

学位論文題名

メソトレキセートの小核誘発性に関する研究

学位論文内容の要旨

環境中の化学物質の癌原性を早期に検出することは社会的にも重要であり、変異原性試験がそのスクリーニングの目的に使用されている。小核試験は染色体の変化を検出する代表的な *in vivo* 試験系であり、特にマウス骨髄中の幼若な赤血球 (PCE) の変化を観察対象とする試験系が広く用いられている。骨髄中で赤血球が生産される過程において、赤芽球の最終分裂の前に染色体異常が生じると、その断片は赤血球の細胞質中に小核として残るため、それらを有する赤血球の出現頻度を指標として化学物質の染色体異常誘発性を *in vivo* で評価できるのである。小核試験は多くの化合物の評価に使用されてきたが、その中で葉酸代謝拮抗作用を有する制癌剤メソトレキセート (MTX) は、単回投与ではほとんど小核誘発性が認められず多数回投与で増強されると報告されていた。一般的な化合物の多数回投与による小核誘発性は単回投与の反応を加算的に累積すると予測できることが報告されているが、MTXはこの予測と適合せず、何らかの未知の機構が存在するものと考えられていた。このような物質の作用の本質を調べることにより、小核誘発機構における新たな知見を得ることができると考え本研究を開始した。

MTXの骨髄における小核試験を実施したところ、小核頻度は投与回数を増す(1~4回)ことにより有意に増加し、4回投与で最大に達した。また、末梢血を用いた小核試験を実施したところ、単回投与においても統計的に有意な小核誘発を認めた。これらの相違は実験系の相違によると考えられたが、MTXの小核誘発機構を理解するためには骨髄における小核誘発機構を解析する必要があると考え以下の検討を行った。

MTX 4mg/kgを単回あるいは4回腹腔内に投与し、骨髄細胞の染色体を直接観察したところ4回投与の方が明らかに染色体異常頻度が増加していたことから、MTXの多数回投与による小核誘発は%PCEの極度の減少に伴った非特異的な反応ではなく、染色体異常に起因していると考えられた。また、単回あるいは4回投与後の血液中、骨髄液中MTX濃度変化をHPLCにて追跡したところ、投与回数による変化は認められず薬物の蓄積による濃度の上昇はなかった。しかし、骨髄細胞中の標的酵素であるジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)の活性は4回投与の方が著しく減少していた。さらに、骨髄細胞中のMTX量は4回投与の方が約10倍多く、上記DHFR活性の阻害は骨髄細胞中へのMTXの蓄積によると考えられた。骨髄細胞の細胞質画分をSephadex G-25によるゲルろ過で低分子と高分子画分に分離しそれぞれのMTX量を測定し蛋白結合率を求めたところ、単回投与では13.5%であったが4回投与では25%にまで増大していた。以上のことから、MTXの多数回投与における小核誘発は、細胞内蛋白質との結合率の上昇が一つの要因となったMTXの細胞内蓄積によることが明らかとなった。

MTXはDHFRを阻害することによって細胞内のテトラヒドロ葉酸を枯渇させ、チミジン酸合成やプリン合成を阻害するため、細胞内デオキシリボヌクレオチド3リン酸(dNTPs)プールが減少するもあるがDHFR活性が強く阻害される4回投与では増強されていることがin vivoでのマウス骨髄で初めて明らかになった。

次に、DNAの直接的な障害を検出する実験系の「アルカリ溶出法」によってマウス骨髄細胞DNAに対するMTX投与回数の影響を調べた。その結果、単鎖切断を検出するpH12.1では単回および4回投与とも、コントロールと比較し溶出速度の増大はなくDNAの単鎖切断は検出されなかった。しかし、脱塩基部位やリン酸トリエステル部位などのアルカリ感受性部位を検出できるpH12.6では、単回投与後は溶出速度の増大は認められなかったものの4回投与後では溶出速度が増大した。このことから、MTXの4回投与でのマウス骨髄における小核誘発の過程でアルカリ感受性部位(おそらく脱塩基部位)が生成していることが明らかとなった。

次にチャイニーズハムスター培養細胞(CHL)を用いてMTXの染色体異常誘発とアルカリ感受性部位生成について解析した。その結果、MTX処理によってまず24時間以内にアルカリ感受性部位が時間依存的に蓄積し、その後染色体異常が誘発されることが明らかとなった。また、染色体異常とアルカリ感受性部位生成はチミジンの添加によって一部回復したことから、これらの生成過程でDNA中へのウラシルの誤取り込みが起こっている可能性が考えられた。

以上得られた知見から、MTXの多数回投与によるマウス骨髄における小核誘発機構の一つの可能性として以下のような機構を推定した。a)MTXは多数回投与によって、マウス骨髄細胞中の蛋白質との結合が一つの要因となって細胞内に蓄積する。b)蓄積したMTXは標的酵素であるDHFRの活性を強く阻害する。c)多数回投与によってDHFR活性が阻害されると細胞内dNTPsプールが減少する。d)dNTPsプールの減少はDNA複製あるいはDNA修復の際にウラシルの誤取り込みを引き起こす。e)取り込まれたウラシルはウラシル-DNAグリコシラゼによって塩基部分が取り除かれDNAに脱塩基部位が生じる。f)生じた脱塩基部位はdNTPsの減少のため修復されずに残存し蓄積する。g)蓄積した脱塩基部位はさらなる誤修復を受けるか、AP-エンドヌクレアゼなどの基質となりDNA鎖切断にいたる。h)結果として染色体異常を誘発し小核を形成する。

本研究により、MTXは多数回投与によってマウス骨髄細胞内に蓄積することが明らかとなり、このことが結果として小核を誘発する要因であることが確かめられた。この研究手法はいわゆるトキシカインデックスの考え方を一歩進めたものといえ、今後の毒性機構解析の一つの方向を示したものと考ええる。また、本研究は小核試験の標準プロトコルとして複数回の投与を推奨する現在の動向に一つの根拠を与えるものと考えられる。

本研究によりMTXは多数回投与によってdNTPsの減少とアルカリ感受性部位の生成を引き起こすことが明かとなった。dNTPsの細胞内におけるアンバランスはエンドヌクレアゼ遺伝子発現の引き金になること、あるいはDNAポリメラーゼ α のDNA複製における正確性を減少させることが報告されており、これらとアルカリ感受性部位との関連、小核誘発/変異原性との関連を明らかにしていくことが今後の研究課題である。

学位論文審査の要旨

主査	教授	長澤	滋治
副査	教授	鎌滝	哲也
副査	助教授	高橋	和彦
副査	助教授	横井	毅

学位論文題名

メソトレキセートの小核誘発性に関する研究

医薬品として用いられる化学物質は、一般毒性、生殖毒性、癌原性の面から安全性が検討されている。中でも、癌原性試験は重要な項目の一つであるが、実験動物を用いた癌原性試験は3－4年という長期間と莫大な費用を要する点に問題がある。近年、一般に癌原性物質は遺伝子や染色体に変化を起こす性質、すなわち変異原性があることに着目した、いわゆる変異原性試験が癌原性のスクリーニング法として注目されつつある。

小核試験法は変異原性試験法の一つで、染色体異常により生成した無動原体染色体(acentric fragment)が小核として細胞内に残留した幼若赤血球の出現率を測定する方法である。この方法は多数の化合物について、比較的短期間で評価が下せることや判定が簡便なこともあって、広く用いられつつある試験法である。しかし、小核形成に至る機構について、詳細に解析された報告は皆無に近い現況である。

抗癌剤として広く臨床的にも使用されているメソトレキセート(MTX)を多数回投与すると、小核誘発することが知られている。本研究では、まず、小核試験法のためのコンピューターシステムを開発し、MTXによる小核形成機構を動物レベル(マウス)並びに培養細胞レベル(チャイニーズハムスター由来、CHL)で詳細に解析し、下記のような知見を得た。

1: MTXの多数回マウス投与による小核誘発とジヒドロ葉酸還元酵素活性の低下。

MTXは代表的な葉酸代謝拮抗剤で、その多数回マウス投与により小核

が誘発されることを見いだした。この時、MTXの血中や骨髓液濃度に関しては有意な上昇は見られなかったが、骨髓細胞内に蛋白結合型として蓄積されていた。さらに、MTXの標的酵素であるジヒドロ葉酸還元酵素活性が持続的に低下していることも見いだした。これは、MTXがジヒドロ葉酸還元酵素に結合することにより、その酵素活性を阻害する可能性を強く示唆する知見である。

2：MTX多数回投与によるdNTPsプールの減少とアルカリ感受性部位の生成。ジヒドロ葉酸還元酵素活性の阻害により、チミジル酸の生合成が低下した。さらに、DNAがアルカリ処理により切断されやすくなること、すなわち、アルカリ感受性部位が形成されていることを見いだした。これは、チミジル酸の低下により、ウリジル酸プールが増加した結果、マウスDNAに誤ってウラシルが取り込まれ、さらにウラシル-DNAグリコシラーゼにより脱塩基部位が形成されたことによる機構を示唆する。

3：アルカリ感受性部位の生成と染色体異常の誘発。染色体異常の試験には、チャイニーズハムスター由来の培養細胞（CHL）が一般に用いられている。MTXはCHL細胞に切断型異常を中心とした染色体異常を誘起やアルカリ感受性部位を生成された。このMTXによる染色体異常誘発とアルカリ感受性部位の生成はチミジル酸の添加により抑制された。これらの知見はMTXの細胞内蓄積によるジヒドロ葉酸還元酵素阻害が一連の染色体異常の引き金を引くことを支持するものである。

4：小核試験-染色体異常試験用コンピューターシステムの開発。医薬品の毒性試験の一環としての変異原性試験において、より客観的な評価や系統的なデータ保存のためのコンピューターシステムの開発が望まれていた。本研究を始めるにあたり、測定者の主観排除と顕微鏡観察の疲労度を軽減するための検出記録システムソフトとコンピューターシステムの開発に着手し、パーソナルコンピューターを用いたシステムを完成した。本システムは染色体異常試験検討会においても注目されたシステムであり、今後、我が国での小核試験法の実施において標準法として採用される予定である。

以上、MTXの小核形成機構に関する多くの研究成果を挙げた。本研究成果は、単にMTXという一つの薬剤の変異原性機構を解明したに止まらず、細胞内のdNTPsのプールのアンバランスをもたらす種々の薬剤の作用あるいは副作用の理解を深めるうえでも大いに貢献するものである。本研究成果は、医薬品の変異原性試験法の理論的な基盤を与えるものといえ、博士（薬学）の学位を受けるに値する業績と評価した。