



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	大阪大学, 1987, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/35282
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

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 (M N N G) や N-methyl-N-nitrosourea (M N U) 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 (M T R) 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⁺ともいう) 表現型と、M T R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 (A C N U)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M T R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A C N U感受性

用いた細胞株は、胃癌由来9株、肺癌8株、口腔粘膜癌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、上頸洞癌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³H-MNUで処理し、O⁶-MeGのメチル基が³H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°Cで60分間反応させ、蛋白分画に移った³H放射能を測定することによってMTT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⁻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⁻細胞は著しい高感受性を示した。MTT活性を有する細胞においても、MTT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MTT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⁻細胞での発現

大腸菌MTT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⁻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MTT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MTTは分子量約40kdの大腸菌MTT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MNNNGに対する感受性は親株であるMer⁻細胞よりも20倍以上も低下しており、MTT活性の高いクローンほどMNNNGに抗体性であった。更にMNNNG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]

- 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⁻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MTT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⁻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。
- 大腸菌MTT遺伝子を導入した形質転換細胞は、親株であるMer⁻細胞よりもアルキル化剤致死感受性が低下し、MNNNG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O⁶-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⁻）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⁻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い出したものである。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O⁶-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。