

学位授与番号：甲 1106 号

氏 名：菱木 光太郎

学位の種類：博士（医学）

学位授与日付：令和 1 年 5 月 22 日

学位論文名：

NF- κ B signaling activation via increases in BRD2 and BRD4 confers resistance to bromodomain inhibitor I-BET151 in U937 cells.

（BRD2 および BRD4 の増加による NF- κ B シグナル伝達の活性化は、U937 細胞におけるプロモドメイン阻害剤 I-BET151 に対する耐性を付与する）

学位論文審査委員長：教授 馬目佳信

学位論文審査委員：教授 吉田清嗣 教授 矢野真吾

論文要旨

氏名	菱木光太郎	指導教授名	玉利真由美教授
<p>主論文 NF-κB signaling activation via increases in BRD2 and BRD4 confers resistance to bromodomain inhibitor I-BET151 in U937 cells (BRD2 および BRD4 の増加による NF-κB シグナル伝達の活性化は、U937 細胞におけるプロモドメイン阻害剤 I-BET151 に対する耐性を付与する) Kotaro Hishiki, Masaharu Akiyama, Yumi Kanegae, Koji Ozaki, Miyuki Ohta, Emi Tsuchitani, Ken Kaito, Hisashi Yamada Leukemia Research. 2018; 74: 57-63.</p> <p>要旨</p> <p>【背景・目的】 白血病をはじめとするがん細胞の増殖に BRD を介する転写機構が関与していることが明らかにされた。この BRD とヒストンのアセチル化リジンとの結合を抑制する低分子化合物 BET 阻害剤により増殖が抑制される。現在、BET 阻害剤耐性の問題が考えられているが、耐性のメカニズムは解明されていない。耐性の克服は BET 阻害剤の有用性を高める上で重要な課題である。そこで本研究では、BET 阻害剤耐性株を樹立し、耐性メカニズムの検討を行った。</p> <p>【方法】 BET 阻害剤である I-BET151 を用いて BET 耐性株を U937 細胞株から樹立し、U937 と U937R とを比較した。抗腫瘍効果を判定するために、MTS アッセイ、細胞周期解析、アポトーシス解析を実施した。さらに、MYC 遺伝子の発現解析や BRD タンパクと NF-κB 関連タンパクの発現解析を行った。</p> <p>【結果】 I-BET151 は U937 に対して細胞周期の停止とアポトーシスを誘導させることで抗腫瘍効果を示した。I-BET151 により MYC 遺伝子は一時的な発現抑制を示した後、再発現を示した。BET 阻害剤耐性 U937 細胞株の特徴として、BRD2、BRD4、NF-κBp65、IκBα タンパクの発現増加がみられた。さらに、耐性細胞における核分画にて NF-κBp65 タンパクが検出され、IKK 阻害剤によりこの発現が抑制されたことから、耐性メカニズムとして NF-κB シグナル経路の活性化が示唆された。</p> <p>【結論】 BRD タンパクの増加は BET 阻害剤耐性を獲得する際に重要であり、増加した BRD が NF - κシグナル経路を活性化することで耐性株における増殖を維持していたと考えられた。また、IKK 阻害剤を I-BET151 と併用することで耐性株に対する抗腫瘍効果の増強が認められた。I-BET151 耐性メカニズムが示されたことは、今後の BET 阻害剤の可能性の拡大と、その治療法の発展に寄与するものと考えられる。</p>			

学位論文審査結果の要旨

菱木光太郎氏の学位審査論文は主論文 1 編よりなり「NF- κ B signaling activation via increases in BRD2 and BRD4 confers resistance to bromodomain inhibitor I-BET151 in U937 cells.」と題するもので *Leukemia Research* 誌に掲載され、分子腫瘍学分野に於いて玉利真由美教授の指導によるものである。以下、学位論文の概要と審査委員会における審査結果について報告する。

遺伝子の転写活性はヒストンのアセチル化によって変化する。本研究はその制御に関わる BET タンパクをターゲットとする I-BET151 を用いて BET 耐性株を U937 細胞株から樹立し、野生株と耐性株を比較してその耐性が何によって起きているかを明らかにしたものである。

学位公開審査会は令和元年 5 月 10 日、吉田清嗣教授、矢野真吾教授、玉利真由美教授のご臨席の下、開催された。主論文の概要を中心とした菱木氏の発表に続いて口頭試問を行った。席上、審査委員から内容に関する以下のような数多くの質疑があった。

- ・使用した細胞はどのような由来の細胞なのか。
- ・対象となった細胞を選択した根拠は何か。
- ・何故 1 つのクローンの細胞のみで実験を行ったのか。
- ・使用した薬剤の濃度の妥当性はどうか。
- ・細胞間での網羅的な発現パターンはどうだったのか。
- ・野生株と耐性株では結局何が異なっているのか。
- ・発現が異なったパスウェイにどのようなものがあったか。
- ・I-BET151 が他のタンパクをターゲットにすることはないのか。
- ・耐性株で I-BET151 によって subG1 ポピュレーションが減ってしまうのは何故か。
- ・インヒビターを加えたとき対象となるキナーゼ活性がどの程度阻害されているのか。
- ・p38 の阻害剤投与で細胞の増殖が上昇するのは何故か。
- ・野生株に I-BET151 を加えると細胞死が増えるのは何故か。
- ・耐性株で I-BET151 と IKK インヒビターの同時投与で細胞死が増えるのは何故か。
- ・それは相乗効果なのか。
- ・BET タンパク阻害薬に耐性の細胞株と今回得られた耐性株との違いは何か。
- ・耐性株では何故 BRD4 だけでなく BRD2 のタンパク発現が上昇しているのか。

- ・ BRD2 と BRD4 について RNA の転写量の変化はどうだったのか。
- ・ 野生株に I-BET151 を加えた時 *myc* の発現が二峰性になるのは何故か。
- ・ 野生株に I-BET151 を加えた時 BRD4 の発現はどのように変化するか。
- ・ I-BET151 を加えた時に野生株で核への NF- κ B の移行が認められないのは何故か。

菱木氏はこれらの質問に的確に回答した。その後、吉田教授および矢野教授と慎重に審議した結果、本研究で新たに作成された耐性細胞でこれまでに知られていなかった I-BET151 への耐性のメカニズムが示されたことは、今後の BET 阻害剤の可能性が拡大することに繋がりこの阻害剤を用いた化学療法を進めていくうえで有用であると考え学位を授与するにその意義は十分大きいと判断した。