

第二次審査（論文公開審査）結果の要旨

Methylation of PLK-1 Potentially Drives Bendamustine Resistance in Leukemia Cells

PLK-1 のメチル化が白血病細胞におけるベンダムスチンの薬剤耐性機序に関与している可能性がある

日本医科大学大学院医学研究科 小児・思春期医学分野
大学院生 板橋 寿和

Journal of Nippon Medical School, volume 91, number 2, April 2024 掲載予定

ベンダムスチン(BENDA)はリンパ腫に対して重要な薬剤であるが、耐性化の機序は完全には解明されていない。近年薬剤耐性化にエピジェネティックな変化が関与している事を示唆する報告があり、白血病細胞における BENDA 耐性化のメカニズムを特にメチル化の関与を中心に検討した。

ヒト B 細胞性リンパ芽球性白血病の親細胞(BALL/P)は理化学研究所から購入し、ベンダムスチン耐性 BALL 細胞(BALL/BENDA)、ドキソルビシン(ADR)耐性 BALL 細胞(BALL/ADR)並びにビンクリスチン(VCR)耐性 BALL 細胞(BALL/VCR)は限界希釈法で作成した。細胞毒性は BALL/P 細胞の生細胞数を 1 として相対値を求めた。BALL/BENDA、BALL/ADR、BALL/VCR は BALL/P と比較して BENDA に対して有意に高い耐性を示した($P<0.01$)。BALL/BENDA は BALL/ADR、BALL/VCR よりも BENDA に対して有意に高い耐性があった($P<0.05$)。BALL/ADR および BALL/VCR は ADR、VCR に対して共に高い耐性があったが、BALL/BENDA では共に軽度の耐性があった。MDR1 の発現は BALL/ADR と BALL/VCR でのみ認めた。続いて BENDA 代謝に関連する 7 つの候補遺伝子 (*Noxa*、*AuroraA*、*p21*、*PLK-1*、*cyclinB1*、*exo1*、*AuroraB*) の発現を qPCR にて定量化したところ、BALL/BENDA が他の細胞株に有意差を認めて低下していたのは *PLK-1* だけであり、以後の実験は *PLK-1* の発現を中心に行った。それぞれの細胞株に脱メチル化剤である 5-アザ-2'-デオキシシチジンを加えた細胞株(+)と、加えなかった細胞株(-)の *PLK-1* の発現を測定したところ、5-アザ-2'-デオキシシチジンを加えたことで、*PLK1* の発現が有意に増加したのは BALL/BENDA のみであった($P<0.001$)。各細胞株にコントロール、5-アザ-2'-デオキシシチジン、ベラパミル、ポリノスタットと 5 段階に希釈した BENDA を加え 72 時間インキュベートさせた後に細胞毒性を評価したところ、BALL/BENDA 細胞はポリノスタット、ベラパミルを加えても BENDA に対する耐性を維持していたが、5-アザ-2'-デオキシシチジンを加えたことで感受性が増した($P<0.01$)。BALL/ADR と BALL/VCR 細胞は 5-アザ-2'-デオキシシチジン、ポリノスタットを加えても BENDA に対する感受性は変化がなかったが、ベラパミルを加えたことで BENDA に対する感受性が増した($P<0.01$)。

P-糖タンパクである MDR1 は様々ながん治療薬に対して耐性化の原因となる。BALL/ADR、BALL/VCR は MDR1 の高発現を認めたが、MDR1 の発現を認めていない BALL/BENDA ではベラパミルを加えても薬剤感受性は変化しなかった。一方 BALL/BENDA では *PLK1* の発現が低下していた。脱メチル化剤である 5-アザ-2'-デオキシシチジンを投与することで *PLK1* の発現量が増え、薬剤感受性が回復したことから、*PLK1* のメチル化が薬剤耐性に関与していることが示唆された。

第二次審査では、BENDA に注目した理由について、メチル化の直接的証明について、*PLK-1* 低下のメカニズムについて、実際の患者に応用する計画について、細胞周期の正常化の効果についてなどの質疑がなされ、いずれも適切な回答が得られた。以上より、本論文は学位論文として価値あるものと認定した。