

論文内容の要旨

Melatonin overcomes resistance to clofarabine in two leukemic cell lines by increased expression of deoxycytidine kinase.

メラトニンはクロファラビン耐性を示した 2 つの白血病細胞株において、その薬剤耐性を deoxycytidine kinase の発現増強によって克服する

日本医科大学大学院健康社会予防医学領域 小児・思春期医学

研究生 山西 未穂

Experimental Hematology Volume 43, Issue 3, 2015 掲載

薬剤耐性はがん治療において極めて重要な問題である。近年小児がん患者の予後は素晴らしい改善を示してきたが、腫瘍細胞が薬剤耐性を獲得してしまった小児がん患者の予後は依然極めて不良である。薬剤耐性を克服することは小児がん患者の治癒率向上のために重要である。

新しいヌクレオシドアナログ代謝拮抗薬のひとつであるクロファラビンは広範囲の細胞障害活性があり、再発・難治性の急性リンパ性白血病患者に対して寛解の達成と比較的長期的な維持に効果があることが知られており、再発・難治性急性リンパ性白血病に対して使用が承認されている薬剤でもある。本研究では、急性リンパ性白血病細胞株におけるクロファラビン耐性機序とその薬剤耐性を解除する方法について検討した。

まず T 前駆細胞系、B 前駆細胞系の 2 系統の急性リンパ性白血病細胞株からクロファラビン耐性細胞株を作成した。次にこの 2 系統細胞株の薬剤排出ポンプである ABCG2、MDR、MRP 1 の発現量をフローサイトメーターにて解析したが、薬剤感受性細胞株と薬剤耐性細胞株の間には発現量の有意差は認められなかった。

さらにクロファラビンが活性型となる為には細胞内リン酸化酵素であるデオキシシチジンキナーゼ (dCK) が必須であるため、dCK の mRNA 発現量を qPCR 法で解析した。薬剤耐性株では薬剤感受性株に比し dCK の mRNA 発現量は有意に低下していたため、dCK の発現低下が薬剤耐性機序に寄与していると考えられた。その為、薬剤耐性株における dCK の発現低下の原因を検討した。発現量が変化するためには、遺伝子突然変異による場合と、遺伝子そのものの塩基配列の変化を伴わずに DNA のメチル化やヒストンの化学修飾などによるエピジェネティック的な機序が考えられる。本研究ではエピジェネティック的な機序の関与について検討した。まず、プロモーター領域の CpG 配列のメチル化は遺伝子発現を強く抑制することが分かっているため、dCK のプロモーター領域にある CpG 配列のメチル化を解析した。DNA をバイサルファイト処理すると非メチル化シトシンはウラシルに変換され、メチル化シトシンは変換されない事を利用した Methylation Specific PCR(MSP)解析を行なった。薬剤感受性株と耐性株にメチル化に違いはなく、CpG 配列のメチル化は dCK の発現低下には寄与していないと考えられた。次にヒストンのアセチル化について検討した。細胞内のアセチル化を ELISA 法で解析した。全ヒストン H3, H4 のアセチル化はいずれも親株に比べて薬剤耐性株では有意に低下していた。つまり、ヒストンの低アセチル化により遺伝子発現量が低下している可能性が示唆された。dCK の遺伝子がヒストンのアセチル化により影響を受けているか確認するために、クロマチン免疫沈降法(ChiP 法)により dCK 遺伝子の発現にかかわるヒストン H3, H4 のアセチル化を評価したところ、SKW 3 の耐性株におけるヒストン H3 を除いて耐性株で低アセチル化していた。以上より低アセチル化ヒストンが dCK 遺伝子の発現低下に関与していることが示唆された。

このような耐性機序が明らかになったため、低アセチル化ヒストンを還元する薬剤について効果を検討した。メラトニンは睡眠ホルモンとして知られている物質であるが、ヒストンのアセチル化促進作用を持つことがわかっている。そこでメラトニンによる薬剤耐性解

除の可能性について検討した。まずは細胞株に直接影響を与えない濃度を検討し、500 μ モルまでは問題ないことが確認されたが、不眠症治療薬としての投与量より少ない 100 μ mol/L で実験を行った。メラトニン添加のもとで NALM6/Clo、SKW3/Clo では細胞死が促進され、dCK の mRNA 発現量も増加が認められた。さらに、ヒストンのアセチル化も増加し、ChIP 法で SKW3/Clo のヒストン H3 を除き、dCK 遺伝子プロモーターの反応が増加していた。ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬のボリノスタットを添加するとクロファラビン耐性細胞はメラトニンと同様に細胞死が促進される効果が示された。

本研究において、クロファラビン耐性は低アセチル化ヒストンにより起こっていた。メラトニンはこの耐性細胞株における低アセチル化ヒストンを元に戻し、クロファラビン耐性リンパ球性白血病細胞株に対するクロファラビン薬剤感受性を改善した。