

Title	ヒト扁平上皮癌培養細胞のブレオマイシン耐性獲得機構に関する研究
Author(s)	杉, 政和
Citation	
Issue Date	
oaire:version	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/34725
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

【5】

氏名・(本籍)	すぎ 杉	まさ 政	かず 和
学位の種類	歯	学	博 士
学位記番号	第	6 6 3 4	号
学位授与の日付	昭和 59 年 10 月 31 日		
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当		
学位論文題目	ヒト扁平上皮癌培養細胞のプレオマイシン耐性獲得機構に関する研究		
論文審査委員	(主査)		
	教授	宮崎	正
	(副査)		
	教授	作田 正義	教授 小谷 尚三 助教授 藤下 昌巳
	講師	工藤 照夫	

論 文 内 容 の 要 旨

癌の化学療法において、一次治療後の再発癌の多くが、先行化学療法に用いた抗癌剤に抵抗性を示すことが知られている。扁平上皮癌が約70%をしめる口腔癌においても同様で、扁平上皮癌に対して選択的に著効を示すプレオマイシン (BLM) を、再発した扁平上皮癌に再び投与しても無効な場合が多く経験される。これらの事実は、再発癌にはBLMに耐性を示す細胞が存在する可能性を強く示唆するものと考えられる。

このような観点から、著者は、BLMに対するヒト扁平上皮癌の耐性獲得機構を解析するため、先にヒト扁平上皮癌培養細胞から、3種のBLM耐性細胞(HeLa-BLM^r, KB-BLM^r, Hepd-uvBLM^r)を分離・樹立した。本研究では、これらのBLM耐性細胞を用いて、BLM耐性機構の解析ならびにBLM耐性細胞出現におよぼす変異原処理の影響を検索するとともに、BLM耐性細胞に対する抗癌剤の効果増強についても検討を加えた。

BLM耐性機構を、1) BLMの細胞内取り込みと細胞外放出、2) BLM不活化活性、3) DNA修復能の面から検討した。BLM誘導体である³H-ペプロマイシン (³H-PEP) の細胞内への取り込みは、親株細胞に比べて、HeLa-BLM^r細胞およびKB-BLM^r細胞では約40%低下していたが、Hepd-uvBLM^r細胞では差はみられなかった。また細胞内に取り込まれた³H-PEPの細胞外放出は、HeLa-BLM^r細胞とHepd-uvBLM^r細胞において親株細胞よりも速やかであったが、KB-BLM^r細胞では差異は認められなかった。細胞内BLM不活化活性を、*B. subtilis* PCI 219株を用いたbioassayにより調べたが、用いた実験条件下では明確な結果を得ることができなかった。さらにDNA修復能の指標として紫外線 (UV)照射後の細胞生残率を求め、親株細胞と比較したところ、HeLa-BLM^r細胞は60秒照射時で24.5倍、Hepd-uvBLM^r細胞は45秒照射時で93.5倍の細胞生残率の上昇を示したが、KB-BLM^r細胞では差はみられな

かった。

一般に、変異原処理により耐性細胞の出現率は上昇するといわれているが、HeLa細胞を変異原で処理後、BLMを加えて培養したところ、BLM耐性細胞出現率はUV照射により約2万倍、放射線照射により1~2万倍、さらにマイトマイシンC (MMC)処理では3~5万倍上昇した。またHeLa細胞を放射線およびMMC処理し、BLM存在下で培養後、無作為に分離した23クローンのBLM耐性度は、放射線照射で6~21倍、MMC処理で14~25倍であった。代表的な4クローンの耐性機構は、一部に例外はみられたが、HeLa-BLM^r細胞のそれとほぼ同様であった。

次に、BLM耐性細胞の他の8種の抗癌剤に対する交叉耐性を調べた。2倍以上の低感受性を基準とした場合、いずれのBLM耐性細胞も、BLM誘導体のPEPには10倍以上の耐性を示したほか、2~6剤の他種抗癌剤に対しても交叉耐性を有していた。この場合、変異原処理後に分離された耐性細胞ほど多剤耐性を示したが、抗癌剤の種類に特異性はみられなかった。

以上の実験結果は、BLM耐性機構として、1)細胞内への取り込みの低下、2)細胞外放出の亢進、3)DNA修復能の著しい上昇が強く関与していることを推測させる。そこで、これらの耐性機構を阻害することによって耐性を克服しうるかどうかについて検討を加えた。すなわち、1)BLMの膜透過性を亢進させることが知られている小ポリエン系抗生剤のフィリピン、2)細胞外放出を抑制することが報告されているカルシウム拮抗剤、ベラパミル、3)ポリADPリボース合成酵素を阻害することにより、DNA修復能を阻害することが知られているニコチン酸アミドを、それぞれBLMと併用することによって、BLMの殺細胞効果を増強することが可能かを検討した。その結果、フィリピン添加により各耐性細胞の³H-PEP取り込みは2~4倍上昇し、さらにBLMとフィリピンをともに加えて培養すると、各耐性細胞は著しい増殖抑制をうけた。ベラパミル処理によって各耐性細胞の取り込みは上昇し、かつBLMとベラパミルを併用すると、HeLa-BLM^r細胞とHepd-uvBLM^r細胞では親株細胞に比して著明な増殖抑制がみられたが、KB-BLM^r細胞では差はみられなかった。ニコチン酸アミドとBLMを同時に添加して培養すると、HeLa-BLM^r細胞とHepd-uvBLM^r細胞は著しくその増殖が抑制されたが、KB-BLM^r細胞では抑制がみられなかった。

本研究により、1)ヒト扁平上皮癌培養細胞におけるBLM耐性獲得機構は、少なくともBLM細胞内取り込み、細胞外放出、DNA修復能の3つの機構が、程度の差はあるが単独あるいは複数で関与していることが明らかとなった。さらに、2)変異原処理により、BLM耐性細胞の出現頻度が著しく上昇することが示され、3)細胞膜修飾物質やDNA修復阻害物質の併用によって、in vitro 実験によってではあるが、BLM耐性が克服される可能性が示唆された。

論文の審査結果の要旨

本研究は、ヒト扁平上皮癌培養細胞から著者が初めて樹立した3種のBLM耐性細胞を用いて、BLM耐性機構を解析し、さらに解析結果を基礎にして耐性に対処する方策を実験的に検討したものである。

扁平上皮癌培養細胞のBLM 耐性獲得機構として、BLMの膜透過性、BLM不活化活性、DNA修復能の3つを検討した結果、BLMの細胞内への取り込みの低下、BLMの細胞外放出の亢進、DNA修復能の著しい上昇がBLM耐性に強く関与することが明らかになった。しかし、3つの機構の関与の程度は耐性細胞の種類によって様々であった。またBLM耐性細胞の出現頻度が変異原処理により著明に上昇すること、BLM耐性細胞はBLM以外の抗癌剤に対しても交叉耐性を示すこと、さらにこのような多剤耐性を有するBLM耐性細胞に対して、小ポリエン系抗生剤やカルシウム拮抗剤などの細胞膜修飾物質や、DNA修復阻害物質であるポリADPリボース合成阻害剤をBLMとともに作用させると、BLMの殺細胞効果が増強されることを明らかにした。

杉 政和君の業績は、従来研究のなかったヒト扁平上皮癌のBLM耐性獲得機構の重要な部分を明らかにするとともに、*in vitro*実験の段階ではあるが、BLM耐性細胞に対処する途を開いた点で貴重なものといえる。したがって、本研究者は歯学博士の学位を得る資格があるものと認める。