

学位論文題名

# Paclitaxel によるアポトーシス誘導に MyD88 が関与する

## 学位論文内容の要旨

### [緒言]

Paclitaxel は、種々の癌に対して広範な抗腫瘍作用を示す。直接アクチンに結合、アクチン重合の安定化を介して細胞周期を G2/M 期で止め、細胞分裂を阻害する薬剤として開発された。また分裂阻害効果以外にも直接アポトーシスを誘導することも報告されているが、その詳細な機構は解明されていない。

マウスマクロファージでは Lipopolysaccharide (LPS) および Paclitaxel に反応し、Toll-like receptor (TLR)-4 / Myeloid differentiation factor 88 (MyD88) / tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 6 / Nuclear factor (NF) - $\kappa$ B の活性化とその後のサイトカイン産生が起こる。一方でヒトマクロファージでは、Paclitaxel は TLR-4 のシグナル伝達を使用しないと報告された。しかしながら Paclitaxel がヒトマクロファージや癌細胞に interleukin (IL)-1 や IL-8 を産生させるという報告や NF- $\kappa$ B を活性化するという報告があり、Paclitaxel によるシグナル伝達経路に MyD88 / TRAF 6 / NF- $\kappa$ B の経路が使用されている可能性を考えた。また Paclitaxel のアポトーシス誘導では caspase8 の活性化が起こり、MyD88 が caspase8 の上流にある Fas-associated Death Domain protein (FADD) と結合できる可能性があることが報告されている。そこで筆者は Paclitaxel によるヒトマクロファージ系細胞のアポトーシス誘導に MyD88 を基点とするシグナル伝達経路が関与する可能性を考え、検討した。

### [方法と結果]

1. ヒト骨髄単球性白血病細胞株の NF- $\kappa$ B 活性化: NF- $\kappa$ B の活性化を Gel Shift Assay で検討した。低濃度の Paclitaxel 処理によってヒト骨髄単球性白血病細胞株 2 種は NF- $\kappa$ B の活性化が起こった。
2. Dominant negative (dn) MyD88 導入株における NF- $\kappa$ B 活性化: RT-PCR で dn MyD88 導入株における dn MyD88 発現を確認後、NF- $\kappa$ B 活性化阻害の有無を Gel Shift Assay で検討した。control である vector 導入株では Paclitaxel 処理によって NF- $\kappa$ B の活性化が起こるが、2 種類の dn MyD88 導入株では、活性化は認められなかった。
3. Paclitaxel によるアポトーシス誘導: Paclitaxel および Ara-C によるヒト骨髄単球性白血病細胞株と dn MyD88 導入株におけるアポトーシス誘導を FACS 解析で検討した。ヒト骨髄単球性白血病細胞株では低濃度の Paclitaxel 処理によりアポトーシスが誘導された。dn MyD88 導入株 2 株では、親株や vector 導入株でのアポトーシス誘導に

比較し、50%近い抑制がみられた。dn MyD88 導入株での Ara-C によるアポトーシス誘導は抑制されなかった。

4. Paclitaxel による細胞周期誘導: Paclitaxel 処理後の細胞周期を FACS 解析で検討した。親株, vector 導入株, dn MyD88 導入株いずれも G2/M 期に細胞周期が停止し、明らかな差はなかった。

5. Dn TLR-4 導入株におけるアポトーシス誘導: Paclitaxel による dn TLR-4 導入株におけるアポトーシス誘導を FACS 解析で検討した。親株, control である vector 導入株, dn TLR-4 導入株 2 株いずれも、ほぼ同様にアポトーシスが誘導された。

#### [考案]

本研究で、低濃度の Paclitaxel により骨髄単球性白血病細胞のアポトーシスが誘導できること、Paclitaxel によるアポトーシス誘導機構には MyD88 の関与が示唆されることを明らかにした。

Paclitaxel によるアポトーシス誘導メカニズムの、詳細な機構は解明されていない。本研究では、骨髄単球性白血病細胞において MyD88 が Paclitaxel によるアポトーシス誘導のシグナル伝達経路に関与している可能性が示唆された。その下流シグナルについては、前述の caspase8, FADD の関与の可能性の報告をもとに Paclitaxel 処理後の MyD88 と FADD の結合について検討中である。

一方で MyD88 の上流のシグナルについては、従来の報告どおり TLR-4 が関与しないことが再確認された。Paclitaxel の抗腫瘍効果は従来アクチンの重合安定化を介した細胞周期停止が重要と報告されており、今回の検討では、dn MyD88 導入でアポトーシスが約半分にまで減少するが、細胞周期停止には殆ど影響がなかった。この結果は、アポトーシス誘導シグナルと細胞周期停止シグナルが独立して存在する可能性を示唆する。従来、細胞周期停止とアポトーシス誘導には時間的な差があるとする報告がある一方で、G2/M arrest 後にアポトーシスが起こるとする報告もあった。今回の検討でも、細胞周期停止シグナルの下流に MyD88 が存在すると考えれば矛盾せず、今後の検討が必要と思われる。

これまで Paclitaxel によるアポトーシス誘導には比較的高い濃度が必要であるとす報告が多かったが、今回の研究によって、骨髄単球性白血病細胞が低濃度でもアポトーシスすることが明らかとなった。本研究は、骨髄単球性白血病では MyD88 発現によって Paclitaxel の感受性が高く、化学療法抵抗性であることの多い骨髄単球性白血病に対して新しい多剤併用療法を開発できる可能性を示唆している。

#### [結語]

ヒト骨髄単球性白血病細胞では低濃度の Paclitaxel でアポトーシスが誘導されることが明らかとなった。また dn MyD88 導入によりアポトーシスが抑制されることから、アポトーシス誘導の機序に MyD88 が関与することが示唆された。このことは骨髄単球性白血病の治療で Paclitaxel が有用な薬剤で、新たな多剤併用療法の開発への可能性が示唆された。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浅 香 正 博

副 査 教 授 今 村 雅 寛

副 査 教 授 秋 田 弘 俊

## 学 位 論 文 題 名

### Paclitaxel によるアポトーシス誘導に MyD88が関与する

Paclitaxelは、細胞分裂を阻害する薬剤として開発された。また直接アポトーシスを誘導することも報告されているが、その詳細な機構は解明されていない。従来の報告から、癌細胞においてPaclitaxelによりサイトカインが産生され、そのシグナルにMyeloid differentiation factor 88 (MyD88)/ NF- $\kappa$ Bの経路が使用されている可能性があり、またMyD88がcaspase8の上流シグナルとして存在し、Paclitaxelによるアポトーシス誘導に関与する可能性がある。そこで本研究では、最初にヒト骨髄単球性白血病細胞でのPaclitaxelによるNF- $\kappa$ Bの活性化を検討し、次いでdominant negative MyD88 (dnMyD88) のNF- $\kappa$ B活性化の阻害を検討し有効性を確認した。そしてdnMyD88導入株を用いて、MyD88が Paclitaxelによるアポトーシス誘導に関与する可能性を検討した。dnMyD88と dominant negative Toll-like receptor -4 (dnTLR-4)はヒト骨髄単球性白血病細胞株U-937に導入した。NF- $\kappa$ B活性の解析にはGel Shift Assay を用いた。FACS解析でアポトーシスと細胞周期を検討した。まずヒト骨髄単球性白血病細胞でのPaclitaxel処理後のNF- $\kappa$ B活性を検討したが、低濃度Paclitaxel処理 (10 nM) でNF- $\kappa$ Bの活性化した。dnMyD88導入株ではNF- $\kappa$ Bは活性化せず、dnMyD88の有効性が確認された。次に同細胞でのアポトーシスを検討したが、低濃度Paclitaxel処理 (10 nM) でアポトーシスが誘導された。dnMyD88導入株ではPaclitaxel処理後のアポトーシス誘導は約50%抑制された。dnMyD88導入株での細胞周期を検討したが、dnMyD88の導入はPaclitaxel処理後の細胞周期停止に影響を与えなかった。dnTLR-4の導入ではPaclitaxel処理後のアポトーシス誘導は抑制されなかった。以上から本研究では、MyD88がPaclitaxelによる骨髄単球性白血病細胞のアポトーシス誘導のシグナル伝達に関与している可能性が示唆された。ヒト細胞ではTLR-4が関与しないと報告されていたが、本研究により再確認された。dnMyD88の導入は細胞周期停止には殆ど影響

がなく、このことはアポトーシス誘導と細胞周期停止のシグナルが独立しているか、MyD88の上流に細胞周期停止シグナルが存在する可能性を示唆する。従来Paclitaxelによるアポトーシス誘導には比較的高濃度(10 $\mu$ M)が必要とされていたが、骨髄単球性白血病細胞のアポトーシスは低濃度(10 nM)で誘導された。このことは骨髄単球性白血病がPaclitaxel感受性の高い可能性を示唆する。

口頭発表後、副査今村雅寛教授から、10nM以上での効果について、MyD88以外の分子の関与について、臨床検体等でのPaclitaxelの効果について、TLR-4以外のTLRの関与の可能性について、の質問があった。申請者はこれらに対し、10nM以上では効果はほぼ同等であること、bcl-2のリン酸化は認めなかったこと、臨床検体等での実験を検討中であること、TLR-2の発現があり関与については検討中であること、を回答した。次いで、副査秋田弘俊教授から、NF- $\kappa$ Bとアポトーシス誘導の関連について、dnMyD88導入によるアポトーシス誘導の抑制効果が部分的であることについて、臨床応用への展望について、の質問があった。申請者は、NF- $\kappa$ Bとアポトーシス誘導に関連がないこと、アポトーシス誘導には複数のシグナルが関与している可能性があること、臨床検体での解析などを経て臨床応用を検討していること、を回答した。さらに、主査浅香正博教授から、本実験の発案について、他の癌種のPaclitaxelの効果の検討およびその感受性について、などの質問があった。これらに対しては、いくつかの癌種での検討で骨髄単球性白血病細胞の感受性が高かったこと、乳癌など数種類検討したが、いずれも感受性は低かったこと、など回答した。最後に主査浅香正博教授が、上記審査員の質問に対する補足質問とその回答の確認を行って、公開発表を終了した。

本研究は、骨髄単球性白血病細胞がPaclitaxelに高い感受性を有することを示したことで、Paclitaxelによるアポトーシス誘導にMyD88が関与することを明らかにしたことで高く評価され、今後さらなる研究と将来の臨床応用が期待された。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。