

論文内容の要旨

Drug resistance to nelarabine in leukemia cell lines might be caused by reduced expression of deoxycytidine kinase through epigenetic mechanisms

白血病細胞株におけるネララビン耐性と  
エピジェネティックな機構によるデオキシシチジンキナーゼの発現低下について

日本医科大学大学院医学研究科 小児期・思春期医学分野

大学院生 吉田 圭志

Cancer chemotherapy and pharmacology 第89巻 第1号(2022)掲載

## 【背景】

薬剤耐性は白血病治療の主要な問題である。新たなプリンスクレオシドアナログであるネララビンは T 細胞急性リンパ性白血病の治療に用いられている。本研究では、急性リンパ性白血病細胞株におけるネララビン耐性の獲得機序の解明とその克服について調べた。

## 【方法】

B 前駆細胞系(BALL、NALM6)および T 前駆細胞系(Molt4、SKW3)の急性リンパ性白血病細胞株 4 種類に対してネララビンを持続的かつ段階的に暴露させ、限界希釈法を用いてネララビン耐性株を作製した。ネララビンの活性化に必要な酵素であるデオキシシチジンキナーゼ(dCK)の発現量をリアルタイム PCR で解析し、エピジェネティックな機序についてメチル化特異的 PCR(MSP)とクロマチン免疫沈降(ChIP)法で解析した。

## 【結果】

ネララビン耐性株では dCK の発現量が低下しており、B 前駆細胞系より T 前駆細胞系で dCK の発現量は有意に高かった。dCK 発現量低下にいたる機序の解明のため、MSP 解析を実施したが、dCK プロモーター領域のメチル化は、感受性株と耐性株の間に有意差を認めず、ChIP 法で dCK プロモーター領域に結合するヒストン H3 と H4 のアセチル化は感受性株と比較して耐性株で低下しており、また B 前駆細胞系より T 前駆細胞系で H3 と H4 のアセチル化は多かった。次に、ネララビン耐性の克服について、新たなヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害剤であるボリノスタットを用いた実験を行った。各細胞株をボリノスタットとともに 72 時間培養し、実験で使用するボリノスタット濃度を 0.1 $\mu$ mol/L と決定した。耐性株で減少した dCK 発現量は、ボリノスタットとともに培養することで有意に増加した。ボリノスタットの使用により、耐性株で H3 と H4 のアセチル化を増加させ、耐性株のネララビンによる細胞障害性を有意に増加させた。コンビネーションインデックスを算出することでネララビンとボリノスタットの組み合わせを評価した結果、相乗的な作用を有することが示された。

## 【考察】

本研究は、ネララビン代謝に重要な dCK の発現量低下によって、ネララビン耐性が獲得されることを明らかにした。また、耐性株における dCK プロモーター領域の H3 と H4 のアセチル化の減少を示した。ヒストンのアセチル化の増加は遺伝子発現量を増加させるエピジェネティックな機構であるが、本研究の MSP 解析では dCK プロモーター領域のメチル化に有意差を認めず、dCK の発現量低下はプロモーター領域の低アセチル化の結果と考えられた。DNA のメチル化による遺伝子の不活化は、in vitro での薬剤耐性獲得に直接的に関わるエピジェネティックな機構と知られているが、ヒストン脱アセチル化を含む他のエピジェネティックな機構も薬剤の耐性・感受性に関わる遺伝子の不活化に関与すると報告されている。また、HDAC 阻害剤のボリノスタットとの培養は耐性株の細胞障害性を著しく増加させた。dCK プロモーター領域のアセチル化状態の変化は耐性株の dCK 発現や ara-GTP 生成に影響を及ぼし、ネララビンの感受性を回復させた。ヒストン脱アセチル化の機構はネララビン耐性を理解するうえで重要な手がかりと考えられ、本研究ではボリノスタットはネララビン耐性を克服した。