

学 位 論 文 題 名

ヒト腫瘍細胞の多剤耐性獲得に伴う
微小管の変化に関する研究

学位論文内容の要旨

I. 研究目的

抗腫瘍化学療法時における腫瘍細胞の多剤薬剤耐性獲得は、臨床的に大きな問題となっている。この耐性獲得機序の解明・耐性解除については、近年細胞生理・生化学的研究成果が多岐にわたり報告されているが、細胞骨格系など形態学的研究は非常に乏しく詳細は不明である。本研究では多剤薬剤耐性株に強い発現が認められた微小管の経時的変化について、共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いて研究した。また、薬剤耐性解除を検討する目的で、tubulinの重合阻害剤であるcolcemidを投与し、直接細胞の微小管構築を阻害することによる薬剤耐性細胞株の細胞内薬剤分布の変化についても検討した。

II. 材料及び方法

1. 細胞：ヒト腫瘍細胞として、急性骨髄性白血病細胞株HL-60，慢性骨髄性白血病細胞株K562を用いた。前2者のadriamycin耐性株(/ADR)は培養液中のADR濃度を20nMより開始し1 μ Mで維持するように段階的に上昇させることにより、当研究室で樹立し継代した。

2. MDR-1 geneに関する検討：HL-60，HL-60/ADR，K562，K562/ADRの各細胞より抽出したRNAを用いて，MDR-1 gene mRNA の発現を RT-PCR 法を用いて検討した。各々20・30サイクルと行い，内部コントロールには β -Actinを用いた。

3. 共焦点レーザー蛍光顕微鏡による細胞骨格の解析：免疫蛍光染色は，一次抗体として抗 α -tubulin抗体，二次抗体としてFITC標識抗マウスIg-G抗体を用いて行い，共焦点レーザー蛍光顕微鏡で観察した。同時に蛍光強度をMRC-500システムで測定し，単位面積当たりの蛍光強度を相対的な細胞骨格の発現量として算定した。

4. 細胞内薬剤分布に関する検討：各々の細胞にADRを5 μ Mの濃度で加え

0, 15, 30, 60, 120分の時点で固定し、共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いて核内のADRの蛍光強度をMRC500システムで算定した。各時点での単位面積当たりの蛍光強度から各々の細胞の自家蛍光を減じて相対的なADRの核内蓄積量として検討した。

Ⅲ. 結果及び考察

本研究で樹立した細胞のADRに対するIC₅₀は、HL-60/ADRではHL-60の159倍、K562/ADRではK562の127倍であり、RT-PCR法を用いたMDR-1 geneの検討では、HL-60及びHL-60/ADRでは、MDR-1 geneの増幅は認められず、K562/ADRでは、K562より過剰にMDR-1 geneが発現していることが示された。

これら薬剤耐性株の微小管の発現の亢進が、耐性を獲得するどの時点で起きているのか、薬剤耐性獲得との因果関係を検討する目的でHL-60, K562の薬剤耐性株を樹立する経時的な微小管の発現を観察した。結果は20nMという殺細胞効果のない濃度のADRを添加し72時間後にはじめて微小管の有意な発現亢進がみられ、その後も継続して濃度を徐々に増加させるとさらに微小管の発現も亢進した。この間に、ADRに感受性のあった細胞が耐性細胞に変化しており、ADRの直接的あるいは間接的な作用により微小管構築に変化が起こり、それに伴って薬剤に対する感受性が変化したものと考えた。ADR投与による微小管の発現亢進がADRに特異的な作用かどうか、他の白血病細胞株MT-1, Molt-4でも検討したが、いずれもADR添加培養72時間後に微小管の発現が亢進していた。このことから、ADR添加時の微小管の発現亢進が、ADR自体あるいは薬剤投与というストレスによる細胞の反応かは判然としないが、ADRに比較的特徴的な作用と考えられた。

次に微小管の発現の亢進と薬剤耐性獲得について、ADRの核内蓄積量を検討した。薬剤耐性を獲得する経過の細胞としてHL-60+ADR(20nM72時間添加)、HL-60+ADR(100nM維持)、そしてHL-60/ADR(1 μ M維持)を用いてその経時的な薬剤蓄積量を検討した。ADR投与後60分までは核内のADRの核内蓄積量はほぼ同様に推移しているが、120分後では、ADRの投与時間が長い細胞ほど、その核内蓄積量が減少していた。すなわち、微小管の発現が亢進するにつれて、逆にADRの核内蓄積量が減少し薬剤に耐性になっていることになる。この結果より、微小管がADRの輸送に関連していることが示唆されたため、tubulinの重合阻害剤であるcolcemidを細胞に添加して、微小管を脱重合させた細胞でのADRの核内への蓄積を検討した。colcemidの作用機序はcolchicineと同様でfreeのtubulin dimerに結合してその重合を阻害し、分裂毒として作用する。またその細胞毒性はcolchicineより少ないため、本研究ではcolcemidを用いた。

細胞として、MDR-1 geneを持たないHL-60とHL-60/ADR, MDR-1 geneを持つK562とその過剰発現を持ったK562/ADRを用いた。いずれの細胞も0.5 μ Mのcolcemidで3時間培養することによりtubulinが脱重合され、微小管の繊維状構造が殆ど消失した。この時点でcolcemidを洗い流し、新たにADRを加えその核内への蓄積を検討すると、HL-60/ADRもK562/ADRもcolcemid処理により、120分後の薬剤蓄積量が減少せず各々の親株と同様であった。この結果より、MDR-1 geneの発現に関係なく薬剤耐性株の核からのADR蓄積量の減少にこの過剰に発現した微小管の構造が関与していることが示唆された。

薬剤耐性と微小管については、Minottiらはcolcemid, taxolの耐性株を用いて重合したtubulinの割合及び遺伝子の解析を行い、tubulinの重合度が耐性度と関連しており、これらの薬剤に対する耐性獲得の機序については、 α 及び β -tubulin遺伝子の変異に起因すると述べている。また、松本らは、抗微小管剤の1種であるrhizoxinに対する耐性株から β -tubulinの遺伝子をクローニングし、その塩基配列を比較したところ、耐性変異株で100番目のasparagine(Asn)がisoleucine(Ile)に変異していたことを指摘し、この耐性変異株由来のIle¹⁰⁰を含む遺伝子断片を感受性株の遺伝子の相当する部分と入れ換えることによりrhizoxinに対する耐性が確認されたと述べている。今回樹立したHL-60/ADR, K562/ADRについては遺伝子の変異について検討を行っていないが、各々の耐性株をADRを含まない培地で6カ月間培養しても微小管の発現亢進及び薬剤への耐性能には変化を認めておらず、微小管の発現亢進に遺伝子レベルでの変化が起こっているものと推測された。

本研究にて観察された多剤薬剤耐性株における微小管構造の変化は、多剤薬剤耐性株の有する多様な細胞学的特性を形態学的な面からとらえたものであり、ヒト白血病細胞株の多剤薬剤耐性の獲得にはMDR-1 geneの増幅の有無に関わらず微小管の発現の亢進を伴い、その核からの薬剤排出など薬剤耐性には、微小管がきわめて重要な役割を演じているものと考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浅 香 正 博

副 査 教 授 宮 崎 勝 巳

副 査 教 授 小 池 隆 夫

学 位 論 文 題 名

ヒト腫瘍細胞の多剤耐性獲得に伴う

微小管の変化に関する研究

I. 研究目的

抗腫瘍化学療法時における腫瘍細胞の多剤薬剤耐性獲得は、臨床的に大きな問題となっている。この耐性獲得機序の解明・耐性解除については、近年細胞生理・生化学的研究成果が多岐にわたり報告されているが、細胞骨格系など形態学的研究は非常に乏しく詳細は不明である。本研究では多剤薬剤耐性株に強い発現が認められた微小管の経時的変化について、共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いて研究した。また、薬剤耐性解除を検討する目的で、tubulinの重合阻害剤であるcolcemidを投与し、直接細胞の微小管構築を阻害することによる薬剤耐性細胞株の細胞内薬剤分布の変化についても検討した。

II. 材料及び方法

1. 細胞：急性骨髄性白血病細胞株HL-60、慢性骨髄性白血病細胞株K562を用い、adriamycin耐性株(/ADR)は培養液中のADR濃度を $1\mu\text{M}$ で維持するように段階的に上昇させ、樹立し継代した。
2. MDR-1 geneに関する検討：HL-60, HL-60/ADR, K562, K562/ADRの各細胞より抽出したRNAを用いて、MDR-1 gene mRNA の発現をRT-PCR法を用いて検討した。
3. 共焦点レーザー蛍光顕微鏡による細胞骨格の解析：免疫蛍光染色は、抗 α -tubulin抗体を用いて、共焦点レーザー蛍光顕微鏡で観察した。同時に蛍光強度をMRC-500システムで測定し、単位面積当たりの蛍光強度を相対的な

細胞骨格の発現量として算定した。

4. 細胞内薬剤分布に関する検討：各々の細胞にADRを $5\mu\text{M}$ の濃度で加え 0, 15, 30, 60, 120分の時点で固定し、共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いて核内のADRの蛍光強度を算定した。各時点での蛍光強度から各々の細胞の自家蛍光を減じて相対的なADRの核内蓄積量として検討した。

Ⅲ. 結果及び考察

(1) ヒト白血病細胞株HL-60とK562からそれらのadriamycin耐性株HL-60/ADRとK562/ADRを樹立した。HL-60とHL-60/ADRにはMDR-1 geneの発現を認めず、K562/ADRではK562より強いMDR-1 geneの発現を認めた。

(2) ヒト白血病細胞株HL-60, K562, Molt-4, MT-1に低濃度のADR(20nM)を加え72時間培養することにより、各々のコントロールより微小管の蛍光強度が有意に増加し、その構築も変化していた。

(3) HL-60とK562及びそのADR耐性株の微小管構造を共焦点レーザー顕微鏡で観察し、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微小管が有意に強く発現していた。

(4) HL-60がADRに耐性になる各段階の細胞を用いてADRの核内への蓄積を共焦点レーザー蛍光顕微鏡で観察したが、ADR投与後120分の蛍光強度が薬剤耐性になるにつれて減少していた。

(5) colcemid処理によりHL-60とK562及びそのADR耐性株の微小管は繊維状構造を失い、ADRの120分後の核内への蓄積が、colcemid処理したADR耐性株において増加していた。

薬剤耐性と微小管については、文献上tubulinの重合度が耐性度と関連しており、これらの薬剤に対する耐性獲得の機序については、 α 及び β -tubulin遺伝子の変異に起因すると述べられている。今回樹立した HL-60/ADR, K562/ADRについては遺伝子の変異について検討を行っていないが、各々の耐性株をADRを含まない培地で6カ月間培養しても微小管の発現亢進及び薬剤への耐性能には変化を認めず、微小管の発現亢進に遺伝子レベルでの変化が起こっているものと推測された。本研究にて観察された多剤薬剤耐性株における微小管構造の変化は、多剤薬剤耐性株の有する多様な細胞学的特性を形態学的な面からとらえたものであり、ヒト白血病細胞株の多剤薬剤耐性の獲得には MDR-1 gene の増幅の有無に関わらず微小管の発現の亢進を伴い、その核からの薬剤排出など薬剤耐性には、微小管がきわめて重要な役割を演じているものと考えられた。臨床的には現在 tubulinを標的にした薬剤、Paclitaxel(Taxol)やRhizoxinの臨床試験が行われており、これら抗微小管薬との併用による多剤耐性の克服の研究が今後更に必要にな

るものと考えられる。

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。