

学 位 論 文 題 名

多剤薬剤耐性獲得の機序に関する研究

－ ヒト白血病細胞株 HL-60 の多剤薬剤耐性に伴う
Filamentous Cytoskeletons の変化を中心に－

学位論文内容の要旨

目 的

腫瘍細胞の多剤薬剤耐性の獲得は有効な治療（抗腫瘍化学療法）の継続に多大な障害となっている。この耐性機序の解明にヒト白血病細胞株 HL-60 と K562 から Adriamycin 耐性株 (HL-60/ADR, K562/ADR) を樹立し、filamentous cytoskeletons (actin, vimentin, microtubules) の変化について共焦点レーザー顕微鏡を用いて検討した。一方、多剤薬剤耐性株に蛋白リン酸化酵素活性の上昇が報告されているので、HL-60 と HL-60/ADR の Protein Kinase C (PKC) 活性・Protein Tyrosine Kinase (PTK) 活性を測定し、PKC 阻害剤 staurosporine (STR)、PTK 阻害剤 genistein (GNS)、PKC 活性剤 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA) を用いて、細胞増殖と microtubules におよぼす影響を検討した。

材料ならびに方法

1) 細胞および増殖試験

ヒト白血病細胞株 HL-60 と K562 から Adriamycin 耐性株を樹立した。生細胞数は tripan blue 法によって測定し、細胞増殖試験は MTT 比色法によって行なった。Mitotic index は May-Gruenwald-Giemsa 染色で 1,000 個中の M 期にある細胞から算定した。細胞回転の検索は flow cytometry を用いて、CellFIT DNA システムにより G₁, S, G₂+M の細胞群に分別して検討した。

2) P-Glycoprotein の検討

P-Glycoprotein の同定はポリクロナール抗 P-glycoprotein 抗体を用い、flow cytometry により行なった。

3) 共焦点レーザー顕微鏡による細胞骨格の解析

Microtubules の間接蛍光抗体法は、microtubule stabilizing buffer にて細胞処理後、一次抗体として抗 α -tubulin 抗体、抗 β -tubulin 抗体、抗 tyrosine tu-

bulin抗体を用いFITC標識二次抗体で染色した。F-actinはFITC標識phalloidinで染色した。Vimentinは一次抗体として抗vimentin抗体を用いFITC標識二次抗体で染色した。各染色された標本を共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡(MRC-600システム)で観察し、染色された細胞の単位面積当たりの蛍光強度を算定し相対的な細胞骨格の発現量として検討した。

4) 蛋白リン酸化に関する検討

HL-60とHL-60/ADRのPKC活性とPTK活性を測定した。さらにSTR、GNSを用いて48時間後のHL-60とHL-60/ADRの細胞増殖におよぼす影響と、STR、GNS、TPAを用いて2時間後のmicrotubulesにおよぼす影響を観察した。

結果

1) 細胞の性状

HL-60ならびにHL-60/ADRのMay-Gruenwald-Giemsa染色像では、両細胞群とも一般的な芽球としての形態を示したが、HL-60の胞体に見られるようなAzur顆粒はHL-60/ADRにはほとんどみられなかった。Adriamycinに対するIC₅₀はHL-60/ADRで親株より約160倍の高値を示した。細胞増殖の倍化時間はHL-60の32.1時間に対してHL-60/ADRで27.2時間とやや短く、mitotic indexもHL-60の2.6%に対してHL-60/ADRで3.2%とやや大きくなっていった。Medium交換後24時間のcell cycleと共焦点レーザー顕微鏡で測定したcell sizeは両細胞群間に大きな相違は認められなかった。

2) P-glycoproteinの発現

抗P-glycoprotein抗体を用いたflow cytometryではHL-60/ADRとK562/ADRにそれぞれ親株より強いP-glycoproteinの発現が認められた。

3) 共焦点レーザー顕微鏡による細胞骨格の観察

各々蛍光法により染色された細胞の細胞骨格を共焦点レーザー顕微鏡で観察するとactin, vimentinの発現に大きな相違は認められなかったが、各抗tubulin抗体で染色されたmicrotubulesは明らかにHL-60/ADRにHL-60より強い発現が認められ、中心体から胞体に広がっている強く重合したmicrotubulesが観察された。それらの発現量の測定の結果、microtubulesは抗 α -tubulin抗体で224%、抗 β -tubulin抗体で159%、抗tyrosine tubulin抗体で222%といずれで測定した場合にもHL-60/ADRにHL-60より有意に強い発現が観察された。K562/ADRでも同様の結果が得られた。

4) 蛋白リン酸化に関する検討

HL-60/ADRは親株より、顆粒画分で PKC の高い活性を、顆粒画分と細胞質画分で PTK の高い活性を示した。細胞増殖に関しては、HL-60は STRと GNSの有無にかかわらず Adriamycinにより濃度依存性に細胞増殖が抑制され、HL-60/ADRはSTRとGNSにより Adriamycin (1-10 μ M)に対する耐性が減弱された。一方、STR・GNS・TPAのmicrotubulesに対するそれぞれの影響を観察したところ、STRとGNSはHL-60/ADRのmicrotubulesの発現をそれぞれ47.7%と58.9%に抑制し、TPAは136.2%に亢進した。STRとGNSで処理した細胞のmicrotubulesの構築は、ほとんどの細胞において線維状構造が失われる傾向が観察され、びまん性のtubulinに対する染色傾向を示した。一方、TPAで処理したHL-60/ADRには処理前よりさらに強く重合したmicrotubulesの発現が観察された。

考案

培養細胞株による多剤薬剤耐性の獲得に関する研究はMDR geneと薬剤排出機構としてのP-glycoprotein、蛋白リン酸化、glutathione S-transferaseなどに関する多岐にわたる研究がなされているが、形態学的な研究は限られたものにしかすぎない。本研究では細胞の様々な細胞機能に関連しているfilamentous cytoskeletons (actin, vimentin, microtubules)について、ヒト白血病細胞株であるHL-60とK562の多剤薬剤耐性獲得に伴う変化を共焦点レーザー顕微鏡で検討し、さらに、蛋白リン酸化の影響について検討した。

HL-60とHL-60/ADRの一般細胞学的な検索では、HL-60/ADRでやや増殖の速い傾向が認められたが、その他に大きな相違は認められなかった。しかし、各filamentous cytoskeletonsの親株と耐性株における相対的な発現量を検討すると、耐性株に明らかに強いmicrotubulesの発現が観察された。さらに、耐性株に高いPKC・PTK活性が観察されたことから、microtubulesの発現の調節にPKCとPTKが何らかの関連をもつことがうかがわれ、STR・GNS・TPAのそれぞれがHL-60/ADRのmicrotubulesにどのような影響をおよぼすか検討した。その結果、STRとGNSはAdriamycinの存在下に、HL-60/ADRに2時間作用させることにより、microtubulesの発現を著明に抑制し、ほとんどの細胞でmicrotubulesの線維状の構造が失われる傾向が観察され、断裂または脱重合に起因すると思われるびまん性のtubulinに対する染色傾向を示した。一方、TPAは処理前よりさらに強く重合したmicrotubulesの発現を惹き起した。これらのことより、PKCまたはPTKはHL-60/ADRのmicrotubulesの重合・脱重合に何らかの関与

をもつと考えられた。さらに、STRとGNSとはHL-60/ADRのAdriamycinに対する耐性を減弱させ、なおかつ、そのような処理細胞においてmicrotubulesの発現を減少させ、構築の変化を惹き起すことは薬剤耐性の多様な機序を考えるうえで示唆に富んだ知見と考えられた。

結語

ヒト白血病細胞株HL-60とK562から樹立されたAdriamycin耐性株HL-60/ADRとK562/ADRとは親株より強いP-glycoproteinの発現を認めた。共焦点レーザー顕微鏡を用いた観察では、HL-60とK562のいずれにおいても多剤薬剤耐性の獲得とともにmicrotubulesの強い発現が認められた。HL-60/ADRはHL-60より高いPKC活性・PTK活性を示し、STRとGNSはHL-60/ADRのAdriamycinに対する耐性を減弱した。STRとGNSはHL-60/ADRのmicrotubulesの構築の変化と発現の減少を惹き起し、TPAはmicrotubulesの発現を亢進した。

これらのことより、ヒト白血病細胞株の多剤薬剤耐性の獲得にはmicrotubulesの発現の亢進を伴い、その発現の調節の少なくとも一部には蛋白リン酸化の関与していることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 宮 崎 保
副 査 教 授 葛 巻 暹
副 査 教 授 阿 部 和 厚

学位論文題名

多剤薬剤耐性獲得の機序に関する研究
-ヒト白血病細胞株HL-60の多剤薬剤耐性に伴う
Filamentous Cytoskeletonsの変化を中心に-

I. 目的

腫瘍細胞の多剤薬剤耐性の獲得は有効な抗癌化学療法の継続に多大な障害となっている。この耐性機序の解明にヒト白血病細胞株HL-60とK562とからAdriamycin耐性株(HL-60/ADR, K562/ADR)を樹立し、filamentous cytoskeletons (アクチン、ビメンチン、マイクロチューブル)の変化について共焦点レーザー蛍光走査顕微鏡を用いて検討した。一方、多剤薬剤耐性株に蛋白リン酸化酵素活性の上昇が報告されており、HL-60とHL-60/ADRのProtein Kinase C (PKC)活性・Protein Tyrosine Kinase (PTK) 活性を測定し、PKC阻害剤staurosporine (STR)、PTK阻害剤genistein (GNS)が細胞増殖とmicrotubulesにおよぼす影響を検討した。さらにそれらの阻害剤で処理した細胞内Adriamycinの動態を観察した。

II. 材料ならびに方法

1. 細胞およびその特性

ヒト白血病細胞株HL-60とK562からAdriamycin耐性株を樹立し、細胞学的特性、ならびにMDR1遺伝子とその産物であるP-glycoprotein の発現を検討した。

2. 共焦点レーザー蛍光走査顕微鏡による細胞骨格の解析

マイクロチューブルの間接蛍光抗体法は、microtubule stabilizing bufferにて細胞処理後、一次抗体として抗 α -tubulin抗体、抗 β -tubulin抗体、抗tyrosine tubulin抗体を用いFITC標識二次抗体で染色した。F-アクチンはFITC標識phalloidinで染色した。ビメンチンは一次抗体として抗vimentin抗体を用いFITC標識二次抗体で染色した。各染色された標本を共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡(MRC-600システム)で観察した。

3. 蛋白質リン酸化に関する検討

HL-60とHL-60/ADRのPKC活性とPTK活性を測定した。さらにSTR、GNSを用いて48時間後のHL-60とHL-60/ADRの細胞増殖におよぼす影響と、STR、GNS処理HL-60/ADRの経時的なマイクロチューブルの変化とAdriamycinの細胞内動態を観察した。

III. 結果

1. 細胞の特性

HL-60ならびにHL-60/ADRのMay-Gruenwald-Giemsa染色像では、両細胞群とも一般的な芽球としての形態を示したが、HL-60の胞体に見られるようなAzur顆粒はHL-60/ADRにはほとんどみられなかった。Adriamycinに対するIC₅₀はHL-60/ADRでは親株より約160倍の高値を示し、増殖もやや早くなっていた。さらにHL-60/ADRではMDR1遺伝子とP-glycoproteinの強い発現が認められた。

2. 共焦点レーザー蛍光走査顕微鏡による細胞骨格の観察

各々蛍光法により染色された細胞の細胞骨格を共焦点レーザー顕微鏡で観察するとactin, vimentinの発現に大きな相違は認められなかったが、各抗tubulin抗体で染色されたマイクロチューブルは明らかにHL-60/ADRではHL-60より強い発現が認められた。K562とK562/ADRでも同様の結果が得られた。

3. 蛋白質リン酸化に関する検討

HL-60/ADRは親株より、顆粒画分でPKCの高い活性を、顆粒画分と細胞質画分でPTKの高い活性を示した。細胞増殖に関しては、HL-60はSTRとGNSの有無にかかわらずAdriamycinにより濃度依存性に細胞増殖が抑制され、HL-60/ADRはSTRとGNSによりAdriamycin (1-10 μ M)に対する耐性が減弱された。Adriamycinの存在下にSTRとGNSで処理したHL-60/ADRのマイクロチューブル構築は、処理後、早期に線維状構造が失われる傾向が観察され、経時的に発現の減少がみられた。それとは対照的に、Adriamycinの核内への集積は経時的に亢進し、細胞障害が惹き起こされていることが示唆された。

VI. 考案および結語

ヒト白血病株HL-60とK562を用いてそれらの多剤薬剤耐性株を樹立し、filamentous cytoskeletonsの発現と蛋白質リン酸化について検討し、以下の結果が得られた。

1. HL-60/ADRには親株より強いMDR1とP-glycoproteinの発現がみられた。
2. Filamentous cytoskeletons (アクチン、ビメンチン、マイクロチューブル) を共焦点レーザー蛍光走査顕微鏡で観察し、HL-60とK562のいずれにおいても多剤薬剤耐性の獲得とともにマイクロチューブルの発現が強く発現された。
3. HL-60/ADRはHL-60より高いPKC・PTK活性を示した。
4. STRとGNSはHL-60/ADRのAdriamycinに対する耐性を減弱した。
5. Adriamycinの存在下に、STRとGNSはHL-60/ADRのマイクロチューブルの構築変化と発現の減少を惹き起こし、Adriamycinのその細胞核内集積を亢進した。

これらの検討の結果、ヒト白血病細胞株の多剤薬剤耐性の獲得にはマイクロチューブルの発現の亢進をとめない、その発現の調節の少なくとも一部には蛋白質リン酸化の関与していることが示唆された。さらに、STRとGNSによるHL-60/ADRのAdriamycinに対する耐性の減少は、Adriamycinのその細胞核内集積の亢進によることが示唆された。

以上より、本研究は博士（医学）の学位論文として妥当なものと判断される。