

学 位 論 文 題 名

ニトロソウレア系抗癌剤耐性脳腫瘍株におけるメチル化剤
前処理による殺細胞効果と姉妹染色分体交換の誘発

学位論文内容の要旨

I 研究目的

悪性脳腫瘍の化学療法は脳血液関門を通過しうるニトロソウレア系抗癌剤が広く用いられているが、临床上、十分な効果が得られているとは言い難い現状である。その原因の一つとして薬剤に耐性な腫瘍細胞の存在が挙げられるが、コロニー形成能試験を用いた研究では、ヒト悪性脳腫瘍細胞の約50%が1, 3 - bis (2 - chloroethyl) - 1 - nitrosourea (BCNU) に耐性を示しており、悪性脳腫瘍患者の化学療法による治療効果向上のためには、ニトロソウレア系抗癌剤の耐性機構の解明が重要な課題と考えられる。

最近、ラットやヒト悪性脳腫瘍細胞からニトロソウレア系抗癌剤に対する耐性細胞が分離され、その耐性機構の研究が行われている。大腸菌からヒトにいたる多くの生物種において O^6 - alkylguanine は細胞内に存在する O^6 - alkylguanine - DNA - alkyltransferase (O^6 - AT) によって修復される。耐性細胞では O^6 - alkylguanine の修復能が高く、DNA 鎖間架橋形成が減少していることから、 O^6 - AT による O^6 - chloroethylguanine の修復増加がニトロソウレア系抗癌剤耐性の主要な原因であると考えられる。 O^6 AT は O^6 - alkylguanine のアルキル基を O^6 - AT 自身のシステイン残基に転移することによって O^6 - alkylguanine を正常な guanine へと修復する。しかし、その酵素反応によって酵素は不活性化 (suicide inactivation) され、新たな蛋白合成により細胞内酵素量の回復が得られる。DNA をメチル化する薬剤を作用させると DNA に O^6 - methylguanine が生成され細胞内の O^6 - AT が、その修復により消費されるため、一定時間内の酵素の不活性化を引き起こすことができる。

今回の研究はラットおよびヒト悪性脳腫瘍細胞を用いてメチル化剤の前処理による O^6 - AT の不活性化により chloroethylnitrosourea に対する殺細胞効果と姉妹染色分体交換 (SCE) の誘発に及ぼす影響を検討し、ニトロソウレア系抗癌剤耐性細胞における O^6 - AT の役割をさらに解明することを目的とした。

II 研究方法

ラット脳腫瘍細胞 9 L 細胞および 9 L - 2 細胞とヒト脳腫瘍細胞 SF-126, SF-295, SF-188 を実験に用いた。ラット脳腫瘍細胞 9 L および 9 L - 2 細胞において methylnitrosourea (MNU) または streptozotocin (STZ) を前処理させた後, 1, 3 - bis (2 - chloroethyl) - 1 - nitrosourea (BCNU) を作用させ, ヒト脳腫瘍細胞 SF-126, SF-295, SF-188 細胞においては MNU または STZ を前処理し, 1 - (2 - chloroethyl) - 1 - nitrosourea (CNU) を作用させコロニー形成能試験と姉妹染色分体交換 (SCE) 誘発試験を行った。

III 研究結果

ラット脳腫瘍耐性細胞 9 L - 2 細胞では MNU あるいは STZ 前処理の濃度依存性に BCNU に対する殺細胞効果の増強が認められた。ヒト脳腫瘍耐性細胞 SF-295, SF-188 細胞でも MNU あるいは STZ 前処理の濃度依存性に CNU に対する殺細胞効果の増強が認められた。MNU や STZ の濃度増加により耐性細胞の感受性が感受性株と同等なレベルにまで回復することが可能であった。

SCE 誘発に関しては, ラットおよびヒト脳腫瘍耐性細胞において MNU あるいは STZ 前処理の濃度依存性に SCE 誘発の増加を認めた。

IV 考察

O^6 - AT による O^6 - alkylguanine の修復がニトロソウレア系抗癌剤耐性の主要なものであれば, 耐性細胞の O^6 - AT を不活性化させることにより耐性細胞は感受性細胞と同等の感受性に変化することが期待される。

今回, O^6 - AT 不活性化を目的に MNU, STZ 等のメチル化剤を前処理させニトロソウレア系抗癌剤 (BCNU, CNU) に対する殺細胞効果と SCE 誘発を検討した結果, ラット脳腫瘍耐性細胞 9 L - 2 細胞では MNU, STZ の濃度依存性に BCNU に対する殺細胞効果が増強し, SCE が増加することが認められた。感受性細胞 9 L 細胞では殺細胞効果および SCE 誘発の増強は認められなかった。ヒト脳腫瘍耐性細胞でも同様に MNU, STZ の濃度依存性に CNU に対する殺細胞効果の増強と SCE 誘発の増加が認められた。メチル化剤の前処理により耐性細胞の感受性は完全に感受性細胞と同等の感受性に回復することができた。ヒトの中程度耐性細胞 SF-295 では, SF-188 より低濃度のメチル化剤で達成できたが, これは SF-295 が SF-188 より不活化されるべき O^6 - AT が少ないためと考えられた。

MNU あるいは STZ の前処理により、ニトロソウレアに対する殺細胞効果および SCE 誘発が増加したという実験結果は、ニトロソウレア系薬剤で処理された耐性細胞においては MNU あるいは STZ の前処理により O^6 -AT が抑制されるため DNA 鎖間架橋が形成され、殺細胞効果や SCE 誘発が増加するという仮説を支持するものである。この酵素は、ラットやヒト脳腫瘍細胞におけるニトロソウレアに対する殺細胞効果や SCE 誘発に重要な役割を果たしていると考えられた。

V 結 語

ラットおよびヒト脳腫瘍細胞を用い MNU, STZ 等のメチル化剤により O^6 -alkylguanine - DNA - alkyltransferase を不活性化させ、ニトロソウレア系抗癌剤 BCNU, CNU に対する殺細胞効果および SCE 誘発における変化を検討した結果、以下の結論を得た。

1) ラットおよびヒト脳腫瘍耐性細胞において、MNU あるいは STZ 前処理の濃度依存性に BCNU あるいは CNU に対する殺細胞効果の増強が認められた。

2) ラットおよびヒト脳腫瘍耐性細胞において、MNU あるいは STZ 前処理の濃度依存性に SCE 誘発の増加を認めた。

3) メチル化剤による O^6 -alkylguanine - DNA - alkyltransferase の不活性化によって、ニトロソウレア系抗癌剤作用後の O^6 -chloroethylguanine の修復が減少して、DNA 鎖間架橋形成が増加するため、殺細胞効果の増強および SCE 誘発の増加が引き起こされたと考えられた。

以上の実験結果から、ニトロソウレア系抗癌剤耐性の主要な機構として O^6 -alkylguanine - DNA - alkyltransferase による O^6 -alkylguanine の修復が重要な役割を果たしている事が示された。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	阿 部	弘
副 査	教 授	小 林	邦 彦
副 査	教 授	細 川	真澄男

ニトロソウレア系抗癌剤の耐性細胞の耐性機構における O^6 -alkylguanine - DNA - alkyl-

transferase (O^6 -AT) の役割を明らかにするため、ラットおよびヒト悪性脳腫瘍細胞を用いてメチル化剤の前処理による O^6 -AT の不活性化により chloroethylnitrosourea に対する殺細胞効果と姉妹染色分体交換 (SCE) の誘発に及ぼす影響を検討した。 O^6 -AT 不活性化を目的に MNU, STZ 等のメチル化剤を前処理させニトロソウレア系抗癌剤 (BCNU, CNU) に対する殺細胞効果と SCE 誘発を検討した結果、ラット脳腫瘍耐性細胞 9 L-2 細胞では MNU, STZ の濃度依存性に BCNU に対する殺細胞効果が増強し、SCE 誘発が増加することが認められた。感受性細胞 9 L 細胞では殺細胞効果および SCE 誘発の増強は認められなかった。ヒト脳腫瘍耐性細胞でも同様に MNU, STZ の濃度依存性に CNU に対する殺細胞効果の増強と SCE 誘発の増加が認められた。メチル化剤の前処理により耐性細胞の感受性は完全に感受性細胞と同等の感受性に回復することができた。ヒトの中等度耐性細胞 SF-295 では、SF-188 より低濃度のメチル化剤で達成できたが、これは SF-295 が SF-188 より不活化されるべき O^6 -AT が少ないためと考えられた。

以上の結果より、メチル化剤による O^6 -alkylguanine-DNA-alkyltransferase の不活性化によって、ニトロソウレア系抗癌剤作用後の O^6 -chloroethylguanine の修復が減少して、DNA 鎖間架橋形成が増加するため、殺細胞効果の増強および SCE 誘発の増加が引き起こされると考えられ、ニトロソウレア系抗癌剤耐性の主要な機構として O^6 -alkylguanine-DNA-alkyltransferase による O^6 -alkylguanine の修復が重要な役割を果たしている事が示された。

口頭発表の審査会において、小林邦彦教授より姉妹染色分体交換の機序と DNA 鎖間架橋形成との関連性について、さらにメチル化剤前処理による脳腫瘍治療への応用の可能性について質問がなされた。また細川真澄男教授よりメチル化剤の細胞毒性について、さらに耐性機構に関し DNA 修復以外の機序の有無についての質問がなされた。これに対し申請者は概ね妥当な回答を行った。その後、行われた小林・細川両副査教授との試問においても、概ね適切な回答がなされた。

本研究はニトロソウレア系抗癌剤耐性の主要な機構として O^6 -AT による DNA 修復が大きな役割を果たしていることを明らかにしたものであり、有意義な研究と考えられ、学位授与に値する。