

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 275 号		学位申請者	外山 政明
審査委員	主査	有馬 直道	学位	博士 (医学)
	副査	出雲 周二	副査	古川 龍彦
	副査	久保田 龍二	副査	吉満 誠

主査および副査の5名は、平成26年1月27日、学位申請者 外山政明 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) Combination Index (CI) の原理を教えてください。

(回答) 各薬剤単独及び一定のモル比における両者併用時の生理活性 (今回の場合は ATL 細胞増殖抑制効果) を比較し、各薬剤単独時における例えば 50% 阻害に必要な薬剤濃度を、併用時にはどの位の濃度で達成出来るかを示した指標。よって、 $CI > 1$  のときを拮抗的、 $CI = 1$  のときを相加的、 $CI < 1$  のときを相乗的と判定します。

質問2) Cepharanthine 以外の NF- $\kappa$ B 阻害薬との併用効果について検討は行ったか。

(回答) Cepharanthine 以外の NF- $\kappa$ B 阻害薬との併用効果について検討は行っていないが、ATL の治療に用いられている carboplatine や vincristine と TMNAA との併用効果について検討したところ、Cepharanthine と同様に相乗効果作用を示しました。

質問3) PBMC において、Cepharanthine は強い毒性を示している。本薬剤は臨床でも使用されているが問題はないのか。また、PBMC に対して  $10 \mu\text{M}$  の Cepharanthine で処理しているが、これは血中濃度より高い濃度なのか。

(回答) Cepharanthine  $10 \mu\text{M}$  ( $6.25 \mu\text{g/ml}$ ) は、通常臨床で投与することで得られる血中濃度 (ヒトに  $100 \text{ mg}$  の CEP を投与した場合の血中濃度は  $1464 \text{ ng/ml}$ ) よりはるかに高い濃度であり、問題ないと思われます。さらに、今回用いた PBMC はマイトーゲンでブラスト化し刺激を加えているために、未刺激の PBMC と比較して、NF- $\kappa$ B が高発現しているため、Cepharanthine に対する感受性が高くなっている可能性も考えられます。

質問4) Caspase 以外の apoptosis 関連遺伝子の変化の確認は行っているか。

(回答) Caspase 以外の apoptosis 関連遺伝子の変化の検討は行っていません。

質問5) TMNAA は HTLV-1 ウイルスを抑制するのか。

(回答) 細胞培養上清中の HTLV-1 p19 抗原量の減少は、TMNAA が MT-2 細胞の細胞増殖を抑制し、それに伴って HTLV-1 p19 抗原が減少しているためであり、TMNAA には直接的なウイルス抑制効果はありません。

質問6) SIT 細胞は PHA を入れて培養しているのか。

(回答) PHA は入れておらず、RPMI 1640 メジウムに 10% FBS と抗生物質を入れた培養液で細胞培養しています。

質問 7) 臨床で用いられている Cepharanthine は合剤であるが、今回用いた Cepharanthine は合剤か。

(回答) 合剤ではなく Cepharanthine のみの単剤です。

質問 8) 化合物ライブラリーは数万化合物あると思うのだが、どのようなアッセイ方法で評価を行ったか。

(回答) 今回アッセイを行った化合物総数は 100 個程度なので、全ての化合物に対して、通常の MTT アッセイで評価を行いました。

質問 9) 単独処理と併用処理の濃度は合わせるのが一般的か。

(回答) 特に決まりはありません。

質問 10) Cepharanthine の ATL に対する作用を検討した論文は報告されているか。

(回答) 現在のところ報告はありません。

質問 11) ATL 患者の PBMC 等の検体でこれらの薬剤の阻害作用の検討は行っているか。

(回答) ATL 患者検体では検討を行っていません。

質問 12) HTLV-1 感染が原因で引き起こされる病気は ATL, HAM などがあるが、TMNAA はどの病気の型を標的にしているのか。

(回答) 今回の研究では、急性型の ATL 患者由来の細胞株に対する効果について検討したので、現時点では急性型の ATL を標的にしています。他の型の ATL や HAM に対しては検討を行っていないため、今後検討したいと考えています。

質問 13) TMNAA の選択性が高い理由として予想される作用機序は。

(回答) まだ詳細な検討は行っていないが、DNA マイクロアレイ法を行い各種の解析を行った結果、cell adhesion 関連分子に対する作用が示唆されています。また、HTLV-1 感染 T 細胞、ATL 細胞、ATL 患者検体で共通して発現している HTLV-1 遺伝子の HBZ の関与が考えられますが、HBZ 自体に対する効果は確認できておりません。

質問 14) TMNAA とその誘導体の MN417 では、どちらが臨床応用に適していると考えられるか。

(回答) 細胞毒性と ATL 細胞に対する選択性を考慮すると TMNAA の方が臨床応用に適していると考えられます。

質問 15) Discussion の中で TMNAA によって G2 期で細胞周期が停止すると記してあるが、DNA の傷害などは起こしているか。

(回答) TMNAA 処理している状態から TMNAA を除去すると細胞の増殖が起こることから、今回の実験条件においては、DNA に対して傷害は与えていないと考えられます。

以上の結果から、5 名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士 (医学) の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。