

Title	培養ヒト腫瘍細胞におけるアルキル化剤によるDNA損傷とその修復
Author(s)	辻村, 亨
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	<a href="http://hdl.handle.net/11094/35282">http://hdl.handle.net/11094/35282</a>
DOI	
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

氏名・(本籍)	辻 村 亨
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 7658 号
学位授与の日付	昭和62年3月26日
学位授与の要件	医学研究科病理系専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	培養ヒト腫瘍細胞におけるアルキル化剤によるDNA損傷とその修復
論文審査委員	(主査) 教授 北村 旦 (副査) 教授 森 武貞 教授 野村 大成

### 論文内容の要旨

#### [目的]

N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) や N-methyl-N-nitrosourea (MNU) などのアルキル化剤はDNAと反応して、DNA塩基のさまざまな部位をアルキル化する作用を持っている。このようなアルキル化塩基の中でもグアニンの6位の酸素のアルキル化 ( $O^6$ -methyl-guanine;  $O^6$ -MeG) は致死や突然変異及び発癌に深く関与していると考えられている。この  $O^6$ -MeG はメチル転移酵素 (MTR) によって修復されることも分っている。

ヒト腫瘍細胞株は  $O^6$ -MeG を修復できる  $Mer^+$  ( $Mex^+$  とともいう) 表現型と、MTR 活性を欠損しているため  $O^6$ -MeG を修復できない  $Mer^-$  ( $Mex^-$ ) 型に分類される。調べられた限りの正常組織の細胞はすべて  $Mer^-$  であるから、もし  $Mer^-$  型の腫瘍がみつかれば、適当なアルキル化系抗腫瘍剤で、腫瘍細胞だけを選択的に殺す化学療法が可能になると考えられる。そこで日本人由来の腫瘍細胞株における  $Mer^-$  型の頻度を調べると同時に、各々の細胞についてアルキル化系抗腫瘍剤である塩酸ニムスチン (ACNU) に対する感受性について検討した。

又、ヒト細胞において  $O^6$ -MeG が致死損傷であることを明らかにするために、 $Mer^-$  型細胞に機能の良く解明されている大腸菌の MTR 遺伝子 (ada 遺伝子) を導入し、その形質転換細胞と親株についてアルキル化剤感受性を比較検討した。

#### [方法ならびに成績]

##### 1. 日本人由来の腫瘍細胞株における $Mer^-$ 株の頻度及び ACNU 感受性

用いた細胞株は、胃癌由来 9 株、肺癌 8 株、口腔粘度癌 4 株、骨肉腫 3 株、腎癌 2 株、膀胱癌 2 株、

悪性黒色腫 2 株, 神経芽細胞腫 2 株, 肝癌 2 株, 甲状腺癌 1 株, 上顎洞癌 1 株, 乳癌 1 株, 横紋筋肉腫 1 株, 絨毛癌 1 株, 胃絨毛癌 1 株の腫瘍細胞株 40 種類と正常組織由来の細胞株 12 種類である。これらの細胞を超音波で破碎し, これを遠心分離した上清より細胞粗抽出液を調整した。仔牛胸腺 DNA を  $^3\text{H}$ -MNU で処理し,  $\text{O}^6$ -MeG のメチル基が  $^3\text{H}$  で標識された基質 DNA を作製した。基質 DNA と各々の細胞粗抽出液とを  $37^\circ\text{C}$  で 60 分間反応させ, 蛋白分画に移った  $^3\text{H}$  放射能を測定することによって MTR 活性を比較した。5 株 (肺癌及び悪性黒色腫由来株それぞれ 2 株, 甲状腺癌 1 株) は極めて活性が低いか欠損していたので Mer<sup>-</sup> と判定した。ACNU に対する致死感受性をコロニー形成法で調べたところ, これらの Mer<sup>-</sup> 細胞は著しい高感受性を示した。MTR 活性を有する細胞においても, MTR 活性が低い細胞ほど ACNU に対する感受性は高く, 両者の間に相関関係が認められた。又, 正常組織由来の細胞は全て MTR を有し, ACNU に対しても抵抗性を示した。

## 2. 大腸菌アルキル化損傷修復遺伝子のヒト Mer<sup>-</sup> 細胞での発現

大腸菌 MTR 遺伝子の 5' 側に SV40 由来のプロモーターを, 3' 側にポリ A サイトを結合させたものとネオマイシン耐性遺伝子の両方を持つプラスミドを作製した。この DNA をリン酸カルシウム法により Mer<sup>-</sup> 細胞 (HeLa MR) 内に導入し, ネオマイシン及び ACNU の両者に耐性の形質転換細胞を得た。形質転換細胞 DNA の Southern blot 解析により大腸菌 MTR 遺伝子がヒト染色体に組み込まれていることを, RNA dot blot hybridization 法によりこの遺伝子の mRNA が作られていることを確認した。これらの形質転換細胞で生産されている MTR は分子量約 40kd の大腸菌 MTR であることを SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で確認した。

コロニー形成法によって致死感受性を調べたところ, 形質転換細胞の MNNG に対する感受性は親株である Mer<sup>-</sup> 細胞よりも 20 倍以上も低下しており, MTR 活性の高いクローンほど MNNG に抗体性であった。更に MNNG で誘発される姉妹染色分体交換 (SCE) もほぼ完全に抑制された。ACNU に対する致死感受性に関しても同様の結果が得られた。

### [総括]

1. 日本人由来の腫瘍細胞株におけるアルキル化損傷修復欠損株 (Mer<sup>-</sup> 型) の頻度は, 約 13% (5/40) であった。これらの細胞の ACNU に対する致死感受性は著しく高かった。一方, 正常組織由来の細胞は全て MTR を有した。これらの事実は, ACNU 等のアルキル化系抗腫瘍剤で, Mer<sup>-</sup> 型腫瘍細胞だけを選択的に殺す化学療法の可能性を示唆している。
2. 大腸菌 MTR 遺伝子を導入した形質転換細胞は, 親株である Mer<sup>-</sup> 細胞よりもアルキル化剤致死感受性が低下し, MNNG による SCE 誘発は完全に抑えられた。すなわち, ヒト腫瘍細胞において  $\text{O}^6$ -MeG が致死損傷であり, 且つ SCE を誘発する損傷であることが分った。

## 論文の審査結果の要旨

アルキル損傷修復欠損型 (Mer<sup>-</sup>) 腫瘍の検索とその特性を調べることは, アルキル化系抗腫瘍剤で

腫瘍患者を選択的に治療する可能性を現実のものとするための基礎研究として重要である。

本論文は日本人由来の腫瘍細胞株において、Mer<sup>r</sup>型腫瘍の頻度を検討するとともに、アルキル化系抗腫瘍剤の1つである塩酸ニムスチン（ACNU）に対する腫瘍細胞の感受性とアルキル化損傷修復酵素活性の間に相関関係を見出したものである。更に、大腸菌のアルキル化損傷修復遺伝子をヒト細胞に導入し、ヒト細胞においてO<sup>6</sup>-アルキルグアニンが致死損傷であることを直接証明した。

以上のように本論文は、アルキル化剤の殺腫瘍細胞効果の機序に関する新しい知見を提供するとともに、その応用としてアルキル化剤による選択的化学療法の可能性を示唆するものである。従って、医学博士の学位を授与するに値すると考えられる。