

論文内容の要旨

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 第91巻 第2号(2024) 掲載予定

【緒言】ベンダムスチン(BENDA)はリンパ腫に対して重要な薬剤であり、抗腫瘍効果は研究されているが、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。

【実験】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た。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つた($P<0.05$)。BALL/ADR および BALL/VCR は ADR、VCR に対して共に高い耐性があつたが、BALL/BENDA では共に軽度の耐性があつた。BALL/P は共に感受性があつた。

各細胞株で *MDR1* の高発現をフローサイトメトリーで確認したところ BALL/ADR と BALL/VCR でのみ認めた。続いて BENDA の細胞内で代謝に関連する 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、BALL/P との相対値で算出したところ、BALL/BENDA が他の 3 つの細胞株全て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。

BALL/P、BALL/BENDA、BALL/ADR、BALL/VCR の細胞株に脱メチル化剤である 5-アザ-2'-デオキ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 qPCR にて測定した。BALL/P (-)を 1 とした時、それぞれの細胞株の相対値を表した。5-アザ-2'-デオキ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 のみであつた($P<0.001$)。

各細胞株にコントロール、5-アザ-2'-デオキシチジン、ベラパミル、ボリノスタットと 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。BENDA の濃度が 0 でコントロールとした細胞株の生細胞を 1 としそれぞれの相対値を求めた。BALL/P 細胞はどの薬剤を加えても BENDA に対して感受性があつた。BALL/BENDA 細胞はボリノスタット、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'-デオキシチジン、ボ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($P<0.01$)。

【考察】P-糖タンパク質である *MDR1* は様々ながん治療薬に対して薬剤の排泄促進することで耐性化の原因となり、BENDA に対する耐性にも関連していることが報告されている。BALL/ADR、BALL/VCR は *MDR1* の高発現を認めており、これらの細胞は *MDR1* を介して BENDA に対する耐性があつたことが示唆された。またこれらの細胞に *MDR1* 阻害薬であるベラパミルを投与したところ BENDA に対する細胞毒性が増強した。逆に *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。

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。

化学療法の感受性や抵抗性に関連する遺伝子の不活性化にはヒストンの脱アセチル化などの他のエピジェネティックなメカニズムも関与していることが報告されているが、我々の実験では HDAC 阻害剤であるボリノスタットを加えても細胞毒性は増加しなかった。

以上のことから PLK-1 遺伝子のメチル化が PLK-1 の発現調節に極めて重要な役割を果たし、白血病細胞におけるベンダムスチン耐性の発現に中心的な役割を果たしている事を示している。