

## 論文審査の結果の要旨

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

メラトニンが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医学研究科 小児・思春期医学分野  
研究生 山西 未穂  
Experimental Hematology 2015; 43(3): 207-214 掲載

ヌクレオシドアナログ代謝拮抗薬の一つであるクロファラビンは、再発・難治性の小児急性リンパ性白血病患者に対してその有効性が知られている。しかし、クロファラビンに対しても薬剤耐性が生じ、必ずしもすべての患者に有効なわけではない。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の解明と、その克服の可能性について検討した。

申請者らは T 前駆細胞系(SKW3)、B 前駆細胞系(NALM6)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。まず薬剤排出ポンプである ABCG2, MDR, MRP1 の発現量をフローサイトメトリーにて解析したが、薬剤耐性細胞株と感受性細胞株の間に優位な差は無かった。次にクロファラビンが活性型になるために必須な deoxycytidine kinase (dCK) の mRNA 発現量を比較したところ、耐性株において優位に低下していることがわかった。そこで2つのエピジェネティック的機序について検討した。まずプロモーター領域の CpG 配列のメチル化については methylation specific PCR 解析の結果、耐性株と感受性株の間に差は認めなかった。次にヒストンのアセチル化について検討したところ、耐性株において優位に低下していた。クロマチン免疫沈降法 (ChIP 法) で H3 と H4 それぞれについて検討したところ T 前駆細胞系耐性株での H3 アセチル化以外は、両細胞系で低下していた。さらに申請者らはヒストンのアセチル化促進作用を持つメラトニンがこの薬剤耐性獲得機序を阻害できるか検討した。不眠症治療薬としての投与量より少ない 100  $\mu\text{mol/L}$  の添加により、両耐性細胞株とも細胞死が促進され、dCK の mRNA 発現量も増加し、ヒストンのアセチル化も促進されることがわかった。すなわちメラトニンはヒストンのアセチル化を正常化させることで、クロファラビン耐性を克服させる可能性が示唆されたことになる。

申請者らによって得られたこれらの知見は、小児急性白血病におけるクロファラビン耐性の獲得と難治化の機序を解明するばかりでなく、メラトニンという安全性の高い薬剤がその克服に有用である可能性を示したもので、小児急性リンパ性白血病の予後の改善に非常に期待されるものである。

第二次審査における議論として、1) 耐性株のクロナリティーについて、2) H3 アセチル化の両細胞系での違いについて、3) AraC など類似薬剤との違いについて、4) ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬ボリノスタットの可能性について、5) メラトニン受容体について、6) gene expression profile の検討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。