

Abstract of Doctoral Thesis

Name: **Leni Maylina**

Title: **Studies on p16-pRb pathway in canine lymphoma cells**

(犬リンパ腫細胞を用いた p16-pRB 経路に関する研究)

Abstract of thesis:

Lymphoma is the most common hematological malignancy in dogs. In humans, many forms of lymphomas have been shown to have specific genetic abnormalities that can be used in both as diagnostic and as prognostic factors. Although many analyses of altered DNA are currently being applied to canine lymphoma, however, the information on molecular biology is still limited.

In canine lymphoma, inactivation of p16 gene caused by methylation and deletion has been reported. The p16 (also known as CDKN2A) is an inhibitor of cyclin-dependent kinases 4 and 6 (CDK4/6) which primarily functions as a negative regulator of the retinoblastoma protein (pRb) pathway to prevent pRb phosphorylation, thus playing a critical role in cell cycle arrest. A consequence of p16 inactivation is elevated CDK4/6 activity resulting in hyperphosphorylation of pRb. Loss of p16 leads to disruption of the p16-pRb pathway, resulting in cell cycle progression, and it is suggested that the p16-pRb pathway is a prognostically valuable parameter for canine lymphoma. However, in these previous studies, p16 protein expression was not examined, as the appropriate antibody that can detect canine p16 protein was not identified until 2017. Moreover, simultaneous analyses of the p16 gene, its protein expression, and its correlation with Rb protein phosphorylation have not been performed in canine cancers.

Palbociclib and abemaciclib, are CDK4/6 inhibitor drugs that are currently approved for the treatment of breast cancers in humans, in combination with other therapeutics by the Food and Drug Administration (FDA) and the European Medicines Agency (EMA). Their inhibition affects cancer cell proliferation, blocking the progression from G1 to S phase, and may inhibit the metastatic potential of cancer cells. In dogs, CDK4/6 inhibitor, palbociclib, has been shown to have antitumor effects on canine mammary tumor cells, and could potentially be used as a new anti-cancer treatment for canine melanoma. However, with the best of my knowledge, there is no data available simultaneously analyzing the expression of p16 protein and phosphorylated pRb in canine cells treated with CDK4/6 inhibitors.

Therefore, my present studies were carried out to clarify the direct relationship of the p16 gene and its protein expression with pRb phosphorylation, and p16-pRb pathway in canine lymphoma cell lines treated with CDK4/6 inhibitors *in vitro*.

In chapter 1 of this study, I verified the correlation between the inactivation of the p16 gene and its

(Appended form No.3)

protein expression with the methylation of that gene, as well as hyperphosphorylation of the Rb protein. I examined simultaneously the gene and protein expression of p16 and phosphorylated pRb in eight canine lymphoma and leukemia cell lines (17-71, CLBL-1, GL-1, CLC, CLGL-90, Ema, Nody-1, and UL-1). Methylation of the p16 gene was also explored using the demethylation drug 5-Aza-2'-deoxycytidine (5-Aza). After 5-Aza treatment, p16 gene and protein expression increased and pRb phosphorylation decreased, suggesting that both hypermethylation of the p16 gene and pRb hyperphosphorylation occurred in four out of eight cell lines (CLBL-1, CLC, Nody-1, and UL-1). Moreover, the estimation of p16's protein expression was better than that of p16's mRNA expression because the expression of the protein was more stable than those of the gene, and highly related to the phosphorylation of pRb. These results revealed that p16's protein expression could be a promising biomarker for canine lymphoma cells.

In chapter 2 of this study, I studied the p16-pRb pathway in canine lymphoma cell lines treated with CDK4/6 inhibitors. I explored the correlation between CDK4/6 inhibitors (palbociclib and abemaciclib) sensitivity with various expression levels of the p16 protein and phosphorylated pRb using the canine lymphoma cell lines. The half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) values of palbociclib and abemaciclib in cells with low p16 (CLBL-1, CLC, and Nody-1), except UL-1, were consistently lower than those in cells with high p16 (17-71 and GL-1), suggesting that low p16 cells were sensitive and high p16 cells were relatively resistant to CDK4/6 inhibitors. In addition, my study revealed that palbociclib and abemaciclib treatment reduced pRb phosphorylation in a dose-dependent manner in canine lymphoma cells, especially in cells with low p16 (CLBL-1, CLC, Nody-1, and UL-1). In summary, CDK4/6 inhibitors showed potential as new chemotherapeutic agents for canine lymphoma and high p16 protein expression may be used as a useful biomarker for treatment resistance of CDK4/6 inhibitors.

With the best of my knowledge, the series of my studies clarified that the examination of the p16 protein expression, as well as the hyperphosphorylation of Rb proteins, may be further valuable parameters for the p16-pRb pathway and treatment biomarkers related to CDK4/6 inhibitors in canine lymphoma.

(About 800 words in English)

学位論文審査の結果の要旨

氏名	Leni Maylina
審査委員	主査： 山口大学 教授 奥田 優
	副査： 鹿児島大学 教授 遠藤 泰之
	副査： 山口大学 教授 森本 将弘
	副査： 山口大学 教授 水野 拓也
	副査： 山口大学 准教授 馬場 健司
題目	Studies on p16-pRb pathway in canine lymphoma cells (犬リンパ腫細胞を用いた p16-pRB 経路に関する研究)
審査結果の要旨： 犬のリンパ腫は発生頻度の高い造血器系腫瘍であり、临床上、重要な疾患である。一般的に抗がん剤を用いた治療が行われるが、近年、その治療法に大きな進捗はなく、またその成績も大きく向上していない。一方、医学領域では様々な種類のがんに対して、その分子機構の解析から分子標的薬等が開発され、新たな治療展開が実現している。 本研究では、犬のリンパ腫細胞の分子機構を解析することを目的として、犬リンパ腫培養細胞株を用い、特に細胞周期の停止を行う p16 (CDKN2A) ががん抑制蛋白に着目し研究が行われている。p16 蛋白は細胞周期の G1 期に機能する cyclin-dependent kinase (CDK) 4/6 に結合することで、そのリン酸化能を阻害し、S 期への進行に重要な Retinoblastoma 蛋白 (pRb) のリン酸化を阻害し、細胞周期を G1 期で停止させる。ヒトの様々ながん細胞で p16 遺伝子とその蛋白の発現が低下し、pRb のリン酸化が生じることで細胞周期の停止が起こらなくなっていることが報告されてきた。犬のリンパ腫においてもこれまで p16 遺伝子領域のメチル化によって p16 遺伝子の発現低下が報告されているが、p16 蛋白の発現低下と pRb のリン酸化について同時に解析された報告はなかった。 このような背景から第 1 章では犬リンパ腫細胞株を用いて、p16 mRNA, p16 蛋白, pRb のリン酸化について同時に解析するとともに、脱メチル化試薬である 5-Aza-2'-deoxycytidine (5-Aza) を用いた解析が行われている。その結果、犬のリンパ腫細胞の中にはメチル化により p16 遺伝子と p16 蛋白の発現が低下し、pRb のリン酸化が生じている細胞株が存在することが明	

らかとなった。一方、メチル化が生じていない細胞では p16 遺伝子と蛋白が発現し、pRb のリン酸化は生じていないことが明らかとなった。さらに、p16 蛋白の発現は p16 遺伝子発現と比較して pRb のリン酸化とよりよく相関していることが明らかとなった。

第 2 章では、CDK 4/6 の阻害薬を用いて、犬のリンパ腫細胞株の薬剤感受性と、p16 蛋白の発現、ならびに pRb のリン酸化を解析している。その結果、犬のリンパ腫細胞株は CDK 4/6 阻害薬に対して感受性であり、特に p16 蛋白が発現していない細胞では発現している細胞と比較して、その効果が多いことを明らかにした。

これらの研究で得られた成果は犬のリンパ腫の発生に p16-pRb 経路が重要であること、また、その経路を標的とした CDK 4/6 阻害薬は将来的に治療に応用できる可能性を示している。本研究は、犬のリンパ腫における腫瘍の分子機構を明らかにするとともにその治療への応用の可能性について新たな知見を提供するものであり、臨床獣医学の発展に貢献するものと考えられる。以上により、審査員一同は、本論文が博士(獣医学)の学位を与えるに十分な内容を有するものと判断した。