

氏名	たか がき かず ちか 高 垣 和 史
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学位記番号	論 薬 博 第 728 号
学位授与の日付	平 成 17 年 7 月 25 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	Ara-C 添加による白血病細胞の分化誘導および薬剤耐性メカニズムの 解析
論文調査委員	(主 査) 教 授 辻 本 豪 三 教 授 伊 藤 信 行 教 授 藤 井 信 孝

### 論 文 内 容 の 要 旨

代謝拮抗剤であるシタラビン (Ara-C) は、成人急性骨髄性白血病において最もよく使われる薬剤の一つである。Ara-C は細胞内で Ara-CTP に代謝された後、DNA 合成を阻害する。また、低容量の Ara-C 処理には分化誘導作用があることが知られている。Ara-C の作用機序については、代謝は良く解析されている一方で、DNA 合成停止後のシグナル伝達経路に関しては、ほとんど情報がなかった。そこで、申請者は転写レベルでの網羅的解析により白血病細胞の生体反応を詳細に調べることが出来ると考えて、独自の cDNA マイクロアレイを用いた解析の系を確立し、その結果をもとに、白血病治療において重要である Ara-C の薬剤耐性や分化誘導のメカニズム解析を行い、以下の知見を得た。

#### 第一章 Ara-C 処理した白血病細胞の cDNA マイクロアレイ解析

急性リンパ性白血病 (ALL) 細胞である CCRF-CEM 細胞は、Ara-C に感受性であり、Ara-C 処理により apoptosis を起こす。これに対して慢性骨髄性白血病 (CML) 細胞である K562 細胞は、Ara-C に比較的耐性であり、apoptosis を起こす前に、赤血球へ分化する。申請者は、Ara-C の白血病細胞におよぼす効果を解析するために、5 種類の株化白血病細胞より、常時転写されている遺伝子と Ara-C で誘導される遺伝子を搭載した cDNA マイクロアレイを作製し、Ara-C 処理により apoptosis へ進行する細胞 (CCRF-CEM) と、分化する細胞 (K562) の遺伝子発現変動を網羅的に解析した。Ara-C 処理により、CCRF-CEM 細胞では、シャペロン遺伝子群の発現が抑制されており、K562 細胞では、ヘモグロビン遺伝子群の発現が誘導されていた。また、K562 細胞では Ara-C 処理によって asparagine 合成酵素遺伝子に著しい発現抑制が見られた。この酵素は、抗がん剤 L-asparaginase の効果を減弱させることが知られており、Ara-C 処理の後 L-asparaginase 処理を行うと、相乗的な併用効果が得られた。このように、Ara-C による asparagine 合成酵素の抑制が重要な役割を果たしていることが示唆された。

#### 第二章 CCRF-CEM 由来 Ara-C 耐性細胞の発現プロファイリング解析

薬剤耐性メカニズム解析からその克服につながる知見を得ることを目的として薬剤耐性白血病細胞の発現プロファイル解析を行った。最初に、CCRF-CEM 細胞を Ara-C に馴化させることにより Ara-C 耐性細胞を得た。次に、Ara-C 耐性細胞と野生型細胞の遺伝子発現プロファイルを比較した。Ara-C 耐性細胞において adenosinedeaminase (ADA) 遺伝子が高度に発現誘導されていた。一方で、Ara-C の取り込みに関与する equilibrative nucleoside transporter 1 (ENT1) といくつかの細胞周期に関係する遺伝子の発現が抑制されていた。この中で、ENT1 遺伝子が Ara-C 耐性に関与している可能性が高いと考え、その役割を調べるために、ENT1 遺伝子を Ara-C 耐性細胞に導入した。この細胞は、増殖速度、Ara-C の取り込み速度、および ADA の発現量などの点で、遺伝子導入をしていない Ara-C 耐性細胞よりも野生型の細胞により近い性質を示した。ENT1 遺伝子の発現が抑制されると、細胞外から Ara-C を含むヌクレオシドの取り込みが阻害され、細胞内ヌクレオシドが枯渇し、その結果、Ara-C 耐性細胞は増殖速度が低下すると考察することができた。また、耐性細胞においては細胞周期のチェックポイント制御に関与する Chk2 のリン酸化レベルが常に上昇しており、ENT1 導入でそのリン酸化レベルは低下した。申請者は、以上の様に ENT1 遺伝子の発現抑制が Ara-C 耐性に深く関与することを明らかにした。

### 第三章 Ara-C による K562 細胞の分化誘導における checkpoint kinase 1/2 の役割

ヒト CML 細胞である K562 細胞は、Ara-C に比較的耐性であり、Ara-C 処理ですぐに apoptosis に向かうのではなく、赤血球に分化することが知られている。申請者は、Ara-C が K562 細胞に分化を誘導するメカニズム解明を行った。最初に、Ara-C による K562 細胞の分化は、DNA 損傷ストレス応答の制御に中心的な役割を果たす ATM/ATR の阻害剤であるカフェインで完全に抑えられることを見いだした。さらに、Ara-C は、checkpoint kinase 1 (Chk1) および checkpoint kinase 2 (Chk2) の両方を活性化しており、カフェインは、Chk2 ではなく Chk1 の活性化のみをほぼ完全に抑えていた。次に、Ara-C 誘導性の分化において Chk1 および Chk2 活性化の重要性を直接検証するために、Chk1 特異的阻害剤 G66976、Chk2 遺伝子 dominant-negative 型の過剰発現、あるいは siRNA による gene silencing の方法を用いて、Chk1 あるいは Chk2 の抑制実験を行った。その結果、Ara-C 誘導性の K562 細胞の赤血球への分化には、Chk1 および Chk2 の両方の経路を介するシグナル伝達が必要であることが明らかになった。

以上、申請者は、転写レベルでの網羅的解析とその結果に基づく分子生物学的検討により、Ara-C 耐性細胞において ENT1 トランスポーターの発現抑制が重要であること、および、Ara-C による分化誘導には DNA 損傷ストレス応答に関与する Chk1 および Chk2 の両方のシグナル伝達系が重要であることを明らかにした。本研究の成果は白血病治療において重要な薬剤耐性や分化誘導のメカニズム解明に有用な知見であり、新たな薬剤併用のデザインや治療薬開発の基礎的な資料となるものである。

#### 論文審査の結果の要旨

代謝拮抗剤であるシタラビン (Ara-C) は、成人急性骨髄性白血病において最もよく使われる薬剤の一つである。Ara-C の細胞内代謝機構に関しては解析が進んでいるが、その一方で耐性株の出現により長期寛解に至らないという点が臨床上重要な問題として残されている。また、少量の Ara-C には分化誘導作用があり、治療への応用が注目されているが、その分子生物学的なシグナル伝達経路に関しては、ほとんど情報がなかった。

申請者は生体制御や薬物応答に関する情報を網羅的に転写レベルで収集、解析するために、独自の cDNA マイクロアレイを用いた系を確立した。その結果をもとに、白血病治療において重要である Ara-C の薬剤耐性や分化誘導のメカニズム解析を行い、以下の知見を得た。

##### 1) Ara-C 処理した白血病細胞の cDNA マイクロアレイ解析

申請者は、DNA マイクロアレイの結果から、Ara-C に対して比較的耐性である慢性骨髄性白血病細胞株である K562 細胞において asparagine synthetase の発現が抑制されることを発見し、Ara-C を投与した24時間後に L-asparaginase を投与すると相乗的な抗ガン効果が得られることを検証した。また、ガン治療における分子標的の1つであるシャペロン分子の発現抑制も観察されたことから、シャペロン分子を標的とする化学療法剤と Ara-C の併用も耐性克服に有用であることを示唆する生物学的根拠を示した。

##### 2) CCRF-CEM 由来 Ara-C 耐性細胞の発現プロファイリング解析

申請者は、実験室で樹立した Ara-C 耐性細胞の解析からヌクレオシドトランスポーターの発現抑制が薬剤耐性に重要であることを発見した。また、同時に検出できたプリン-サルベージ回路に関与する adenosine deaminase の発現誘導から、このタイプの耐性細胞内で生じているヌクレオシドの枯渇が耐性克服の糸口となる可能性を示した。

##### 3) Ara-C による K562 細胞の分化誘導における checkpoint kinase 1/2 の役割

申請者は、K562 細胞の Ara-C による分化誘導に関するシグナル伝達経路に関して、DNA 損傷によるシグナル伝達系の関与を検討し、細胞周期チェックポイント蛋白質 Chk1 を経由するシグナル伝達経路と Chk2 を経由するシグナル伝達経路の両方が Ara-C による K562 細胞の赤血球への分化誘導に重要であることを見いだした。

本研究は、遺伝子発現における網羅的なプロファイル解析の手法を応用することにより、白血病の薬物治療において重要な薬剤耐性や分化誘導のメカニズム解明に有用な知見を提供するものであり、新たな薬剤併用のデザインや治療薬開発に有用な基礎的知見を提供するものである。

よって、本論文は博士(薬学)の論文として価値あるものと認める。

更に、平成17年5月27日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。