



Increased sensitivity of multidrug-resistant myeloid leukemia cell lines to lovastatin

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: LOLA, MAKSUMOVA メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1197

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 344号	学位授与年月日	平成13年 3月27日
氏 名	LOLA MAKSUMOVA		
論文題目	Increased sensitivity of multidrug-resistant myeloid leukemia cell lines to lovastatin (多剤耐性骨髓性白血病細胞のロバスタチンに対する感受性の増加)		

博士(医学) LOLA MAKSUMOVA

論文題目

Increased sensitivity of multidrug-resistant myeloid leukemia cell lines to lovastatin

(多剤耐性骨髄性白血病細胞のロバスタチンに対する感受性の増加)

論文の内容の要旨

〔目的〕

ロバスタチンはハイドロオキシメチルグルタリルCoA (HMG-CoA)還元酵素の競合阻害剤であり、腫瘍細胞に対し強い増殖抑制作用と、アポトーシス誘導効果、細胞周期(G₀/G₁)停止効果を示す事が知られている。さらにロバスタチンは骨髄腫、乳がん、神経芽腫では多剤耐性細胞により強く作用する事が報告されている。

本研究では、多剤耐性骨髄性白血病細胞における多剤耐性遺伝子(P糖蛋白)の発現とロバスタチンに対する感受性の関連を明らかにする事を目的とした。

〔方法〕

ヒト骨髄性白血病細胞株(K562、NOMO-1)とそのアドリアマイシン耐性株(K562/ADR、NOMO-1/ADR)、NB4とレチノイン酸耐性株NB4/RA、及びそれに多剤耐性(MDR)遺伝子を導入した耐性株(NB4/MDR、NB4/RA/MDR)にロバスタチンを添加し0.1~100 μ Mの濃度で48時間培養し、殺細胞効果を検討した。細胞の生存はMTT法で測定、アポトーシスはPI染色によりフローサイトメトリーで測定し、DNA断片化により確認した。P糖蛋白発現はビオチン化したMPK16単クローン抗体を用いてフローサイトメトリーで測定した。MDR遺伝子、HMG-CoA還元酵素のmRNA発現量はPT-PCR法により半定量測定を行った。

〔結果〕

ロバスタチンは、P糖蛋白発現細胞K562/ADR、NOMO-1/ADR、NB4/RA/MDRに対しその親株よりもより強く増殖抑制効果、アポトーシス誘導効果を示した。一方、NB4はロバスタチンに対して最も感受性が高く、NB4/MDRと親株との間に感受性に差がなかった。HMG-CoA還元酵素のmRNAは、NB4/MDR以外では親株に比べ耐性株に有意に多く発現されていた。また、ロバスタチン処理により親株ではHMG-CoA還元酵素が誘導されたが耐性株では誘導されず、これは一部には酵素機能喪失にたいする代償機構が耐性株では働かないためと考えられた。

興味深い事にNB4のレチノイン酸耐性株は、NB4よりロバスタチンに対する感受性が低く、これは、レチノイン酸に対する反応性とロバスタチンに対する感受性が相関するという最近の知見を支持するものである。一方、多剤耐性レチノイン酸耐性NB4は親株より有意に高いHMG-CoA還元酵素を発現しており、ロバスタチンにより強くアポトーシスが誘導された。

〔考察および結論〕

骨髄性白血病細胞株において、その多剤耐性遺伝子発現細胞ではHMG-CoA還元酵素のレベルが有意に高く、それがロバスタチンに対する高感受性につながると考えられた。これはP糖蛋白の発現とメバロン

酸代謝とが密接に関連している事によると推測された。

論文審査の結果の要旨

ロバスタチンはハイドロオキシメチルグルタリルCoA (HMG-CoA)還元酵素の競合阻害薬であり、P糖タンパクをコードする多剤耐性(MDR)-1遺伝子を発現する腫瘍細胞の増殖を抑制し、アポトーシスを誘導することが報告されている。そこで、申請者らは多剤耐性骨髄性白血病細胞株を用いて、P糖タンパクの発現とロバスタチンに対する感受性の関連を検討した。得られた主な結果は以下の通りである。

(1)P糖タンパクの発現：ヒト慢性骨髄性白血病細胞株K562および骨髄単球性白血病細胞株NOMO-1とそれらのアドリアマイシン耐性株K562/ADR、NOMO-1/ADR、および前骨髄性白血病細胞株NB4とそのレチノイン酸耐性株NB/RA、およびMDR遺伝子導入株NB4/MDR、NB4/RA/MDRを用い、MDR-1遺伝子発現をRT-PCRで、MDR-1遺伝子産物(P糖タンパク)発現をMPK16単クローン抗体を用いたフローサイトメトリーで検討した。その結果、K562/ADR、NOMO-1/ADR、NB4/MDR、NB4/RA/MDRにMDR-1mRNAが検出され、P糖タンパク発現を認めた。(2)ロバスタチン感受性：これらP糖タンパク発現株に対し、一般的にロバスタチンはそれらの親株よりも強い増殖抑制効果、およびアポトーシス誘導効果を示した。しかし、NB4はそれ自身既にロバスタチンに対し強い感受性を示した。興味あることに、NB4/RAは親株よりも低い感受性を示した。(3)HMG-CoA還元酵素mRNA発現：HMG-CoA還元酵素mRNAはすべての親株においてロバスタチン処理により誘導されたが、NB4/MDRを例外として、耐性株ではロバスタチン処理なしでも強く発現しており、ロバスタチンによる誘導は認めなかった。NB4/RAもロバスタチンによりHMG-CoA還元酵素mRNAを誘導的に発現し、NB4/RA/MDRは上記耐性株と同様の発現パターンを示した。

以上より、申請者らは骨髄性白血病細胞株の多剤耐性遺伝子発現細胞では、P糖タンパクの発現とメバロン酸代謝は密接に関連しているため、HMG-CoA還元酵素が有意に高くなり、これがロバスタチンに対する高感受性につながると推察した。また、レチノイン酸に対する反応性とロバスタチンに対する感受性が相関することも示された。

審査委員会では、これらの結果は多剤耐性遺伝子発現白血病細胞に対するロバスタチンの作用機序の解明に端緒を与えるものとして高く評価した。

以上の研究に対し、審査委員会では以下の質疑を行った。

- 1) ロバスタチンの抗腫瘍効果の機序について
- 2) ロバスタチンは腫瘍特異的に効果を示すか
- 3) ロバスタチンにより誘導されるアポトーシスの機序について
- 4) 用いた細胞株は培養時に同調させたか
- 5) P糖タンパクの発現は細胞周期の影響を受けないか
- 6) NB4/RA突然変異株は人工的に誘導したものか
- 7) MTTアッセイの原理について
- 8) この試験管内試験で用いたロバスタチンの量は生体に投与可能な量か
- 9) NB4がロバスタチンに高感受性である理由は

- 10) レチノイン酸反応性とロバスタチン感受性は何故相関するか
- 11) ロバスタチンによるHMG-CoA還元酵素mRNA発現機構について
- 12) P糖タンパクはロバスタチンを細胞外へ輸送しないか

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で判定した。

論文審査担当者	主査	小 出 幸 夫	
	副査	瀧 川 雅 浩	副査 渡 邊 裕 司