

氏 名 岩佐 磨佐紀

学 位 の 種 類 博士 (医学)

学 位 記 番 号 博士甲第786号

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第4条第1項

学 位 授 与 年 月 日 平成29年 9月13日

学 位 論 文 題 目 Bortezomib interferes with adhesion of B cell precursor acute lymphoblastic leukemia cells through SPARC up-regulation in human bone marrow mesenchymal stromal/stem cells

(ボルテゾミブはヒト骨髄間葉系幹細胞の SPARC 発現上昇を介して B 前駆細胞型急性リンパ性白血病細胞の接着を阻害する)

審 査 委 員 主査 教授 丸尾 良浩

副査 教授 寺田 智祐

副査 教授 平田多佳子

論文内容要旨

*整理番号	793	(ふりがな) 氏名	いわき まさき 岩佐 磨佐紀
学位論文題目	Bortezomib interferes with adhesion of B cell precursor acute lymphoblastic leukemia cells through SPARC up-regulation in human bone marrow mesenchymal stromal/stem cells (ボルテゾミブはヒト骨髄間葉系幹細胞の SPARC 発現上昇を介して B 前駆細胞型急性リンパ性白血病細胞の接着を阻害する)		
<p>【目的】成人 B 前駆細胞型急性リンパ性白血病 (B cell precursor acute lymphoblastic leukemia, 以下 BCP-ALL) は、抗がん剤治療で寛解に至り易いが、再発が多く予後不良である。造血幹細胞移植の効果も限定的であり新たな治療開発が必要である。腫瘍細胞は細胞接着により抗がん剤抵抗性を獲得することが知られている。そこで我々は、骨髄微小環境の構成細胞である骨髄間葉系幹細胞 (bone marrow mesenchymal stromal/stem cells, 以下 BM-MSCs) を用い、BM-MSCs と BCP-ALL 細胞の接着に着目した。また、ボルテゾミブ (bortezomib, 以下 Bor) は骨髄微小環境への効果が報告されており、Bor が BM-MSCs に作用し BCP-ALL 細胞の接着を阻害する効果を検証し、BM-MSCs を標的とした新たな治療戦略の開発を目的とした。</p> <p>【方法】ヒト BCP-ALL 細胞株 NALM-6 と健常人骨髄より分離した BM-MSCs を用いた。in vitro の実験では主に NALM-6 と BM-MSCs の共培養を行い検討した。Bor の BM-MSCs への影響の検討は、共培養前に BM-MSCs を Bor へ暴露し、洗浄後共培養した。in vivo の実験では、免疫不全マウスに放射線照射後 NALM-6 を移植したモデルマウスを用いた。細胞数測定はフローサイトメトリー法で行った。</p> <p>【結果】NALM-6 と BM-MSCs を共培養した状態で抗がん剤を添加すると、浮遊した NALM-6 細胞数はコントロールと比べ有意に減少したが、接着細胞では減少しなかった。浮遊及び接着した NALM-6 を磁気ビーズ法で分離し、ウェスタンブロッティング法で Bcl-2 及びリン酸化 Akt の発現を確認すると、いずれも接着細胞で発現が高かった。細胞周期解析では接着細胞で G0 期と S/G2/M 期の細胞が有意に多かった。Bor で処理した BM-MSCs に NALM-6 を共培養すると、コントロールに比べ有意に接着細胞が減少した。Bor で処理した BM-MSCs では抗接着因子として報告される SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine) の発現が上昇した。siRNA で SPARC の発現を抑制すると BM-MSCs に接着する NALM-6 細胞数は増加し、リコンビナント SPARC で BM-MSCs を処理すると、接着する NALM-6 細胞数は減少した。</p> <p>モデルマウスに抗がん剤であるドキシソルビシン (doxorubicin hydrochloride, 以下 DXR) を投与すると、生存期間は有意に延長した。一方、Bor のみでは生存は延長しな</p>			

(備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等を用いて印字すること。

2. ※印の欄には記入しないこと。

(続紙)

かった。DXR と Bor の併用投与は、DXR 単剤と比べ有意に生存期間が延長した。骨髄中の NALM-6 は、DXR 及び Bor の単剤投与では減少しなかったが、併用で有意に減少した。Bor の NALM-6 への直接的影響が無いことは *in vitro* で確認した。

【考察】本研究では BM-MSCs に接着する NALM-6 が抗がん剤抵抗性を獲得することを確認した。また Bor は BM-MSCs の SPARC 発現を増強することで、NALM-6 の接着を阻害し抗がん剤抵抗性を減弱する可能性を示し、モデルマウスの実験で矛盾しない結果を得た。

多発性骨髄腫において、微小環境との相互作用が抗がん剤抵抗性に影響を与え治療標的になる可能性は報告されるが、BCP-ALL の報告は少ない。本研究では Bor という多発性骨髄腫の臨床で多用される薬剤が、BCP-ALL では BM-MSCs に作用することで抗がん剤への感受性を増強し、抗がん剤抵抗性の集団を駆逐できる可能性を見出した。このメカニズムに SPARC という抗接着因子が関連する可能性については特に新しい結果と考えられる。本研究は微小環境を標的とした薬物治療の可能性を示し、さらに臨床応用された薬剤を用いたことで、最低限の臨床試験で臨床応用を目指すことができる。

一方、BCP-ALL 細胞は単一細胞株の検討で、BM-MSCs は健常人由来のため、一般論として論じることには限界がある。また、ヒト由来の細胞を用いていることもあり *in vitro* の実験が主体となった。モデルマウスの実験ではマウスの BM-MSCs の解析を行っていないため、生体内でのメカニズムは未解明である。以上の問題点より、今後は患者由来の細胞を用いた基礎研究を追加し、その後臨床試験に繋ぐことでさらに有意な成果が得られると考えられる。

【結論】NALM-6 は BM-MSCs との接着を介して、Bcl-2 の発現や Akt リン酸化により抗がん剤への抵抗性を増強する可能性が示された。この接着は Bor が BM-MSCs に作用し SPARC の発現を上昇させることで阻害できる可能性が示された。モデルマウスで Bor 単剤では生存と骨髄 NALM-6 への効果は無いが、DXR との併用で有意に生存期間が延長し、骨髄中の NALM-6 を減少させた。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	793	氏名	岩佐 磨佐紀
論文審査委員			
<p>学位論文審査の結果の要旨) ※明朝体 11 ポイント、600 字以内で作成のこと</p> <p>本論文では、ボルテゾミブの B 前駆細胞型急性リンパ性白血病細胞への治療効果に及ぼす影響およびその作用機序について検討を行い、以下の点を明らかにした。</p> <ol style="list-style-type: none">1) 骨髄間葉型幹細胞 (BM-MSCs) に接着した白血病細胞 (NALM-6) は抗がん剤に対する抵抗性が増す。2) ボルテゾミブの投与は、白血病細胞を骨髄間葉型幹細胞より遊離させる。3) ボルテゾミブは骨髄間葉型幹細胞において抗細胞接着因子である secreted protein acidic and rich cysteine (SPARC) の発現を増加させる。4) モデルマウスにて、ボルテゾミブとドキシソルビシンの併用は、マウスの生存期間を有意に伸ばす。 <p>本論文は、ボルテゾミブと抗がん剤の併用が、B 前駆細胞型急性リンパ性白血病細胞の治療抵抗性を改善し、患者の生命予後改善させうる可能性を始めて示した論文である。また最終試験として論文内容に関連した試問を実施したところ合格と判断されたので、博士(医学)の学位論文に値するものと認められた。</p> <p style="text-align: right;">(総字数 423 字)</p> <p style="text-align: right;">(平成 29 年 8 月 30 日)</p>			