

論文審査の要旨

報告番号	総研第 716 号	学位申請者	中川 俊輔
審査委員	主査	石塚 賢治	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	谷本 昭英	副査 榎田 英樹
	副査	吉満 誠	副査 鈴木 紳介

Association between Dysfunction of the Nucleolar Stress Response and Multidrug Resistance in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia

(小児急性リンパ性白血病における核小体ストレス応答の機能障害と多剤耐性との関連について)

核小体ストレス応答は actinomycin-D (ActD) や 5-FU などの薬剤でリボソーム RNA (rRNA) の合成が抑制されることで起動する。核小体内のリボソーム蛋白質 L11 (RPL11) が核小体内から核質に放出され、MDM2 と結合する。その結果、P53 が安定化し、増加し、細胞増殖が抑制される。これまで小児腫瘍を対象とした核小体ストレス応答に関する研究は報告されていない。小児急性リンパ性白血病 (ALL) では TP53 変異の頻度が低いため P53 を制御する機構の異常は予後に関連する可能性がある。小児 ALL において、核小体ストレス応答が再発や治療抵抗性に関連すると推測した。

A. 最初に、ALL 細胞で核小体ストレス応答が機能することが知られていなかったため、ActD を用いて TP53 野生型の ALL 細胞株 (NALMB/RS4:11) で実験を行い下記のような結果を得た。

- 1) RPL11 を knock down (KD) した細胞は ActD に抵抗性を示し apoptosis を抑制したが、MDM2 阻害剤である HDM201 の効果は RPL11 に影響を受けなかった。
- 2) ActD は P53 タンパク質およびその下流遺伝子 (P21, MDM2, Nox) の発現を亢進させたが、RPL11 を KD した細胞では発現が抑制された。
- 3) ActD は rRNA の mRNA の発現を抑制し、nucleophosmin を核小体から核質に拡散させ、MDM2 と RPL11 の結合を増加させた。

以上の結果から、小児 ALL の細胞株においても、核小体ストレス応答が機能することが明らかとなった。

B. 次に、小児 ALL の治療で使われる薬剤を用いて ActD と同様の実験を行い、下記のような結果を得た。

- 1) RPL11 を KD すると 6-mercaptopurine (6MP), methotrexate (MTX), daunorubicin (DNR), cytarabine (AraC) の感受性が低下し、アポトーシスが減少した。
- 2) RPL11 を KD すると、6MP, MTX, DNR, AraC による P53 タンパク質やその下流の遺伝子の発現が抑制された。
- 3) これら 4 薬剤は rRNA の mRNA の発現を抑制し、核小体の崩壊を誘導し、RPL11 と MDM2 の結合を増加させた。

以上から、6MP, MTX, DNR, AraC が核小体ストレス応答を誘導し、P53 を介した抗腫瘍作用を有することが示唆された。

C. 最後に、小児 ALL 再発患者の白血病細胞を用いて実験を行い、下記のような結果を得た。

- 1) 再発患者 9 人中 7 人で診断時と比較して RPL11 mRNA 発現が減少した。
- 2) 患者の白血病細胞では、再発時に RPL11 タンパク質が減少し、6MP, MTX, DNR, AraC に対する感受性が低下した。

以上の結果から、再発 ALL 患者において核小体ストレス反応の低下が、多剤耐性に関連していることが示唆された。

今回の結果から、小児 ALL において再発時の RPL11 の発現低下による核小体ストレス応答の抑制が、6MP, MTX, DNR, AraC に対する薬剤耐性と関連していることが考えられた。この 4 種類の薬剤は小児 ALL の治療において必須の薬剤なので、核小体ストレス応答の抑制による薬剤耐性は再発と関連すると推察した。また、6MP, MTX, DNR, AraC は白血病や他のがんにおいて核小体ストレス応答を誘導することは報告されておらず、核小体ストレス応答は新規の抗腫瘍作用機構と考えられた。小児の再発 ALL では、いくつかの薬剤耐性に関連する遺伝子変異が報告されているが、リボソーム蛋白質に関連する機構や多剤耐性に関わる機構は報告されていない。本研究では、核小体ストレス応答の抑制が、アントラサイクリン系薬剤、プリンアナログ系薬剤、酪氨酸酪氨酸阻害剤など複数種類の薬剤に抵抗性を示すことが示唆され、小児再発 ALL の治療戦略に与える影響は大きいと考えた。

小児 ALL 症例のほとんどが野生型の TP53 を有することから、核小体ストレス応答は有効な治療標的と思われる。核小体ストレス応答は、DNA に損傷を与えることなく P53 を活性化するため、核小体ストレス応答に特異的な治療は二次がんの発症を抑制することが期待でき、治療後の人生が長い小児にとって重要な意義がある。

本研究の限界として、使用した細胞株が 2 種類のみだったこと、*in vivo* の評価を行っていないこと、患者数が少ないことが挙げられる。マウスを用いた実験や対象の再発 ALL 患者を増やした検討が必要である。

本研究では、6MP, MTX, DNR, AraC の新しい抗腫瘍機構として核小体ストレス応答を特定し、RPL11 の発現低下による核小体ストレス応答の機能不全が多剤耐性に関与している可能性を示した。小児 ALL において核小体ストレス応答が多剤耐性を克服する治療戦略となり得ることを示した点で興味深い。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。