasatinib は細胞内蓄積量減少により細胞増殖抑制効果が減弱したが、Nilotinib においてはその現象が観察されなかったことが示された。

結論として、Imatinib は、高濃度で長時間曝露された場合に、薬物消失後も細胞増殖抑制効果が持続し、Nilotinib および Dasatinib は一時的曝露においても一定の細胞内蓄積量であれば薬物消失後も細胞増殖抑制効果が持続することが示された。これらの結果は、Imatinib、Nilotinib、Dasatinib などの TKI の治療効果が、条件さえ満たせば、投与量減量または間欠投与によって維持できることが示唆された。

第五節　小括

第一章では、Dasatinib と Nilotinib が一時的曝露後においても持続的細胞増殖抑制効果を示すことを明らかにした。また、Dasatinib では P-gp による細胞内蓄積量の減少によりその効果が減弱する一方、Nilotinib においては効果の減弱が観察されないことを示した。また、Imatinib は、0.5 hr の一時的曝露では細胞増殖抑制効果を示さなかったが、標準治療において推奨されている C_{trough} 相当の濃度で 24 hr 曝露された場合には、その濃度以下においても効果が持続することが示された。

以上の結果から、Imatinib、Nilotinib、Dasatinib では薬物消失後においても一定時間は効果が持続するため、一定の効果が維持された後の間欠投与や投与量の減量というような治療手法も可能であることが示唆された。

第二章　Dasatinib による胸水発症メカニズムの解明

第一節　緒言

CML の薬物治療では、そのファーストラインに BCR-ABL を標的とする TKI である Imatinib、Nilotinib ならびに Dasatinib が使用されている。[6, 32, 43] それらは、BCR-ABL のチロシンキナーゼ活性を阻害することにより、その治療効果を発揮する。しかし、TKI はこの治療標的以外のキナーゼも阻害するため、それに伴う有害事象を生じることが非常に多い。[23, 28, 44, 45] CML 治療を受ける患者の中には、有害事象によって治療中断または投与量の減量となる症例も多く、これら有害事象の発生機序を明らかにすることは患者に最適な CML 治療を提供する上で必要である。

現在、本邦で CML 治療に使用される TKI には Imatinib を含む 5 つの薬剤が承認されている。それらのうち、Nilotinib、Dasatinib、Ponatinib は治療中断の原因になる VAE を高頻度に発現しており、その主な原因として血管透過性亢進や血管新生の異常が挙げられる。特に Dasatinib は胸水の発症頻度が高く、Nilotinib や Ponatinib は末梢動脈閉塞症の発症率が高いことが報告されている。[46-48] このように TKI 間においても、VAE の発症頻度が異なる。このことは、血管透過性および血管新生に関与するキナーゼへの阻害プロファイルが TKI 間で異なることに起因すると考えられる。[49-52]

血管透過性制御には多くのキナーゼが関与しているが(Figure 8)、その中の Src は Dasatinib、Bosutinib ならびに Ponatinib により強く阻害され、Dasatinib により最も強く阻害される。[21, 22, 53-64]さらに、Ponatinib は VEGFR2 のチロシンキナーゼ活性も強く阻害する。また、Ponatinib は血管透過性の安定化に関与する Tie-2 の阻害活性も高いことが報告されている。[52] 一方、Nilotinib による Src や VEGFR2 などの強い阻害は報告されていないが、血管毒性を示すことが報告されている。[47] これらのことから、Ponatinib による VAE は VEGFR2、Src、Tie-2 の阻害が関与している可能性が高い。また、Dasatinib は Src を阻害することにより、VAE を発症させる可能性が高いが、同じキナーゼ阻害プロファイルをもつ Bosutinib では胸水発症が Dasatinib ほど高くはない。先行研究において、Dasatinib は Src を阻害することにより Rho-associated kinase(ROCK)の活性化を促進し、Non-muscle myosinⅡ(NMⅡ)のリン酸化を促進し、血管透過性を亢進させるという報告がある。[22]しかしながら、この報告では同じく Src を阻害する Bosutinib では血管透過性に変化がないことも報告されているため、Dasatinib の胸水発症頻度が他の TKI に比較して顕著に高いことはこのメカニズムでは十分に説明できないと考える。[22] 以上のことから、Dasatinib の胸水発生メカニズムには別の因子が関与している可能性が考えられる。

そこで、Dasatinib による血管透過性亢進には、これらキナーゼ阻害またはキナーゼ以外の因子が関与している可能性があるため、血管透過性などの評価に用いられる血管内皮細胞である HUVEC を使用して、TKI 曝露による細胞増殖への影響などを検討し、その機序を解明することとした。

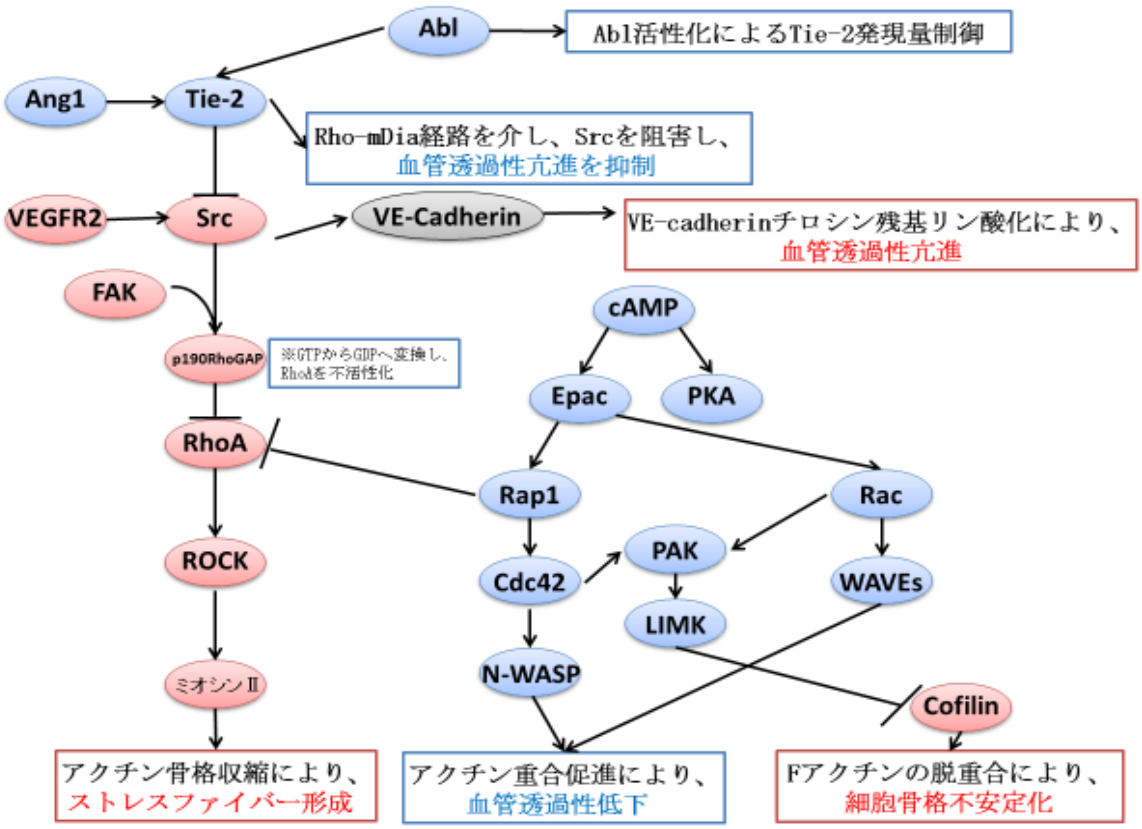


Figure 8 血管透過性制御に関わるシグナル経路 [21, 22, 53-64]

第二節　実験材料と実験方法

第一項　実験材料

1)　使用薬物

第一章 第二節 第一項 1)で述べたものは省略した。

Acrylamide	FUJIFILM Wako pure chemical
β-Actin monoclonal antibody	Santa cruz Biotechnology
Bosutinib	Toront Research Chemicals
CellBrite Orange cytoplasmic Membrane dye solution	BTI Biotim
Complete Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail	Roche
DMEM/Ham,s F12 medium	FUJIFILM Wako pure chemical
EDTA・3Na	DOJINDO
Endothelial Cell Growth Medium 2 kit	TAKARA BIO
Epac inhibitor,ESI-09	Merck Millipore
Ethanol (99.5%)	FUJIFILM Wako pure chemical
Fibronectin	Corning
FITC-dextran	Sigma-Aldlich
Forcal adhesion kinase inhibitor Ⅱ	Merck Millipore
Forskolin	FUJIFILM Wako pure chemical
Glycine	Kanto Chemical
Hochest 33342 solution	DOJINDO
HRP conjugated mouse IgG antibody	SeraCareLife Science
IBMX	Santa cruz Biotechnology
ImmunoStar®Zeta	FUJIFILM Wako pure chemical
Skim milk powder	FUJIFILM Wako pure chemical
Tie2 kinase inhibitor	abcam
TritonX-100	FUJIFILM Wako pure chemical
Trypsin	Invitrogen
Tween20	FUJIFILM Wako pure chemical
VE-cadherin monoclonal anitibody	Santa cruz Biotechnology

その他の試薬は市販の特級または生化学用のものを用いた。

2) 使用機器

第一章 第二節 第一項 2)で述べたものは省略した。

Fluorescence microscope

BZ-9000	KEYENCE

Epthial Volt-Ohm meter

Millicell® ERS2	Millipore

Image analyzer

Image Quant LAS4000	GE healthcare life sciences

Semidry Electroblotter

Panther™ Semidry Electroblotter	Thermo Scientific

HEP-1

第二項　細胞培養法

1) HUVEC の培養

ヒト臍帯静脈内皮細胞由来 HUVEC は Lonza から購入した。培養液は Endothelial Cell Growth Medium kit 2 (100 IU/mL ペニシリンおよび 100 μg/mL ストレプトマイシン含有)を使用し、培養ディッシュ中でコンフルエントになるまで 5% CO_2、37℃条件下で培養した。培養液交換は 1-2 日ごとに実施した。

2) ARPE-19 細胞の培養

ヒト網膜色素上皮細胞由来 ARPE-19 細胞 は Vadivel Ganapathy 博士（ジョージア医科大学）から提供していただいた。培養液は DMEM/Ham’s F-12 medium (10% FBS および 100 IU/mL ペニシリン及び 100 μg/mL ストレプトマイシン含有)を使用し、培養ディッシュ中でコンフルエントになるまで、5% CO_2、37℃条件下で培養した。

第三項　ヒト血管内皮細胞および正常組織上皮細胞への TKI 長時間曝露

細胞懸濁液を 1.0×10^5 cells/mL に調製し、96 well 平底マイクロプレートに 100 μL/well ずつ播種した。プレートに細胞接着後、培養液を吸引し、新鮮培養液 98 μL を添加した。さらに、各薬物の終濃度に合わせて調製した薬液を 2 μL/well ずつ添加した。薬液添加後、CO_2 インキュベーター内で 24、48、72 hr 曝露し、第四項 WST-8 assay を実施した。

第四項　WST-8 assay による細胞生存率の測定

第三項の曝露実験後の細胞生存率を測定するために、WST-8 assay を実施した。まず、曝露一定時間後、各 Well に Cell counting Kit(WST-8)溶液を 10 μL ずつ添加し、2 hr 発色させた。反応後、マイクロプレートリーダーにて波長 450 nm における吸光度を測定した。細胞生存率は以下の式で算出し、Blank は培養液のみの吸光度を示し、Control は薬物無含有の溶液を添加した細胞における吸光度を示している。

$$細胞生存率(\%)=\frac{A\,(TKI)-A(Blank)}{A(Control)-A(Blank)}\times100$$

A:absorbance

第五項　Western blot による TKI 曝露後細胞接着タンパク質 VE-cadherin 発現確認

1) HUVEC からの総タンパク質抽出

1.0×10^5 cell/mL に調製した細胞懸濁液 2 mL を Human Fibronectin コート処理（5 μg/cm^2) 6 well マイクロプレートに播種し、90%コンフルエントになるまで 37℃、5% CO_2 条件下で培養した。その後、培養液を吸引し、新鮮なメディウム 1,960 μL を各 Well に添加した。そして、各薬物の終濃度に合わせて調製した薬液 40 μL を添加し、24 hr 曝露した。

薬液曝露後、薬液含有メディウムをアスピレーターで吸引し、氷冷 PBS 2 mL で各 Well の細胞を洗浄し、この操作を 2 回繰り返した。その後、各 Well に RIPA buffer(50 mM Tris[pH7.4]、150 mM NaCl、 1% Triton-X、1% Sodium deoxycholic acid、0.5 mM EDTA、0.1% SDS、Complete Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail)を添加し、溶解した。RIPA buffer を添加後、氷上で 5 min インキュベートし、その後 15 min ソニケーションを実施した。最後に 21,500×g、4℃、15 min 条件で遠心分離し、その上清を Total Lysate として獲得した。なお、獲得した Total Lysate 中タンパク質量は Lowry 法にて定量した。

2) SDS-PAGE

電気泳動槽にゲル(8% Acrylamide 含有 running gel および 4.8% Acrylamide 含有 stacking gel)をセットし、泳動バッファー（Tris 50 mM、glycine 0.38 M、SDS 0.1%）を注ぎ入れた。そして、タンパク質を 5×サンプルバッファー(0.146 M Tris [pH6.8]、0.1% bromophenol、5% SDS、25% 2-mercaptoethanol、62.5% Glycerol)で混合したサンプル溶液を 95℃、5 min で加熱した後、その溶液をタンパク質として約 10 μg となるようにゲルにアプライし、電気泳動した。

3) PVDF 膜への転写

ゲルを転写バッファー（Tris 25 mM、glycine 0.19 M、methanol 10%）に浸して 5 min 振盪し、セミドライ式転写装置を用いて、90 mA/枚、120 min の条件で PVDF 膜(GE healthcare)に転写した。

4) 一次抗体反応、二次抗体反応および化学発光検出

転写後、PVDF 膜をブロッキング溶液（5% skim milk powder in T-TBS）で 60 min 振盪した後、T-TBS (0.1% Tween 20、20 mM Tris、137 mM NaCl adjusted to pH7.5)で 5 min×4 回振盪洗いし、一次抗体溶液(mouse anti VE-

cadherin monoclonal antibody diluted at 1：1,000 in T-TBS)に浸して 4°C で一晩静置した。その後、一次抗体溶液を捨て、T-TBS で 5 min×4 回振盪洗いし、二次抗体溶液(HRP conjugated goat anti mouse IgG diluted at 1：10,000 in T-TBS)に浸して室温で 60 min 振盪した。抗体溶液を捨て、T-TBS で 5 min×4 回振盪洗いした。その後、ImmunoStar® Zeta（1 液:2 液=1:1）を添加し、ImageQuant LAS4000 を用いて目的のバンドを化学発光にて検出した。また、ローディングコントロールには β-actin を使用した。

第六項　TKI および透過性制御キナーゼ阻害剤による細胞形態変化の観察

1) HUVEC の膜および核染色

1.0×10^5 cell/mL に調製した細胞懸濁液 1 mL を Human Fibronectin コート(5 μg/cm^2)処理 24 well マイクロプレートに播種し、90%コンフルエント後、低血清培養液で血清飢餓処理をした。その後、培養液を吸引後、CellBrite™ Orange Cytoplasmic Membrane Dyes および Hochest33342 溶液を添加し、37℃、5% CO_2 条件下で染色した。その後、染色液を吸引後、培養液で各 well を十分に洗浄し、各 well に新鮮培養液 980 μL を添加し、第二節第六項 2)を実施した。

2) 薬物曝露および蛍光観察

TKI、Epac 阻害剤 ESI-09、FAK 阻害剤 Focal Adhesion Kinase Inhibitor または Tie-2 阻害剤 Tie-2 Kinase inhibitor の終濃度に合わせて調製した薬液 20 μL を添加し、一定時間曝露した。また、cAMP シグナル経路の活性化には Forskolin および IBMX を TKI や各キナーゼ阻害剤を曝露する 20 min 前に添加し、処理した。各曝露時間経過後、HS オールインワン蛍光顕微鏡 BZ-9000 にて細胞形態変化を観察した。

第七項　血管透過性アッセイ

1) HUVEC の Transwell®への培養

Human Fibronectin コート処理 (5 μg/cm^2)Transwell®に各細胞懸濁液を 500 μL/well で Apical unit に播種した(1-2×10^5 cells/well)。なお、Basal unit には新鮮培養液 1,500 μL を添加した。Apical 側に細胞を播種後、単層形成まで培養し、培養中の培養液交換は 1 日おきに実施した。

2) TEER 測定による単層形成確認

Transwell に播種した細胞が単層を形成しているかを確認するために TEER(Ω･cm^2)を Millicell ERS2 を使用し、測定した。

3) 透過性アッセイ

Transwell 上で単層形成後、低血清培養液に交換し、CO_2 インキュベーター内で一定時間プレインキュベートし、血清飢餓処理をした。また、cAMP シグナル経路の活性化には Forskolin および IBMX を TKI や各キナーゼ阻害剤を曝露する 20 min 前に添加し、処理した。その後、各薬物の終濃度に合わせて調製した薬液を添加し、1 hr インキュベートした。薬物曝露後、新鮮培養液で Apical および Basal unit 中の溶液を十分に洗浄除去した。

そして、Apical unit 中の溶液 500 μL から 250 μL を回収し、100 μM の FITC-dextran(平均分子量 3,000-5,000)溶液 250 μL を Apical unit に添加し、1 hr インキュベートした。その後、Basal unit 溶液を回収し、蛍光強度(Em:485 nm,Ex:535 nm)をマイクロプレートリーダーにて測定し単層を通過した FITC-dextran 量を算出した。

第八項　統計解析

統計学的有意差の検出では、2 群間の比較には Welch の t 検定、多重比較には Dunnett 検定を実施し、$p<0.05$ を統計学的有意であるとした。

第三節　実験結果

第一項 TKI 曝露が上皮細胞に与える影響

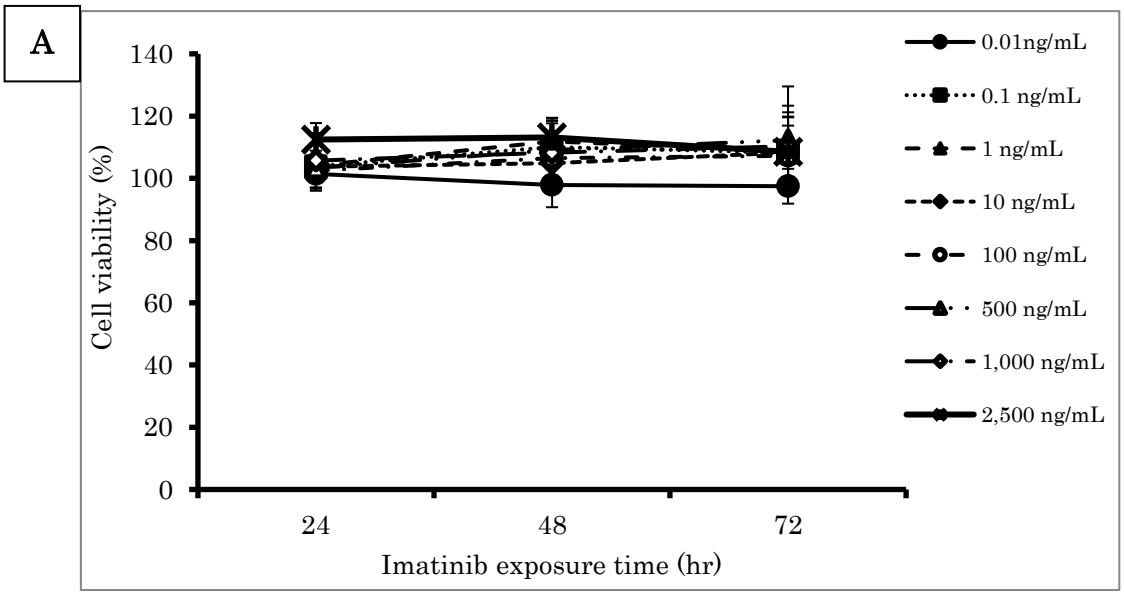
1)　各 TKI 曝露が HUVEC 細胞増殖に与える影響

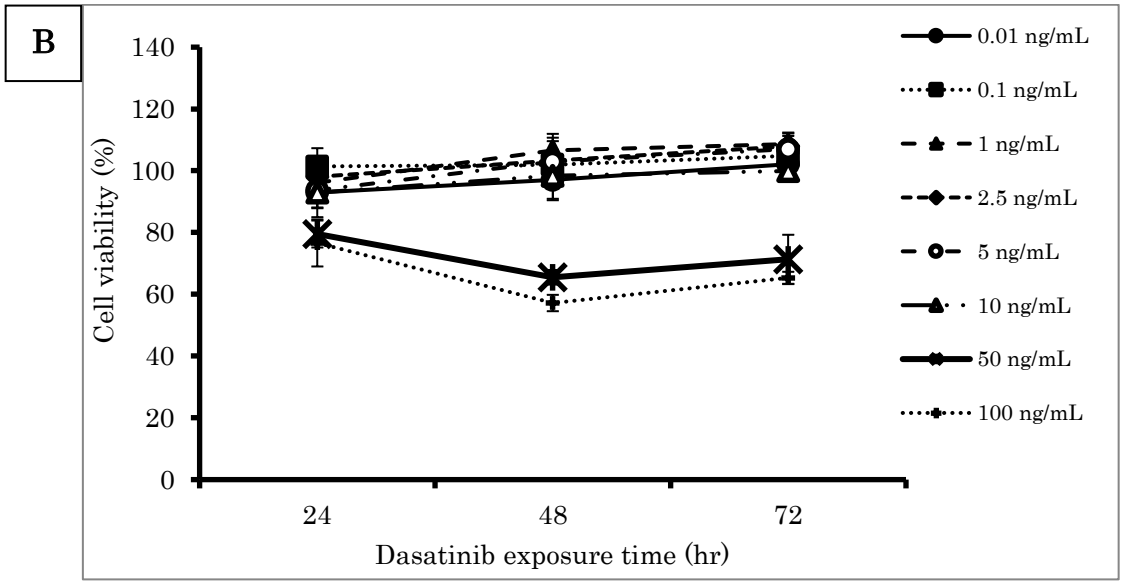
各 TKI による血管内皮細胞の細胞増殖への影響を確認するために、モデル細胞として HUVEC を用い TKI 曝露後の細胞生存率を測定した。

Imatinib は曝露した全ての濃度において、細胞生存率が約 100%を示した(Figure 9A)。推奨治療トラフ濃度である 1,000 ng/mL においても、その細胞生存率が 72 hr 曝露後においても 110.0±13.0%と高いため、Imatinib は血管への大きな影響を与えないことが示唆された。

一方、Dasatinib は 50 ng/mL 以上の高濃度において、細胞生存率の減少が確認された(Figure 9B)。臨床で観察される C_{max} 相当の濃度である 100 ng/mL では、72 hr 曝露後で 65.3±2.0%と低下を示した。この結果より、Dasatinib は血管に大きな影響を与える可能性があると考えられる。

しかし、Bosutinib は、C_{max} 相当である 250 ng/mL 曝露時においても、細胞生存率の大きな変動は認められなかった(Figure 9C)。





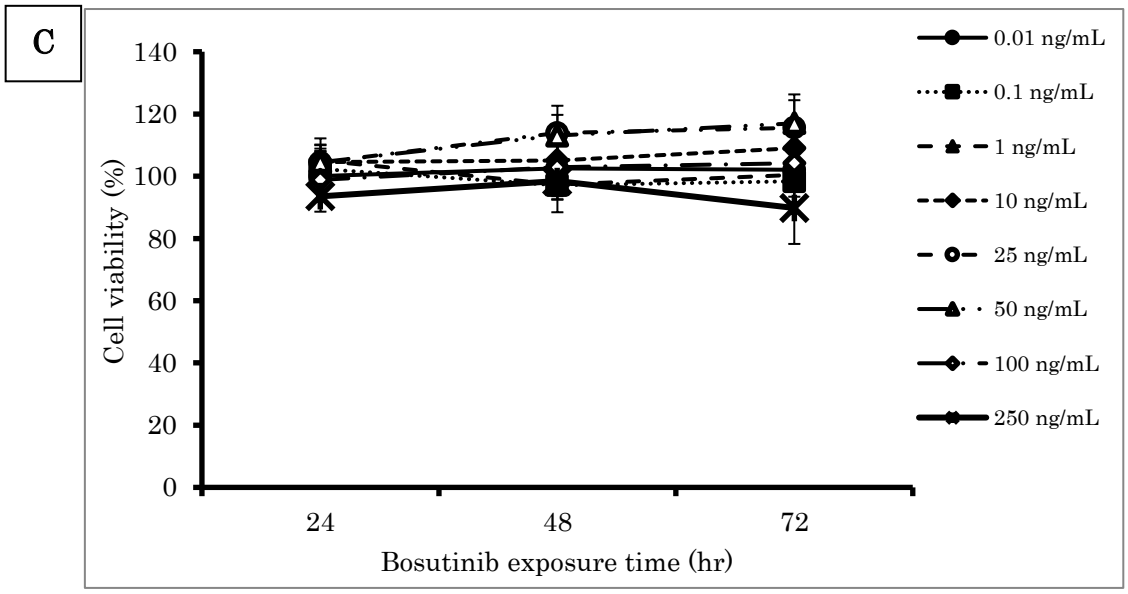


Figure 9 TKI 曝露後血管内皮細胞の細胞生存率

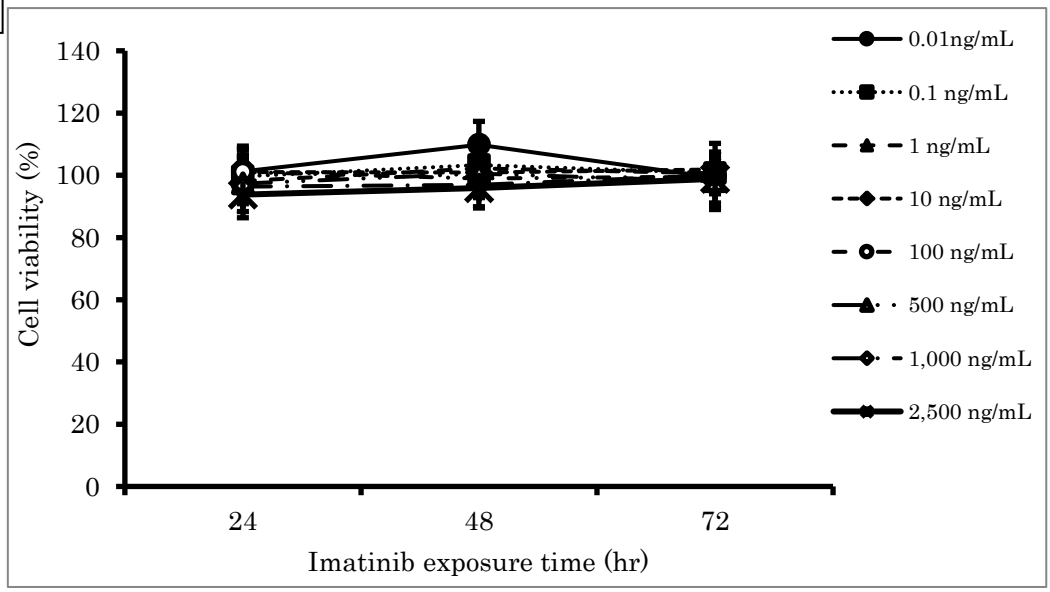
HUVEC に上記の終濃度で(A)Imatinib、(B)Dasatinib ならびに(C)Bosutinib を曝露し、TKI 曝露 24、48 ならびに 72 hr 後に WST-8 assay を実施し、細胞生存率を測定した（n=6, mean±S.D.）

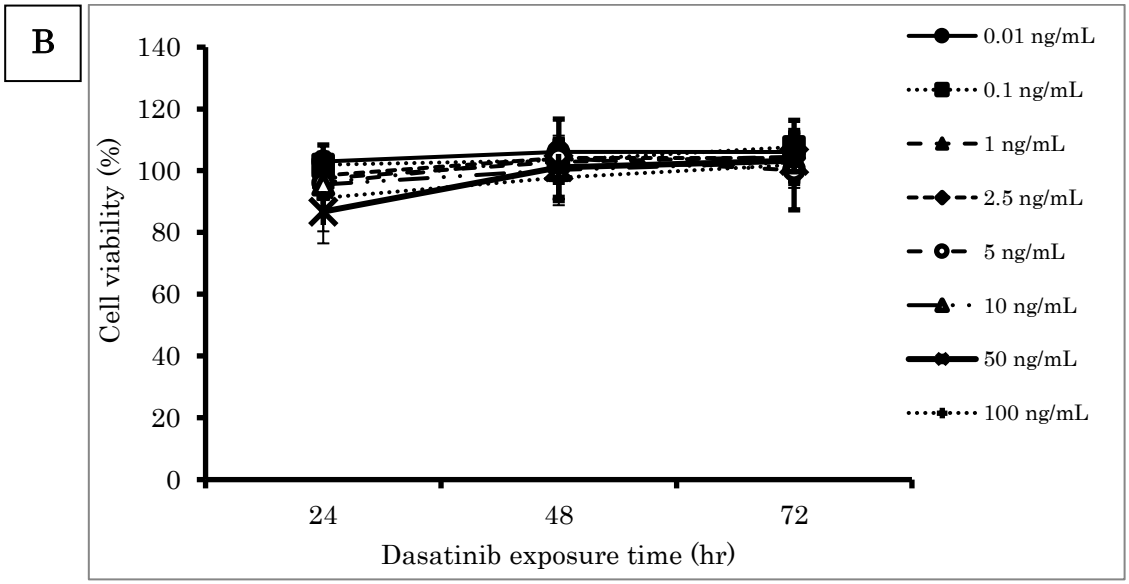
2) ARPE-19 細胞に対する TKI 曝露が細胞増殖に与える影響

TKI の血管に及ぼす影響を認めたが、その影響が血管特異的な影響であるか否かを明らかにするために、ヒト網膜色素上皮細胞由来 ARPE-19 細胞で同様の検討を実施した。

Imatinib 曝露時は HUVEC の結果と同様で、検討した全ての濃度で約 100%の細胞生存率を示した(Figure 10A および 11A)。これに対し、Dasatinib(Figure 10B および 11B)および Bosutinib(Figure 10C および 11C)では、HUVEC の結果とは異なり、検討した全ての濃度で細胞生存率の大きな変動は確認されず、ARPE-19 細胞への影響は観察されなかった。

A





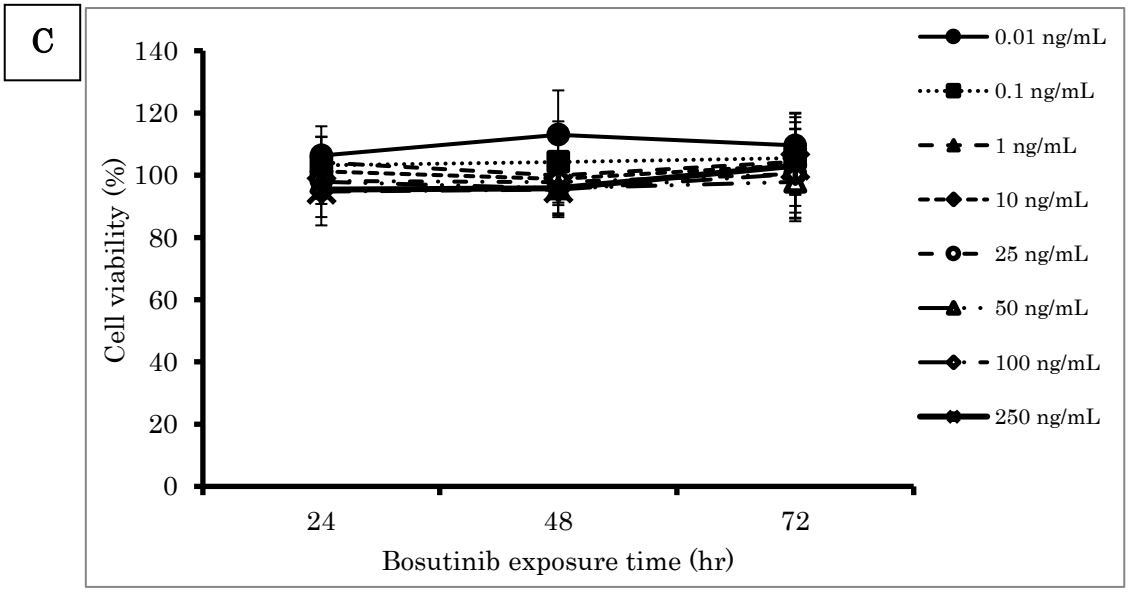


Figure 10 TKI 曝露後 ARPE-19 細胞の細胞生存率

ARPE-19 細胞に上記の終濃度で(A)Imatinib、(B)Dasatinib ならびに(C)Bosutinib を曝露し、TKI 曝露 24、48 ならびに 72 hr 後に WST-8 assay を実施し、細胞生存率を測定した (n=6, mean±S.D.)

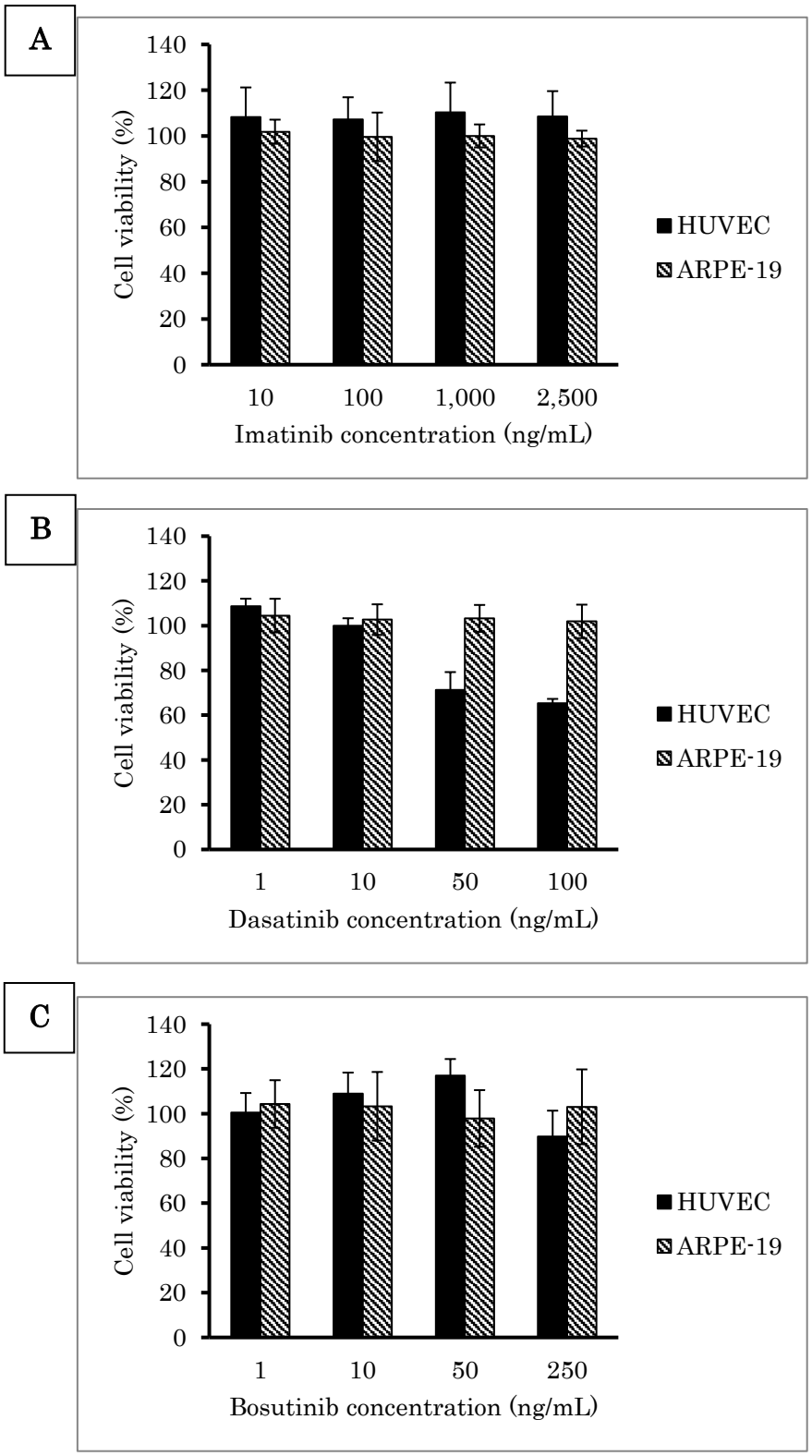


Figure 11 TKI 曝露後細胞生存率の細胞種別比較

各細胞に上記の濃度で(A)Imatinib、(B)Dasatinib ならびに(C)Bosutinib を曝露し、TKI 曝露 72 hr 後に WST-8 assay を実施し、細胞生存率を測定した。（n=6, mean±S.D.）

第二項　TKI 曝露が HUVEC の VE-cadherin 発現に与える影響

各 TKI を C_{max} 相当の濃度で 24 hr 継続曝露した後に VE-cadherin の発現が変化するかについて、HUVEC を用い Western Blot にて検出した。

その結果、コントロール群と比較して、全ての TKI は VE-cadherin の発現に影響を与えないことが示唆された(Figure 12)。

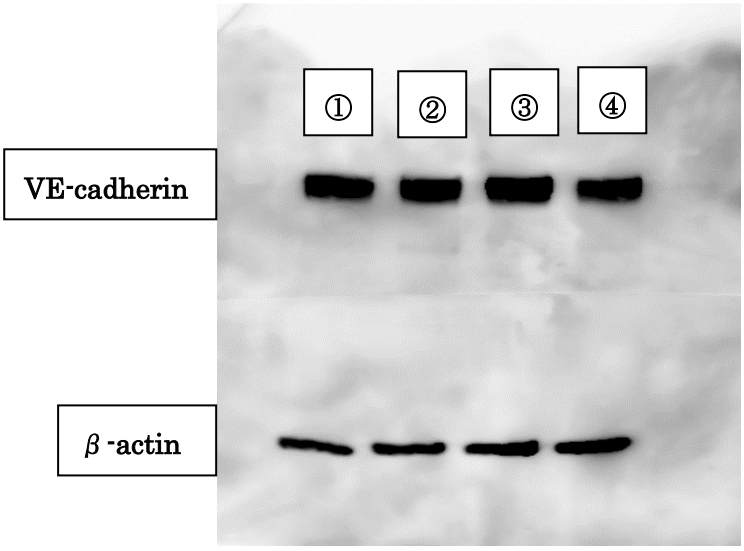


Figure 12 HUVEC に TKI 曝露後 VE-cadherin 発現量

①レーン:Control 群、②レーン:Dasatinib 100 ng/mL、③レーン:Bosutinib 250 ng/mL
④レーン:Imatinib 2,500 ng/mL

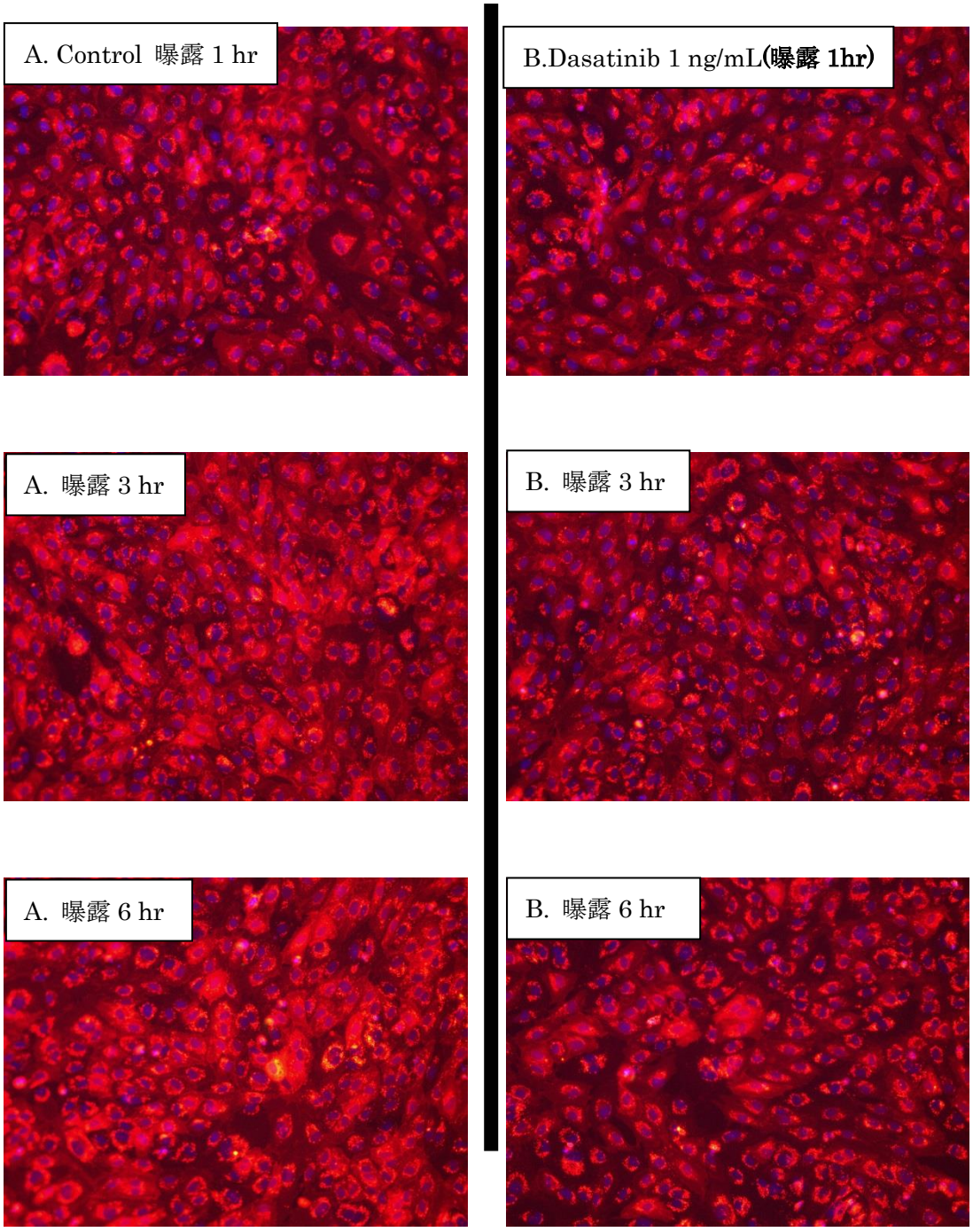
第三項　TKI 曝露による細胞形態変化

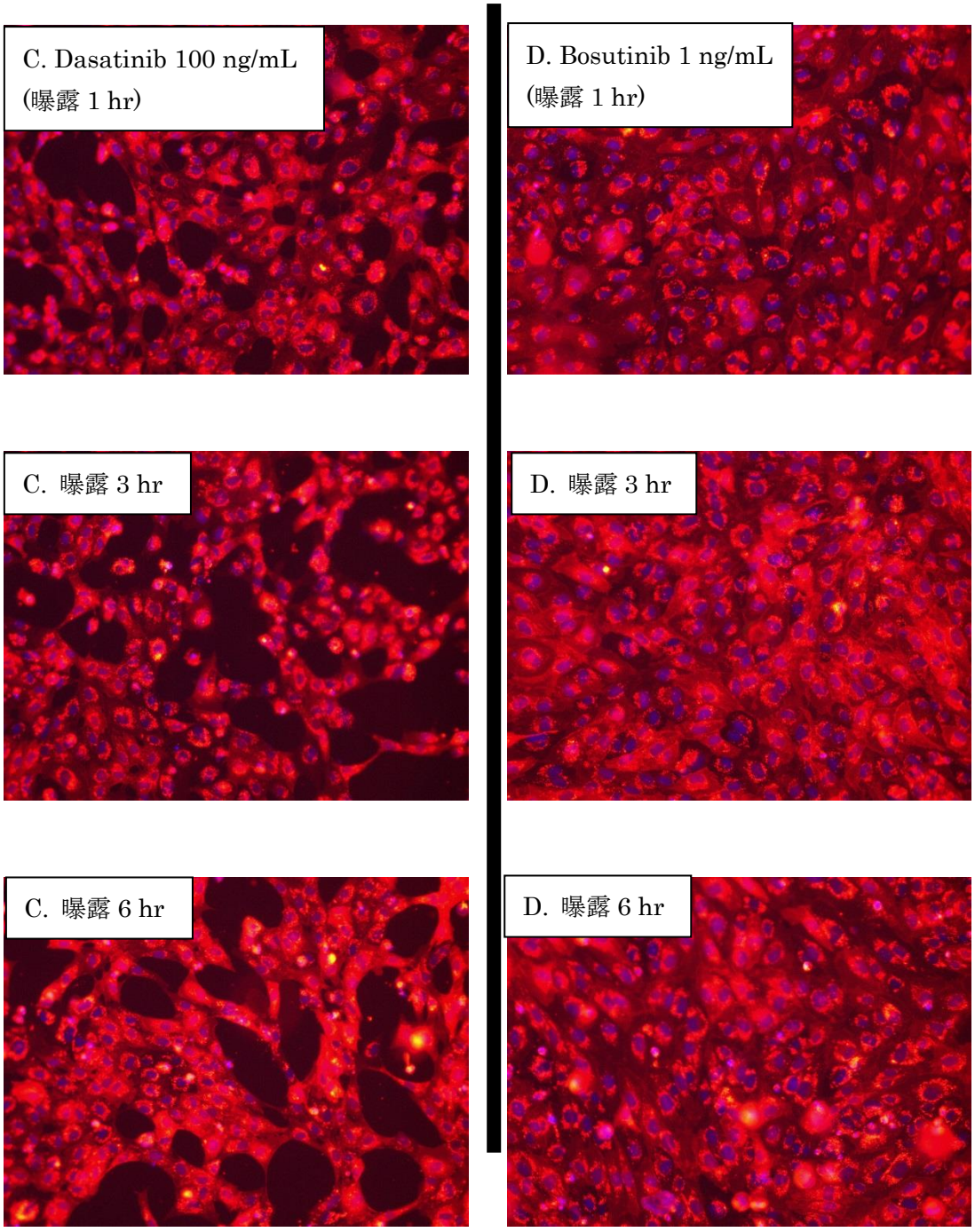
1)　TKI 曝露による細胞形態変化

膜染色した HUVEC を使用し、TKI 曝露後の形態変化を観察した。

Dasatinib では、低濃度である 1 ng/mL 曝露時では細胞形態に変化は認められなかったが、高濃度である 100 ng/mL 曝露時では Control や低濃度曝露時と比較して、経時的な細胞間隙の増加が観察された(Figure 13 A,B および C)。

一方、Bosutinib は Control 群と比較して形態に大きな変化は認められなかった(Figure 13 A, D および E)。さらに、同じ Src 阻害剤である Dasatinib と互いの C_{max} 相当の濃度(Dasatinib:100 ng/mL,Bosutinib:250 ng/mL)における細胞形態を比較した場合、Dasatinib のみで間隙の増大が認められたことから、この細胞形態変化には Src 以外の因子が関与している可能性が示唆された。


A. Control 曝露 1 hr
B.Dasatinib 1 ng/mL(曝露 1hr)
A. 曝露 3 hr
B. 曝露 3 hr
A. 曝露 6 hr
B. 曝露 6 hr


C. Dasatinib 100 ng/mL
(曝露 1 hr)
D. Bosutinib 1 ng/mL
(曝露 1 hr)
C. 曝露 3 hr
D. 曝露 3 hr
C. 曝露 6 hr
D. 曝露 6 hr

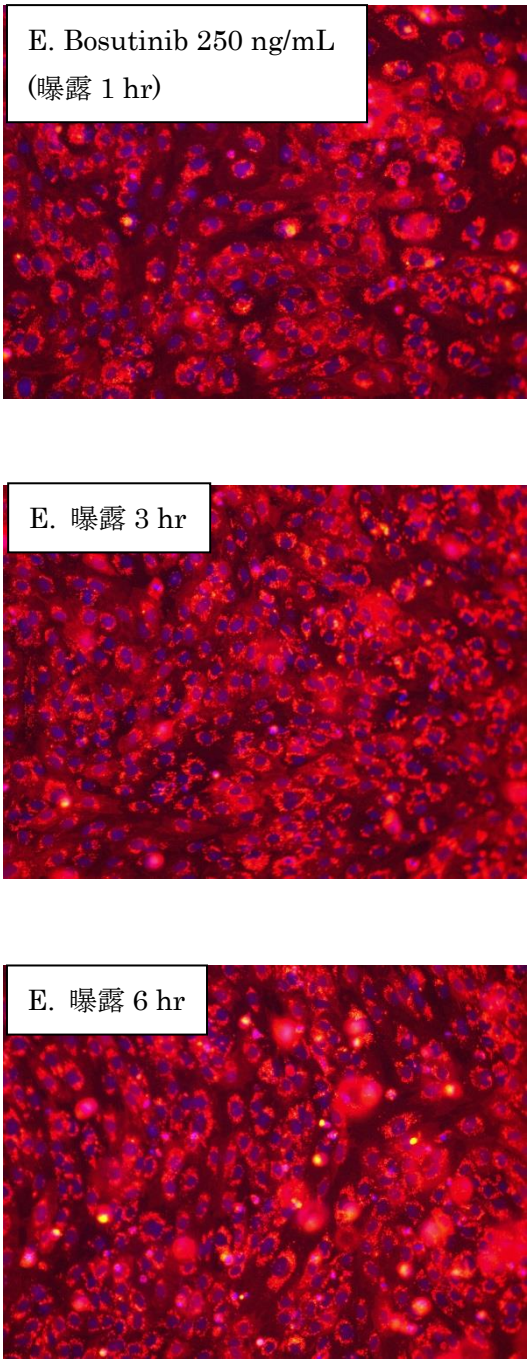


Figure 13 TKI 曝露による HUVEC 細胞形態変化

HUVEC を 24 well マイクロプレートに播種し、90%コンフルエントになるまで培養した。その後、血清飢餓処理を実施し、CellBrite™ Orange Cytoplasmic Membrane Dye および Hochest 33342 溶液で膜および核染色した。染色後、細胞を培養液で十分に洗浄し、終濃度に合わせた薬液を添加し、曝露後の細胞形態変化を蛍光顕微鏡で観察した。

2)　血管透過性制御に関わるキナーゼ阻害剤曝露による細胞形態変化

Figure13 で観察された Dasatinib による細胞形態変化に Src 以外の因子の関与が示唆されたため、それ以外の血管透過性制御因子を阻害した場合に Dasatinib 様の形態変化が観察されるかを検討した。

Src と複合体を形成し、RhoA を不活性化させる FAK を阻害した場合、Control と比較して、細胞形態に大きな変動は認められなかった(Figure 14A および B)。

一方、Tie-2 と cAMP の下流シグナルである Epac を阻害した場合、Control と比較して、細胞間隙の増加が認められた(Figure 14C および D)。

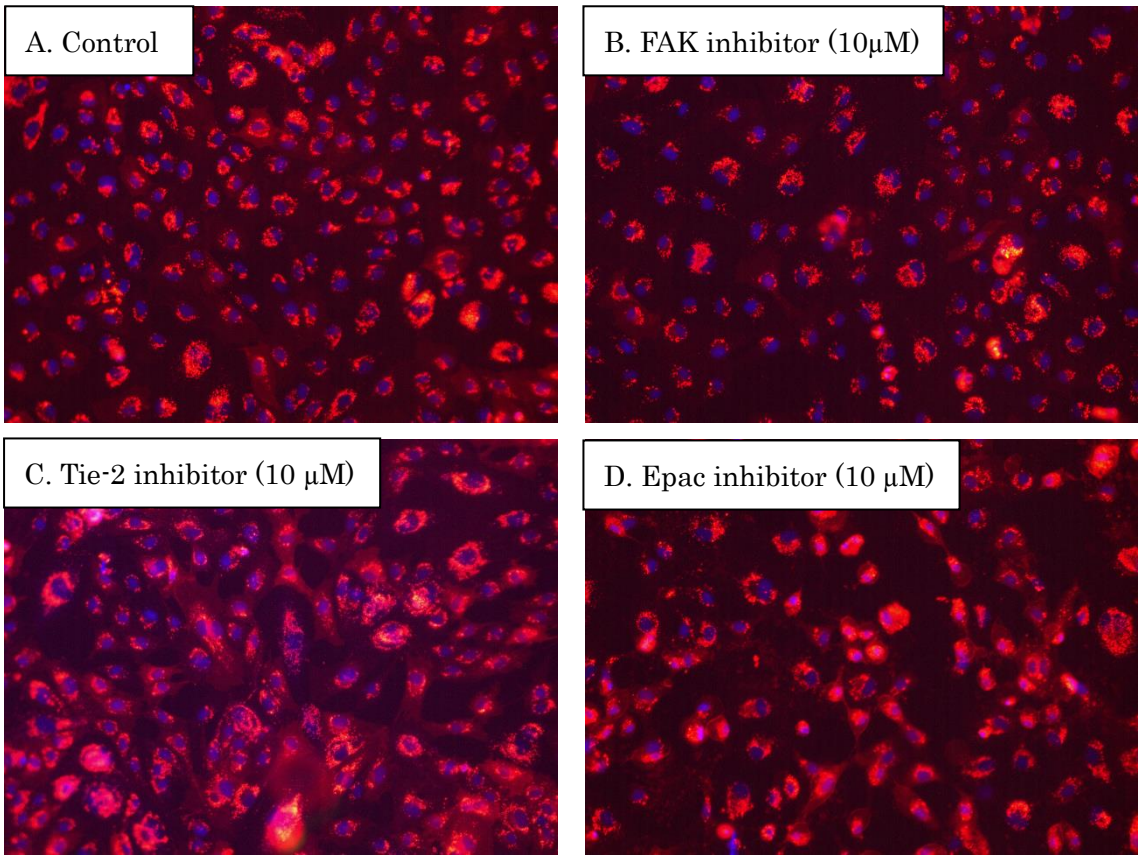


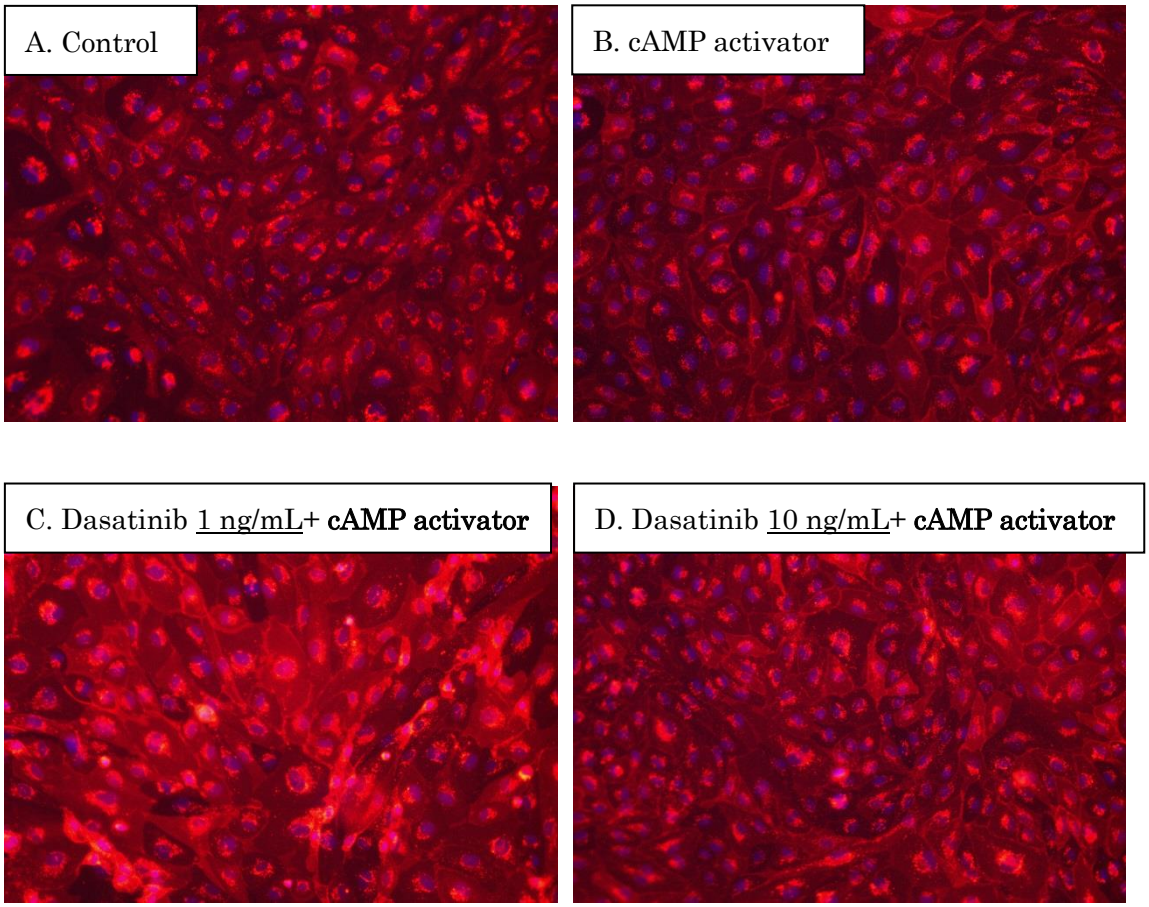
Figure 14　血管透過性制御因子を阻害した場合の HUVEC 細胞形態変化

HUVEC を 24 well マイクロプレートに播種し、90%コンフルエントになるまで培養した。その後、血清飢餓処理を実施し、CellBrite™ Orange Cytoplasmic Membrane Dye および Hochest 33342 溶液で膜および核染色した。染色後、細胞を培養液で十分に洗浄し、終濃度に合わせた薬液を添加し、曝露 3 hr 後の細胞形態変化を蛍光顕微鏡で観察した。

3) Dasatinib 細胞形態変化の cAMP による抑制

Dasatinib 曝露で生じた形態変化が cAMP を分解するホスホジエステラーゼを非特異的に阻害する IBMX と cAMP を生成するアデニル酸シクラーゼを活性化する Forskolin を同時に添加し、cAMP を活性させることにより抑制できるか否かを検討することで、その現象に cAMP の直接的または間接的な関与があるかを明らかにすることとした。

その結果、Figure 13C で観察された Dasatinib による細胞形態変化が cAMP を活性化させることにより、消失することが示された(Figure 15C-E)。これらの結果より、Dasatinib 曝露により生じる細胞形態変化には cAMP が深く関与することが示された。



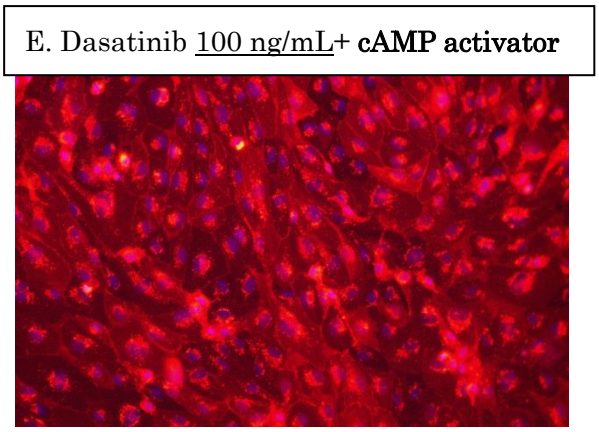


Figure 15 cAMP シグナル活性化時の Dasatinib 曝露後 HUVEC 細胞形態変化

HUVEC を 24 well マイクロプレートに播種し、90%コンフルエントになるまで培養した。その後、血清飢餓処理を実施し、CellBrite™ Orange Cytoplasmic Membrane Dye および Hochest 33342 溶液で膜および核染色した。

その後、細胞を培養液で十分に洗浄し、Dasatinib を曝露する前に IBMX 200μM+Forskolin 20 μM を曝露し、20 min プレインキュベーションした。そして、終濃度に合わせた薬液を添加し、曝露 3 hr 後の細胞形態変化を蛍光顕微鏡で観察した。

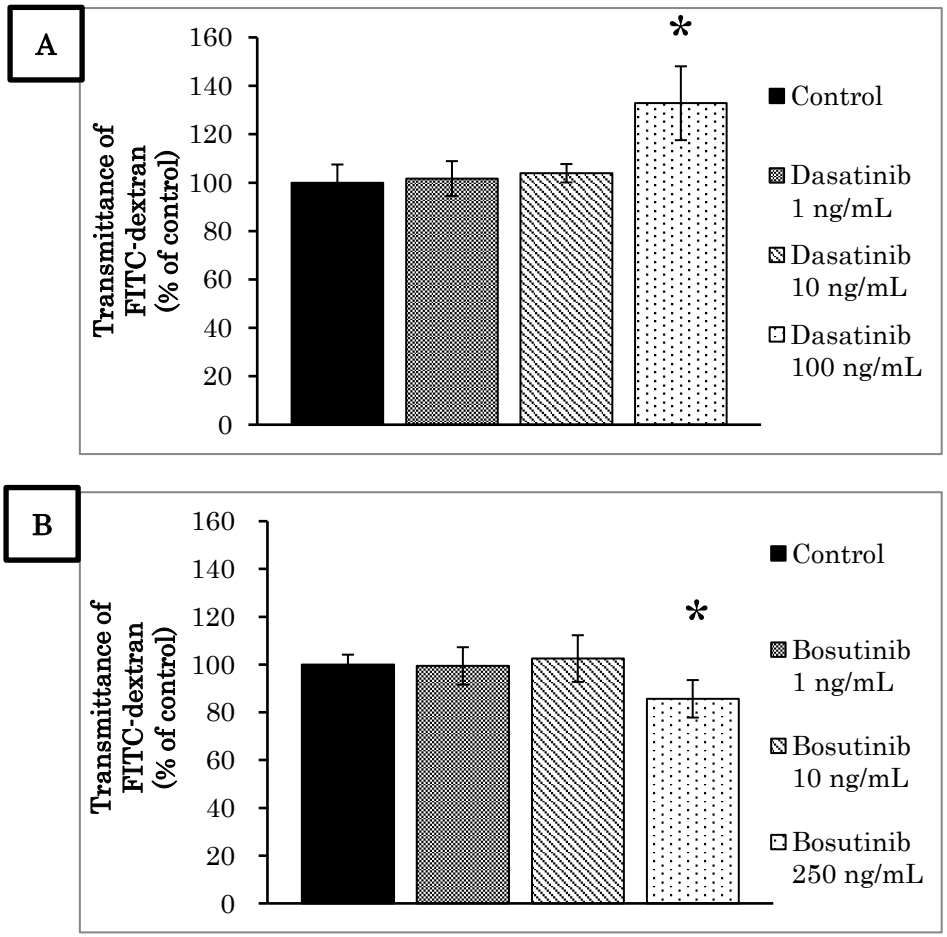
第四項　TKI 曝露が血管透過性に与える影響

1)　TKI 曝露による血管透過性

第三節第三項 1)で観察された TKI 曝露による細胞形態変化が透過性の変動と相関するかを検討した。

Dasatinib は細胞形態変化が観察された 100 ng/mL 曝露において、Control よりも、有意に透過性を増加させた(Figure 16A)。一方、細胞形態に変化が認められなかった Bosutinib 曝露では透過性の増加は認められなかったが、高濃度である 250 ng/mL 曝露時に有意に透過性が低下した(Figure 16B)。さらに、Imatinib 曝露によっても、透過性の増加は認められなかった(Figure 16C)。

これらの結果より、細胞形態の変化と透過性の変動は相関を示し、Dasatinib は高濃度曝露によって透過性が増大することが示された。



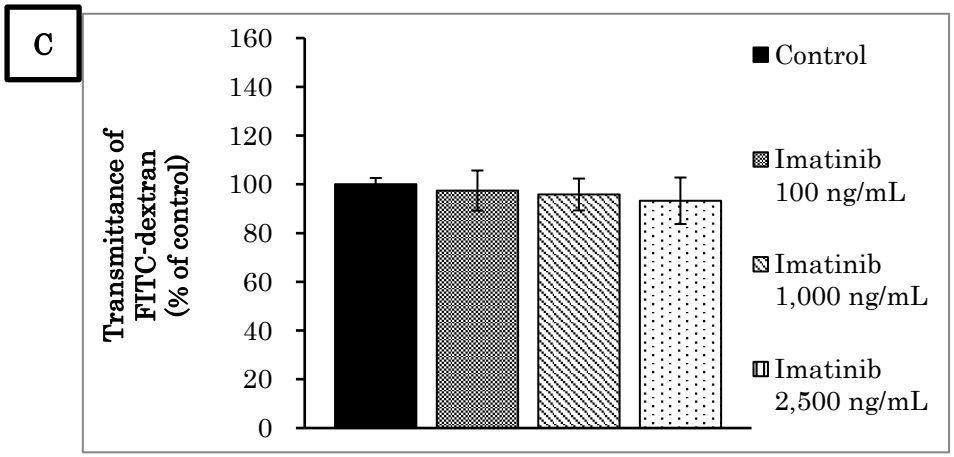


Figure 16（A）Dasatinib、(B）Bosutinib および(C)Imatinib の血管透過性への影響

HUVEC を 12well Transwell®の Apical unit に播種し、単層が形成されるまで培養した。単層形成の確認は、経内皮電気抵抗（TEER）を指標にし、Millicell®ERS-2（Millipore）を使用し、測定した。単層形成後、血清飢餓処理し、その後、各薬物の終濃度に合わせて調製した薬液または薬剤を含まない培養液(DMSO を含む)を Apical unit に添加し、1 hr インキュベートした。薬物曝露後、Apical および Basal unit 中の溶液を洗浄除去した。薬物洗浄後、FITC-dextran を Apical unit に添加し、1 hr インキュベートした。その後、Basal unit 溶液中の FITC-dextran 蛍光強度を、Em 485、Ex 535 nm の波長でマイクロプレートリーダーにて測定した。（n = 4-6, mean±S.D., * p <0.05 by Dunnett -test）

2) 血管透過性制御因子の阻害による血管透過性の変化

血管透過性に関わる因子を阻害した場合において、Dasatinib 曝露で認められた透過性の亢進が同様に認められるかを検討した。

その結果、有意差はないものの、Epac を阻害した場合に最も透過性が増大した(Figure 17)。しかし、阻害剤曝露 3 hr 後に細胞形態が観察された Tie-2 を阻害した場合において、透過性の変動は観察されなかったが、Tie-2 を阻害した 1 hr 後の細胞形態には大きな変化が観察されていないため、本結果は細胞形態変化の結果と一致した(データは示さない)。

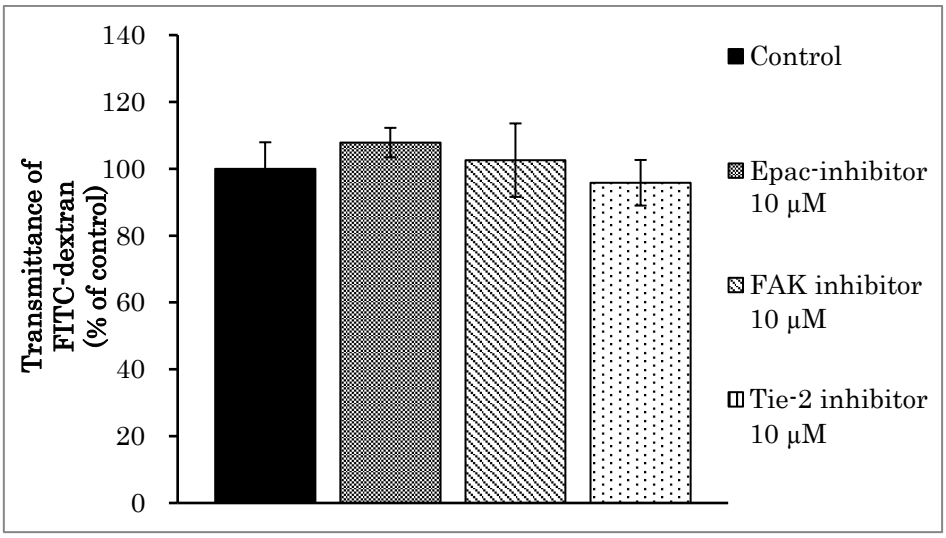


Figure 17 血管透過性制御因子阻害時の透過性への影響

HUVEC を 12well Transwell®の Apical unit に播種し、単層が形成されるまで培養した。単層形成の確認は、経内皮電気抵抗（TEER）を指標にし、Millicell®ERS-2（Millipore）を使用し、測定した。単層形成を確認し、血清飢餓処理後、各薬物の終濃度に合わせて調製した薬液または薬剤を含まない培養液(DMSO を含む)を Apical unit に添加し、1 hr インキュベートした。薬物曝露後、Apical および Basal unit 中の溶液を洗浄除去した。薬物洗浄後、FITC-dextran を Apical unit に添加し、1 hr インキュベートした。その後、Basal unit 溶液中の FITC-dextran 蛍光強度を、Em 485、Ex 535 nm の波長でマイクロプレートリーダーにて測定した。（n = 4-6, mean±S.D.）

3) cAMP シグナル活性化による Dasatinib 血管透過性亢進の抑制

Dasatinib 曝露で観察された透過性亢進に対して、cAMP シグナル経路を活性化させることにより、その亢進を抑制することができるかを検討した。

その結果、Dasatinib を曝露した場合、Dasatinib100 ng/mL 曝露で観察された透過性亢進が消失し、有意に透過性が減少した(Figure 18)。したがって、Dasatinib による胸水発症を含む VAE は cAMP を活性化させることにより予防することができる可能性が示唆された。

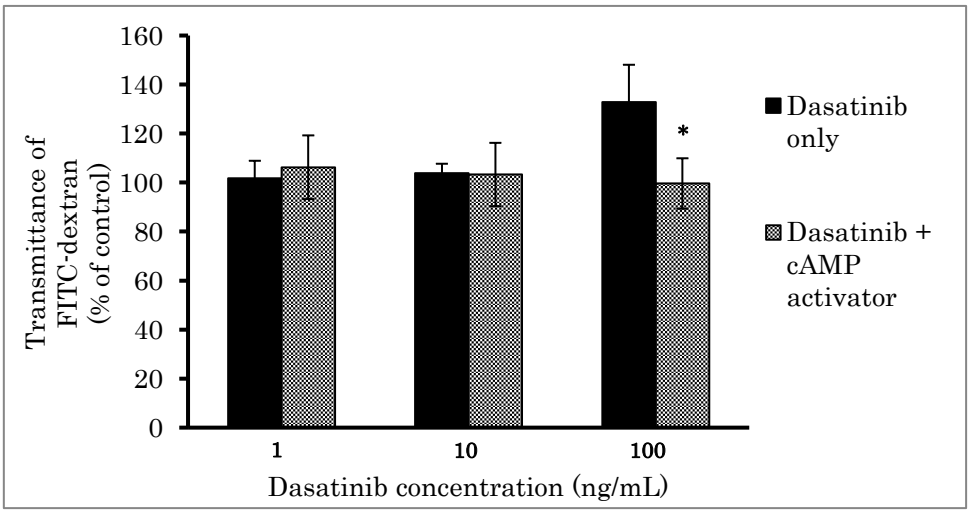


Figure 18 ダサチニブ誘因透過性亢進に対する cAMP の効果

HUVEC を 12well Transwell®の Apical unit に播種し、単層が形成されるまで培養した。単層形成の確認は、経内皮電気抵抗（TEER）を指標にし、Millicell®ERS-2（Millipore）を使用し、測定した。単層形成を確認し、血清飢餓処理後、Dasatinib を曝露する前に IBMX200 μM+Forskolin20 μM を曝露し、20 min プレインキュベーションした。そして、各薬物の終濃度に合わせて調製した薬液または薬剤を含まない培養液(DMSO を含む)を Apical unit に添加し、1 hr インキュベートした。薬物曝露後、Apical および Basal unit 中の溶液を洗浄除去した。薬物洗浄後、FITC-dextran を Apical unit に添加し、1 hr インキュベートした。その後、Basal unit 溶液中の FITC-dextran 蛍光強度を、Em 485、Ex 535 nm の波長でマイクロプレートリーダーにて測定した。また、各群(Dasatinib only または Dasatinib+cAMP activator)の Control は薬剤無添加または IBMX+Forskolin のみを添加したものである。

(n = 4-6, mean±S.D., * p <0.05 by welch-t test)

第四節　考察

CML 治療に使用される TKI は標的分子である BCR-ABL 以外にも様々なキナーゼを阻害することが報告されており、その特性により様々な有害事象が生じているとされる。[49-52] 特に CML 薬物治療上、問題になる有害事象として VAE があり、肺高血圧症、胸水、末梢動脈閉塞症などが挙げられる。VAE 等の有害事象が生じた場合、治療を中断し、これら副作用の治療が優先されるため、治療効果に大きな影響を及ぼす。VAE 発症に TKI がどのようなメカニズムを介して関与しているかを解明することは VAE 発症リスクを低下させ、治療効果を最大限に発揮するために重要である。

そこで、本研究ではヒト血管内皮細胞の一種である HUVEC を使用して、TKI による血管内皮細胞への様々な影響を検討した。その結果、Dasatinib が高濃度曝露において、細胞増殖に影響を与え、Bosutinib や Imatinib においては増殖に影響を及ぼさないことを示した(Figure 9)。Dasatinib は臨床において胸水の発症率がその他の TKI と比較して高く、より高い C_{trough} とその発症率の相関が報告されている。[43] そして、本研究で得られた結果はその報告を部分的に支持している。また、Dasatinib の細胞への影響が血管特異的なものであることを確認するため、ヒト正常組織上皮細胞である ARPE-19 細胞（ヒト網膜色素上皮細胞）を使用して、TKI 曝露の影響を検討した結果、全ての TKI でその細胞増殖に大きな影響がないことが示された(Figure 10 および 11)。

VAE 発症リスクの高い TKI の血管に対する影響が明らかになり、その結果も既報と一致したため、さらに詳細なメカニズムの解明を進めた。

Dasatinib で高頻度に見られる胸水等は血管透過性の亢進が原因で生じる。血管透過性の制御には多くの因子が関与しており、その代表的な分子として VE-cadherin がある。VE-cadherin は細胞接着分子の一種で、この分子同士が Trans 結合することにより、細胞間接着を形成する。そして、TKI の曝露により VE-cadherin の発現量が減少している場合、血管透過性にも影響を与えると考えられたため、TKI 曝露後の VE-cadherin の発現を確認した。その結果、TKI によって VE-cadherin の発現は変化しなかったため、Dasatinib は VE-cadherin による細胞間接着には直接的には影響を与えない可能性が示された(Figure 12)。さらに、VE-cadherin はそのチロシン残基が Src によってリン酸化されることにより、細胞間接着が破壊され、血管透過性の亢進を生じることが報告されている。[53, 54, 65] このメカニズムから考えると Src を阻害する Dasatinib や Bosutinib では血管透過性亢進を抑制することが考えられる。しかし、この報告に対して、Dasatinib による胸水発症は矛盾を生じている。さらに、別の先行研究においては Dasatinib が Src を阻害することによりアクチン骨格の再構築を阻害し血管透過性を亢進することが報告されているが、Src 阻害によって血管透過性を生じ

るのであれば、既報とも矛盾する。[22, 53, 54, 65] これらより、Dasatinib による胸水発症は Src 以外の別のメカニズムが関与している可能性が考えられる。

そのメカニズムを探索するために血管透過性を制御する因子を阻害した場合に、細胞形態にどのような影響を及ぼすかを観察し、血管透過性を亢進する経路を絞り込むこととした。その結果、Tie-2 と Epac を阻害した場合において、Dasatinib で認められた細胞形態変化と同様の変化が認められた(Figures 13C,14C および D)。さらに、Dasatinib 曝露による細胞形態変化と透過性亢進との間に相関性が認められた(Figure 16A)。これらの結果より、Dasatinib による透過性亢進には Tie-2 や cAMP が関与している可能性が考えられる。

Tie-2 は受容体型チロシンキナーゼであり、アゴニストである Angiopoetin-1 により、血管透過性が安定化することが報告されている。[55, 56] しかし、Dasatinib による胸水発症の原因が主に Tie-2 を阻害することによるならば、同様に Tie-2 を阻害することが報告されている Ponatinib においても Dasatinib と同等の胸水発症リスクが考えられるが、各インタビューフォームに記載されている胸水発症率は Dasatinib の方が高い（ブリストル・マイヤーズ スクイブ株式会社、スプリセル®錠インタビューフォーム(2018 年 1 月改訂版 ： 大塚製薬株式会社、アイクルシグ®錠インタビューフォーム(2019 年 1 月改訂版) より)。そのため、Dasatinib が Tie-2 を主に阻害して血管透過性を亢進するという可能性は低いと考えられる。

cAMP はセカンドメッセンジャーの一種で、Epac と呼ばれるグアニンヌクレオチド交換因子を介して、血管透過性を制御する Rac1 や Rap という下流シグナルを刺激し、血管透過性を抑制していることが報告されており、Rap は RhoA の活性化を抑制し、血管透過性亢進を阻害していることも報告されている。[57-60] これらの報告より、cAMP シグナル経路の減弱によって、血管透過性が亢進することが考えられる。Dasatinib による透過性亢進に cAMP が関与するかを明らかにするために、Dasatinib 曝露で生じた細胞形態変化および透過性亢進が cAMP シグナル経路を活性化することにより抑制されるかを検討した。その結果、cAMP によって細胞形態変化は消失し、透過性亢進も抑制された(Figures 15 および 18)。この結果より、Dasatinib による血管透過性亢進には cAMP が直接的または間接的に関与していることが示唆された。先行研究において、Dasatinib の血管透過性亢進は Src を阻害し、RhoA-ROCK 経路が活性化することにより生じていることが報告されているが、その報告では RhoA 量増加を Dasatinib でしか確認していない点や Bosutinib では透過性に変化がないことが報告されているなど不十分な点が多い。[21, 22]しかし、この先行研究の報告と今回の結果から、Dasatinib による RhoA 増加が cAMP シグナルの減弱によるものである可能性も考えられる。実際に本研究の結果では、cAMP シグナルを遮

断することによる細胞形態の変化を確認し、Dasatinib 曝露で生じる血管透過性亢進を cAMP が抑制することを明らかにした。しかし、実際にどのような経路で TKI が cAMP に影響を与えているかは明らかにされていないため、今後はさらなる検討が必要である。

第五節　小括

第二章では、CML の薬物治療で問題となる VAE において、特に Dasatinib によって高頻度に生じる胸水の発症メカニズムについて検討した。その結果、臨床における C_{max} 相当の濃度で Dasatinib に曝露された場合、血管内皮細胞の透過性亢進および細胞形態変化が生じることを明らかにした。さらに、その透過性亢進および形態変化が cAMP シグナルを活性化することにより抑制されることも明らかにした。したがって、Dasatinib による胸水発生が cAMP を活性化することにより、抑えられる可能性が示された。しかし、Dasatinib による透過性亢進に対する cAMP の関与が、直接的なのかあるいは間接的なのかは、いまだ不明であるため、cAMP 量や下流シグナルである Rac1 または Rap の活性化状態の確認などのさらなる検討が必要である。

総括

本研究では、BCR-ABL TKI の治療効果と有害事象に関する検討を行い、以下のような知見が得られた。

第一章においては、CML 薬物治療で使用される Imatinib、Nilotinib ならびに Dasatinib において、それら薬物の細胞増殖抑制効果は一定の条件を満たした場合に持続することが示された。Nilotinib および Dasatinib は C_{max} に相当する濃度で曝露された場合に、細胞増殖抑制効果が持続することが示された。しかし、細胞増殖抑制効果は薬物の細胞内蓄積量に依存するため、MDR-1 をはじめとする排出タンパク質の影響を受けることが予想された。Dasatinib においては、MDR-1 導入によって細胞内蓄積量が減少し、細胞増殖抑制効果も減弱したことを示したが、Nilotinib においては MDR-1 による影響は少なく、細胞内蓄積量は MDR-1 の発現では変動しないことが明らかになった。その結果、Nilotinib は MDR-1 の発現有無にかかわらず、細胞増殖抑制効果は持続することが示された。一方、Imatinib を短時間曝露した場合では、作用は持続せず、長時間曝露し、薬物を洗浄除去した場合のみ、その作用の持続が示された。Imatinib は TDM の対象薬剤に指定されており、血中トラフ濃度を 1,000 ng/mL 以上に維持することで治療効果が向上するため、その作用には時間依存性があると考えられる。これらの結果を踏まえ、CML 薬物治療において、一定効果を示した患者に対しては、間欠投与や投与量の減量といった手法も可能であることが示唆された。

第二章では、TKI による治療上、問題となる VAE の発症メカニズム、特に Dasatinib による胸水に着目し、そのメカニズムを解明するため、HUVEC を使用し、TKI の血管に対する影響を検討した。Dasatinib は血管内皮細胞の増殖には影響を与えるが、その他のヒト正常組織上皮細胞である ARPE-19 細胞の増殖に影響を与えないことを示し、Imatinib などの Dasatinib よりも VAE 発症リスクが低い薬物は血管内皮細胞増殖に影響を与えないことが示された。胸水は血管透過性が亢進することにより生じるため、Dasatinib 曝露時に血管内皮細胞の形態および透過性がどのように変化するかを検討し、Dasatinib は C_{max} 相当の濃度を曝露した場合において、細胞形態が変化し、透過性も亢進することが示された。そして、その透過性亢進がどのようなメカニズムで生じているかを探索する検討において、cAMP シグナル経路を阻害した場合に、同様の細胞形態変化が認められた。さらに、cAMP は Dasatinib で認められた透過性亢進を抑制したため、Dasatinib の胸水発症には cAMP が直接的または間接的に関与していることが示唆された。

本研究では、このように TKI の治療効果と安全性について、新たな知見が得られた。治療効果の検討で、Imatinib は高濃度で長時間曝露された場合に、薬

物消失後も細胞増殖抑制効果が持続し、Nilotinib および Dasatinib は一時的曝露においても一定の細胞内蓄積量であれば薬物消失後も細胞増殖抑制効果が持続することが明らかになった。また、安全性に関する検討では、Dasatinib による胸水発症が cAMP シグナルを活性化させることにより、抑制できる可能性が明らかになったため、今後さらなる知見の蓄積により本研究が CML 薬物治療のさらなる向上に貢献できることを期待する。

引用文献

1) Nowell C. The minute chromosome (Ph1) in chronic granulocytic leukemia. *Ann. Hematol.* 8(2), 65–66 (1962).

2) Rowley JD. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 243(5405), 290–293 (1973).

3) Ren R. Mechanisms of BCR-ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia. *Nat. Rev. Cancer* 5(3), 172–183 (2005).

4) Kujawski LA, Talpaz M. The role of interferon-alpha in the treatment of chronic myeloid leukemia. *Cytokine Growth Factor Rev.* 18(5–6), 459–471 (2007).

5) Larson RA, Druker BJ, Guilhot F, *et al*. Imatinib pharmacokinetics and its correlation with response and safety in chronic-phase chronic myeloid leukemia: a subanalysis of the IRIS study. *Blood* 111(8), 4022–4028 (2008).

6) Ohnishi K, Nakaseko C, Takeuchi J, *et al*. Long-term outcome following imatinib therapy for chronic myelogenous leukemia, with assessment of dosage and blood levels: The JALSG CML202 study. *Cancer Sci.* 103(6), 1071–1078 (2012).

7) Chen TC, Chen LC, Huang Y Bin, *et al.* Imatinib adherence associated clinical outcomes of chronic myeloid leukaemia treatment in Taiwan. *Int. J. Clin. Pharm.* 36(1), 172–181 (2014).

8) Jönsson S, Olsson B, Söderberg J, *et al*. Good adherence to imatinib therapy among patients with chronic myeloid leukemia-a single-center observational study. *Ann. Hematol*. 91(5), 679–685 (2012).

9) Fujisawa S, Ueda Y, Usuki K, *et al.* Feasibility of the imatinib stop study in the Japanese clinical setting: delightedly overcome CML expert stop TKI trial (DOMEST Trial). *Int. J. Clin. Oncol.* 24(4), 445–453 (2018).

10) Okada M, Imagawa J, Tanaka H, *et al.* Final 3-year Results of the Dasatinib Discontinuation Trial in Patients With Chronic Myeloid Leukemia Who Received Dasatinib as a Second-line Treatment. *Clin. Lymphoma, Myeloma Leuk.* 18(5), 353–360 (2018).

11) Rea D, Nicolini FE, Tulliez M, *et al.* Discontinuation of dasatinib or nilotinib in chronic myeloid leukemia: interim analysis of the STOP 2G-TKI study: Discontinuation of dasatinib or nilotinib in chronic myeloid leukemia: interim analysis of the STOP 2G-TKI study. *Blood* 129(7), 846–855 (2016).

12) Clark RE, Polydoros F, Apperley JF, *et al.* De-escalation of tyrosine kinase inhibitor dose in patients with chronic myeloid leukaemia with stable major molecular response (DESTINY): an interim analysis of a non-randomised, phase 2 trial. *Lancet Haematol.* 4(7), e310–e316 (2017).

13) Hegedus C, Özvegy-Laczka C, Apáti AÁ, *et al.* Interaction of nilotinib, dasatinib and bosutinib with ABCB1 and ABCG2: Implications for altered anti-cancer effects and pharmacological properties. *Br. J. Pharmacol.* 158(4), 1153–1164 (2009).

14) Yamakawa Y, Hamada A, Uchida T, *et al.* Distinct interaction of nilotinib and imatinib with P-Glycoprotein in intracellular accumulation and cytotoxicity in CML Cell Line K562 cells. *Biol. Pharm. Bull.* 37(8), 1330-1335 (2014).

15) Gromicho M, Dinis J, Magalhães M, *et al.* Development of imatinib and dasatinib resistance: Dynamics of expression of drug transporters ABCB1, ABCC1, ABCG2, MVP, and SLC22A1. *Leuk. Lymphoma.* 52(10), 1980–1990 (2011).

16) Eadie LN, Dang P, Saunders VA, *et al.* The clinical significance of ABCB1 overexpression in predicting outcome of CML patients undergoing first-line imatinib treatment. *Leukemia* 31(1), 75–82 (2017).

17) Lardo M, Castro M, Moiraghi B, *et al.* MDR1/ABCB1 gene polymorphisms in patients with chronic myeloid leukemia. *Blood Res.* 50(3), 154–159 (2015).

18) Kitagawa D, Yokota K, Gouda M, *et al.* Activity-based kinase profiling of approved tyrosine kinase inhibitors. *Genes to Cells* 18(2), 110–122 (2013).

19) Chuah C, Melo J V. Targeted treatment of imatinib-resistant chronic myeloid leukemia: Focus on dasatinib. *Onco. Targets. Ther.* 2, 83–94 (2009).

20) Amsberg GK von, Koschmieder S. Profile of bosutinib and its clinical potential in the treatment of chronic myeloid leukemia. *Onco. Targets. Ther.* 6, 99–106 (2013).

21) Dasgupta SK, Le A, Vijayan KV, *et al.* Dasatinib inhibits actin fiber reorganization and promotes endothelial cell permeability through RhoA-ROCK pathway. *Cancer Med.* 6(4), 809–818 (2017).

22) Colom-Fernández B, Cuesta-Mateos C, Arévalo CD, *et al.* Dasatinib Reversibly Disrupts Endothelial Vascular Integrity by Increasing Non-Muscle Myosin II Contractility in a ROCK-Dependent Manner. *Clin. Cancer Res.* 23(21), 6697–6707 (2017).

23) Riou M, Seferian A, Savale L, *et al.* Deterioration of pulmonary hypertension and pleural effusion with bosutinib following dasatinib lung toxicity. *Eur. Respir. J.* 48(5), 1517–1519 (2016).

24) Seegobin K, Babbar A, Ferreira J, *et al.* A case of worsening pulmonary arterial hypertension and pleural effusions by bosutinib after prior treatment with dasatinib. *Pulm. Circ.* 7(4), 808–812 (2017).

25) Aoyama T, Shibayama Y, Furukawa T, *et al.* Continuous cytostatic effects of BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors (TKIs) after washout in human leukemic K562 cells. *Biol. Pharm. Bull.* 42(11), 1805-1813 (2019)

26) Xing H, Liu T, Meng W, *et al.* An investigation of reversal of imatinib resistance in the Bcr-Abl positive imatinib-resistant cell line K562r by dasatinib, nilotinib, rapamycin and bortezomib. *Int. J. Lab. Hematol.* 33(2), 176–181 (2011).

27) Nakamae H, Fujisawa S, Ogura M, *et al.* Dasatinib versus imatinib in Japanese patients with newly diagnosed chronic phase chronic myeloid leukemia: a subanalysis of the DASISION 5-year final report. *Int. J. Hematol.* 105(6), 792–804 (2017).

28) Kantarjian H, Shah NP, Hochhaus A, *et al.* Dasatinib versus Imatinib in Newly Diagnosed Chronic-Phase Chronic Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* 362(24), 2260–2270 (2010).

29) Ciarcia R, Damiano S, Puzio MV, *et al.* Comparison of Dasatinib, Nilotinib, and Imatinib in the Treatment of Chronic Myeloid Leukemia. *J. Cell. Physiol.* 231(3), 680–687 (2016).

30) Che XF, Nakajima Y, Sumizawa T, *et al.* Reversal of P-glycoprotein mediated multidrug resistance by a newly synthesized 1,4-benzothiazipine derivative, JTV-519. *Cancer Lett.* 187(1–2), 111–119 (2002).

31) Larson RA, Hochhaus A, Hughes TP, *et al.* Nilotinib vs imatinib in patients with newly diagnosed Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia in chronic phase: ENESTnd 3-year follow-up. *Leukemia* 26(10), 2197–2203 (2012).

32) Nakamae H, Fukuda T, Nakaseko C, *et al.* Nilotinib vs. imatinib in Japanese patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase: long-term follow-up of the Japanese subgroup of the randomized ENESTnd trial. *Int. J. Hematol.* 107(3), 327–336 (2018).

33) Picard S, Titier K, Etienne G, *et al.* Trough imatinib plasma levels are associated with both cytogenetic and molecular responses to standard-dose imatinib in chronic myeloid leukemia Brief report Trough imatinib plasma levels are associated with both cytogenetic and molecular responses to sta. *Blood* 109(8), 3496–3499 (2009).

34) Takahashi N, Wakita H, Miura M, *et al.* Correlation between imatinib pharmacokinetics and clinical response in japanese patients with chronic-phase chronic myeloid leukemia. *Clin. Pharmacol. Ther.* 88(6), 809–813 (2010).

35) Jacquel A, Herrant M, Legros L, *et al.* Imatinib induces mitochondria-dependent apoptosis of the Bcr-Abl-positive K562 cell line and its differentiation toward the erythroid lineage. *FASEB J.* 17(14), 2160–2162 (2003).

36) Larson RA, Yin OQP, Hochhaus A, *et al.* Population pharmacokinetic and exposure-response analysis of nilotinib in patients with newly diagnosed Ph+ chronic myeloid leukemia in chronic phase. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 68(5), 723–733 (2012).

37) Wang X, Roy A, Hochhaus A, *et al.* Differential effects of dosing regimen on the safety and efficacy of dasatinib:Retrospective exposure-response analysis of a phase III study. *Clin. Pharmacol. Adv. Appl.* 5, 85–97 (2013)

38) Mustjoki S, Auvinen K, Kreutzman A, *et al.* Rapid mobilization of cytotoxic lymphocytes induced by dasatinib therapy. *Leukemia* 27(4), 914–924 (2013).

39) Iriyama N, Hatta Y, Takei M. Direct effect of dasatinib on signal transduction pathways associated with a rapid mobilization of cytotoxic lymphocytes. *Cancer Med.* 5(11), 3223–3234 (2016).

40) Vainstein V, Eide C, Hare TO, *et al.* Integrating in vitro sensitivity and dose-response slope is predictive of clinical response to ABL kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia. *Blood* 122(19), 3331–3335 (2013).

41) Dohse M, Scharenberg C, Shukla S, *et al.* Comparison of ATP-binding cassette transporter interactions with the tyrosine kinase inhibitors imatinib, nilotinib, and dasatinib. *Drug Metab. Dispos.* 38(8), 1371–1380 (2010).

42) Davies A, Jordanides NE, Giannoudis A, *et al.* Nilotinib concentration in cell lines and primary CD34+ chronic myeloid leukemia cells is not mediated by active uptake or efflux by major drug transporters. *Leukemia* 23(11), 1999–2006 (2009).

43) Miura M. Therapeutic drug monitoring of imatinib, nilotinib, and dasatinib for patients with chronic myeloid leukemia. *Biol. Pharm.Bull.* 38(5), 645–654 (2015).

44) Kim D-W, Khoury HJ, Porkka K, *et al.* Bosutinib safety and management of toxicity in leukemia patients with resistance or intolerance to imatinib and other tyrosine kinase inhibitors. *Blood* 123(9), 1309–1318 (2013).

45) Le Hiress M, Molimard M, Seferian A, *et al.* Dasatinib induces lung vascular toxicity and predisposes to pulmonary hypertension. *J. Clin. Invest.* 126(9), 3207–3218 (2016).

46) Cortes JE, Jimenez CA, Mauro MJ, *et al.* Pleural Effusion in Dasatinib-Treated Patients With Chronic Myeloid Leukemia in Chronic Phase: Identification and Management. *Clin. Lymphoma, Myeloma Leuk.* 17(2), 78–82 (2017).

47) Bondon-Guitton E, Combret S, Pérault-Pochat MC, *et al.* Cardiovascular risk profile of patients with peripheral arterial occlusive disease during nilotinib therapy. *Target. Oncol.* 11(4), 549–552 (2016).

48) Tournaire G, Despas F, Huguet F,*et al.* Peripheral arterial occlusive disease during ponatinib therapy after failure of imatinib: A case report. *J. Clin. Pharm. Ther.* 41(3), 360–361 (2016).

49) Kitagawa D, Yokota K, Gouda M, *et al.* Activity-based kinase profiling of approved tyrosine kinase inhibitors. *Genes to Cells* 18(2), 110–122 (2013).

50) Chuah C, Melo J V. Targeted treatment of imatinib-resistant chronic myeloid leukemia: Focus on dasatinib. *Onco. Targets. Ther.* 2, 83–94 (2009).

51) Amsberg GK von, Koschmieder S. Profile of bosutinib and its clinical potential in the treatment of chronic myeloid leukemia. *Onco. Targets. Ther.* 6, 99–106 (2013).

52) Hamadi A, Grigg A, Dobie G, et al.Ponatinib Tyrosine Kinase Inhibitor Induces a Thromboinflammatory Response. *Thromb.Haemost.* 119(7),1112-1123 (2019).

53) Gorbunova EE, Gavrilovskaya IN, Pepini T,*et al.* VEGFR2 and Src Kinase Inhibitors Suppress Andes Virus-Induced Endothelial Cell Permeability. *J. Virol.* 85(5), 2296–2303 (2010).

54) Massena S, Zang G, Kutschera S, *et al.* VEGFR2 induces c-Src signaling and vascular permeability in vivo via the adaptor protein TSAd. *J. Exp. Med.* 209(7), 1363–1377 (2012).

55) Gavard J, Patel V, Gutkind JS. Angiopoietin-1 Prevents VEGF-Induced Endothelial Permeability by Sequestering Src through mDia. *Dev. Cell.* 14(1), 25–36 (2008).

56) Chislock EM, Ring C, Pendergast AM. Abl kinases are required for vascular function, Tie2 expression, and angiopoietin-1-mediated survival. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110(30), 12432–12437 (2013).

57) Zhang XE, Adderley SP, Breslin JW. Activation of rhoa, but not rac1, mediates early stages of s1p-induced endothelial barrier enhancement. *PLoS One* 11(5), 1–18 (2016).

58) Kooistra MRH, Corada M, Dejana E, *et al*. Epac1 regulates integrity of endothelial cell junctions through VE-cadherin. *FEBS Lett.* 579(22), 4966–4972 (2005).

59) Cheng X, Ji Z, Tsalkova T, *et al.* Epac and PKA: A tale of two intracellular cAMP receptors. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai).* 40(7), 651–662 (2008).

60) Birukova AA, Zagranichnaya T, Alekseeva E, *et al*. Epac/Rap and PKA are novel mechanisms of ANP-induced Rac-mediated pulmonary endothelial barrier protection. *J. Cell. Physiol.* 215(3), 715–724 (2008).

61) Chernoff J. Close encounters of the LIM-kinase. *Nat. Cell Biol.* 1(5), E115–E117 (1999).

62) Ando K, Fukuhara S, Moriya T, *et al*. Rap1 potentiates endothelial cell junctions by spatially controlling myosin I activity and actin organization. *J. Cell Biol.* 202(6), 901–916 (2013).

63) Samarel AM, Holinstat M, Broman M, *et al*. Suppression of RhoA Activity by Focal Adhesion Kinase-induced Activation of p190RhoGAP. *J. Biol. Chem.* 281(4), 2296–2305 (2005).

64) Tomar A, Lim S-T, Lim Y, *et al*. A FAK-p120RasGAP-p190RhoGAP complex regulates polarity in migrating cells. *J. Cell Sci.* 122(11), 1852–1862 (2009).

65) Giannotta M, Trani M, Dejana E. VE-cadherin and endothelial adherens junctions: Active guardians of vascular integrity. *Dev. Cell.* 26(5), 441–454 (2013).

謝辞

本研究の遂行、並びに本論文作成にあたり終始ご懇切なるご指導、ご鞭撻を賜りました北海道大学大学院薬学研究院　薬物動態解析学研究室 菅原満 教授に謹んで感謝申し上げます。

また、本論文の副査としてご審査並びにご指導を賜りました北海道大学大学院薬学研究院　臨床薬剤学研究室　井関健　教授、同研究室　小林正紀　准教授並びに北海道大学病院　薬剤部　武隈洋　准教授に厚くお礼申し上げます。

本研究を行うにあたり、多くの有益なご指導、ご助言をいただきました北海道大学大学院薬学研究院　薬物動態解析学研究室 柏木仁 講師、同研究室　今井俊吾　助教に謹んで感謝いたします。

本研究の実施にあたり、hMDR-1 導入 K562 細胞を提供していただいた鹿児島大学大学院医歯学総合研究科　古川龍彦　教授ならびに慶應義塾大学大学院薬学研究科　杉本芳一　教授に謹んで感謝いたします。

最後に、平素の研究のみならず、様々な面で支えていただいた北海道大学大学院薬学研究院　薬物動態解析学研究室の皆様に心より感謝いたします。

2020 年 3 月