

## 学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
三好拓児	主査 教授 花房 俊昭
	副査 教授 田窪 孝行
	副査 教授 大槻 勝紀
	副査 教授 林 秀行
	副査 教授 谷川 允彦
主論文題名 Cloning and characterization of a human BCR/ABL-positive cell line, K562/RR, resistant to the farnesyltransferase inhibition by tipifarnib (tipifarnib 耐性細胞株 K562/RR の樹立とその解析)	
学位論文内容の要旨	
<p>《研究の背景および目的》</p> <p>分子生物学の進歩により、細胞の生存・分化・増殖に関する情報伝達系の異常が腫瘍発生の一因となることが明らかにされた。これらを制御する分子標的薬の研究開発が進み、血液腫瘍を始めとした多くの疾患の治療に分子標的療法が応用されつつあるが、その作用機序にはまだ不明な点が多い。</p> <p>腫瘍細胞においてしばしば RAS の異常活性を認めるが、我々は RAS の活性化に必要なステップであるファルネシル化を担う酵素、farnesyltransferase (FT) とその阻害薬 (FTI) である tipifarnib に注目した。tipifarnib は様々な血液腫瘍においてその有用性が報告されている薬剤である。しかし投与初期に抗腫瘍効果が得られた場合でも、比較的短期間で病勢が再燃してしまうケースがあり、薬剤耐性機序の解明とその克服が課題となっている。そこで本研究では tipifarnib 耐性細胞株 K562/RR を樹立し、その耐性機序を検討した。</p> <p>《材料と方法》</p> <p>慢性骨髄性白血病細胞(CML-BC)由来の BCR/ABL 陽性細胞株 K562 に少量の tipifarnib を加えて培養し、その薬剤濃度を徐々に上昇させることにより耐性株を樹立し K562/RR と名付けた。親株 K562 と耐性株 K562/RR を材料に、以下の検証を行った。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) アポトーシス解析             <ul style="list-style-type: none"> <li>annexin V 陽性細胞の比率(フローサイトメトリー)</li> <li>アポトーシス関連物質の増減(ウエスタンブロット)</li> </ul> </li> <li>2) 細胞周期解析(フローサイトメトリー)</li> <li>3) ファルネシル化と情報伝達系蛋白質の解析(ウエスタンブロット)             <ul style="list-style-type: none"> <li>次の蛋白について検討</li> <li>HDJ2, caspase-3/7/9, PARP, Bcl-2, BCR, ERK1/2, AKT, JNK/SAPK</li> </ul> </li> <li>4) FT <math>\alpha</math> および <math>\beta</math> 遺伝子の塩基配列の変異解析</li> <li>5) 遺伝子発現解析 (Filgen array Human25k cDNA microarray)</li> </ol>	

## 《結果》

樹立された K562/RR の薬剤耐性強度は IC<sub>50</sub> 値で評価した。tipifarnib の IC<sub>50</sub> 値は、K562 0.432±0.282 μM、K562/RR 3.198±0.791 μM であり、耐性株で 7.4 倍を示した。tipifarnib により K562 ではアポトーシスが誘導されるのに対して K562/RR は殆どアポトーシスを起こしていないことが判明した。アポトーシス関連物質は K562 においてのみ著増していることがウエスタンブロットにおいて確認され、この耐性にはアポトーシスのシグナル伝達の障害が関与していることが示唆された。

細胞周期に関しては、K562 では tipifarnib により G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期の細胞比率が著減し、S 期の細胞が増加していることが確認され、G<sub>2</sub>/M checkpoint の活性化が示唆されたが、K562/RR においてはそのような変化は認められなかった。

tipifarnib によるファルネシル化の障害について、ファルネシル化を受ける蛋白質 HDJ-2 で検討した。両細胞株ともにファルネシル化が阻害されていることがウエスタンブロットにて確認された。FT α および β の遺伝子について、両細胞株ともに突然変異のないことが確認された。これらにより K562/RR の耐性は FT 活性に非依存性であることが示唆された。

細胞情報伝達系の検討として、BCR/ABL およびその下流の ERK1/2、また AKT の蛋白量をウエスタンブロットにて検討したが、両細胞株ともに tipifarnib 投与後に変化は認められなかった。一方、リン酸化 JNK/SAPK レベルが K562 より K562/RR において増大していたことから、JNK/SAPK 阻害薬である SP600125 と tipifarnib を併用することにより耐性が解除されるか否かを次に検証した。両者の併用効果を isobologram 法で確認したところ、相乗効果ではなく相加的效果に留まっており、耐性との関連は低いものと考えられた。

DNA microarray 解析により、K562 より K562/RR での遺伝子発現量が2倍以上多いものが 25 遺伝子同定され、そのうち real-time PCR にて発現増加が確認された遺伝子は、CUGBP2、HBB、CAV2、FEN1、TRIM56 の5つであった。CUGBP2 (CUG tripletrepeat RNA binding protein) は cyclooxygenase 2 (COX-2) の発現に関与していることから、アポトーシスの障害に関与している可能性が考えられた。そこで両細胞株の COX-2 発現レベルを調べたが、差違は認められなかった。更に COX-2 阻害薬である nimesulide を tipifarnib と併用したが、IC<sub>50</sub> および細胞周期に大きな変化は認められなかったことから COX-2 の耐性への関与はないものと考えられた。

## 《考察》

分子標的薬は腫瘍の発生・増殖機序に応じてデザインされる疾患特異的な治療薬であり、血液腫瘍を始めとする多くの疾患において期待を集めている。しかしながら生体内の情報伝達系は非常に複雑なクロストークを有しており、単一の標的分子の働きを阻害しても、期待通りにその効果を発揮するとは限らないし、逆に予想外の薬効をもたらすこともある。従って丹念にその作用点並びに耐性機序を検討し、分子標的薬を併用することなどによって、より高い抗腫瘍効果を引き出す試みが今後も求められる。

FTI に対する耐性株は殆ど報告がない中で、今回我々が樹立した K562/RR は血液腫瘍細胞から樹立された初めての細胞株である。今回の耐性機序の検討は重要な情報をもたらしたと思われ、また他剤との交叉耐性も認めなかったことから、今後の分子標的薬研究において良い実験モデルになると考えられる。

## 審査結果の要旨および担当者

報告番号	乙 第 号	氏 名	三好拓児
論文審査担当者		主査 教授 花房 俊昭	
		副査 教授 田窪 孝行	
		副査 教授 大槻 勝紀	
		副査 教授 林 秀行	
		副査 教授 谷川 允彦	
主論文題名			
Cloning and characterization of a human BCR/ABL-positive cell line, K562/RR, resistant to the farnesyltransferase inhibition by tipifarnib (tipifarnib 耐性細胞株 K562/RR の樹立とその解析)			
論文審査結果の要旨			
<p>細胞の腫瘍化をもたらす異常な情報伝達系の活性を特異的に阻害する分子標的薬に、近年大きな期待が寄せられている。farnesyltransferase inhibitor (FTI) である tipifarnib は分子標的薬の一つであり、RAS の活性化を抑制することにより腫瘍の増殖を抑制することが期待された薬剤である。しかし、抗腫瘍効果は確認されたものの、その効果の持続は比較的短期間に終わり、薬剤耐性が生じてしまうことが報告されるようになった。本研究は BCR/ABL 陽性の tipifarnib 耐性細胞株 K562/RR を樹立し、その耐性機序を検討したものである。</p> <p>申請者は tipifarnib 耐性株を樹立したのち</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>(1) FT 非依存性の耐性であること</li> <li>(2) アポトーシスの抑制が生じていること</li> <li>(3) 細胞周期において G<sub>2</sub>/M accumulation が解除されていること</li> <li>(4) 細胞情報伝達系について tipifarnib 投与後も RAS-MAPK 系、PI3K/AKT 系、JNK 系には耐性化に関与する変化は見られないこと</li> <li>(5) 遺伝子発現解析にて耐性化の主因となる遺伝子は特定できなかったこと などを明らかにしている。</li> </ol> <p>本研究は、血液腫瘍細胞由来で初となる FTI 耐性株を樹立し、その作用機序および耐性機序に関して新しい知見を見出している。今後の分子標的薬研究において良い実験モデルを提供していると考えられる。</p> <p>以上により、本論文は本学学位規程第 3 条第 2 項に定めるところの博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。</p> <p>(主論文公表誌)</p> <p>Experimental Hematology 35(9): 1358-1365, 2007</p>			