

Title	低用量アルキル化剤による悪性形質転換抑制とミトコンドリアDNAの安定性との連関に関する研究
Author(s)	小野寺, 章
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/57947">https://hdl.handle.net/11094/57947</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

[8]

氏名	おの 寺 章 の であら
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第 23751 号
学位授与年月日	平成22年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科応用医療薬科学専攻
学位論文名	低用量アルキル化剤による悪性形質転換抑制とミトコンドリアDNAの安定性との連関に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 堤 康央 (副査) 教授 那須 正夫 教授 高木 達也 教授 平田 収正

## 論文内容の要旨

発がん性のリスクは、化学物質や放射線の安全な使用を目的に、無毒域が存在しない原点を基準とする古典的な用量-反応曲線により評価されている。このような発がん物質の安全性評価は、「発がん物質の閾値(無影響)レベルを極めて正確に確定することはできない」とする定理に基づく。しかし、これら概念は、低用量・低線量域における生体反応を考慮していない。近年、このような発がん閾値に関する問題の解明は、発がん物質や放射線による生体反応の正確な理解をする上で必要不可欠と考えられている。放射線においては、低線量による生体への有効性を示す研究成果が多数報告されており、放射線ホルミシス療法として実験的・臨床的に試みられている。放射線ホルミシスは、ミズーリ大学のトーマス・D・ラッキー博士により1978年に提唱され、「生物に対して通常有害な作用を示すものが、微量であれば逆に良い作用を示す生理的刺激作用」と定義されている。そこで、本研究は、「低用量・低線量であるが故の新たな有効性(低用量効果)」を見出すため、抗がん剤として利用される発がん物質のアルキル化剤に関する解析を中心に、低線量放射線ホルミシスの研究と併に、生体への有効性を追求した。

アルキル化剤は、マスタードガスの研究から開発された、代表的な細胞障害性抗がん剤として広く知られている。一方、低用量域の生体反応に関する研究成果は、皆無である。そこで、培養細胞を用いた形質転換に関する解析から、低用量アルキル化剤(MNNG; *N*-Methyl-*N*'-Nitro-*N*' Nitrosoguanidine)の新たな有効性について検討した。アルキル化剤の低用量は、BALB/3T3 A31-1-1細胞株を用いた生存率試験から95%生存率に相当する濃度とした。

まず、自然発生の形質転換率を増加させたHST-BALB 3T3細胞株(High-spontaneous-transformable BALB/3T3 A31-1-1)への低用量アルキル化剤の形質転換率への影響を検討した。その結果、低用量アルキル化剤により誘発される形質転換細胞の割合は、HST-BALB/3T3細胞が示す自然発生の形質転換率より減少することを新たに見出した。続いて、化学物質の発がん性試験に用いられるBALB/3T3 A31-1-1細胞株を用いて低用量アルキル化剤(MNNG)の有効性を検討した。しかし、生存率や形質転換率への有効性または有害性は、認められなかった。

そこで、放射線ホルミシス効果の一貫として認識されている、低用量前処置による高用量への抵抗性獲得(適応応答)について検討した。その結果、低用量アルキル化剤(MNNG)を予め処置しておくことで、高用量アルキル化剤(MNNG)で誘発される形質転換細胞の割合が減少することを新たに見出した。一方、低用量アルキル化剤(MNNG)による適応応答は、生存率や細胞死(アポトーシス・ネクローシス)、そして細胞増殖への有効性や有害性は認められなかった。

そこで、低用量アルキル化剤(MNNG)の適応応答を解明するため、がんの発症と関連する活性酸素種や抗酸化系への影響を追求した。その結果、低用量アルキル化剤(MNNG)を予め処置しておくことで、高用量アルキル化剤(MNNG)で誘発される活性酸素種レベルが減少することを新たに見出した。さらに、このような活性酸素種への有効性は、細胞質やミトコンドリアに局在する抗酸化因子のmRNA発現や総量の増加が関連する作用であった。続いて、これら抗酸化因子への有効性について、ミトコンドリアに局在するSOD2やTrx2の関与が強く示唆されたため、ミトコンドリアDNA(mtDNA)への低用量アルキル化剤(MNNG)の有効性を検討した。その結果、高用量アルキル化剤(MNNG)による、アルキル化mtDNA(O-6メチルグアニン)の形成は、低用量アルキル化剤の前処置により減少した。さらに、高用量アルキル化剤(MNNG)によるmtDNAコピー数の低下は、低用量アルキル化剤(MNNG)の前処置により回復した。これら結果は、低用量アルキル化剤(MNNG)による適応応答は、ミトコンドリアDNAを保護する細胞内環境に調節していることが示唆された。

また、これら結果から低用量アルキル化剤(MNNG)の有効性は、アルキル化系抗がん剤による副作用の軽減に貢献することが想定された。そこで、がん細胞にも同様の有効性を示すのか否かについて追求した。がん細胞は、SV-40ががん化したSV40-BALB/3T3細胞株、ヒト肝がん由来HepG2細胞株、ヒト乳がん由来MCF-7細胞株を用いた。その結果、高用量アルキル化剤(MNNG)を処置した後の生存率、浸潤率、足場非依存性の増殖に、低用量アルキル化剤(MNNG)の前処置の有効性や有害性は認められなかった。

また、低用量アルキル化剤(MNNG)の有効性に関し、マウス個体を用いて検討した。その結果、高用量アルキル化剤(MNNG)により形成される胃潰瘍が、低用量アルキル化剤の前処置により減少することを新たに見出した。

以上の結果から、低用量アルキル化剤(MNNG)の有効性は、正常細胞に特異的な反応であり、培養細胞からマウス個体まで実験対象に限定されない作用であることが明らかとなった。

また本研究は、線虫を用いた低線量放射線ホルミシス効果に関する解析から、X線による寿命延長効果や酸化剤への抵抗性を明らかにし、Cep-1 (p53ホモログ) が放射線ホルミシスに関連する新たな知見の発見に至っている。

これら研究成果は、明確な作用機序の発見にまでは至らなかったものの、低用量効果の種々応用できる可能性を十分に解き明かしたと考えられる。しかし、これら概念をヒトへ外挿するには多くの課題が残されている。特に、複数のアルキル化系抗がん剤を用いた解析や、抗がん剤治療の副作用軽減に直接関連する研究成果を、蓄積することが必要と考える。また、このような概念が確立されることで、がん化学療法の新たな治療プロトコル(低用量抗がん剤の前投与等)の確立に大きく貢献できるものと期待され、がん化学療法の発展やがん患者のQOLの向上に寄与するものと考えられる。

これら結果は、これまでにほとんど注目されていなかった低用量効果が今後、注目すべき魅力的な研究対象であることを明確に示すことができたことと考える

## 論文審査の結果の要旨

アルキル化剤系抗がん剤の多くは、発がん性物質に分類され、低用量においても発がんリスクがあ

るものと考えられており、その毒性作用が動物試験の結果をもとにヒトへの影響として外挿され、閾値無しが発がん性物質として見なされている。そのため、アルキル化剤の安全性評価は、濃度依存性に焦点があてられており、アルキル化剤の低用量曝露時における生体影響に関する研究は皆無と言える。以上の背景から本研究では、低用量であるが故に見いだされなかった新たな生命現象やその可能性を毒性学的観点から追求するため、アルキル化剤の低用量曝露における生体影響の解析を行い、将来の安全ながん化学療法の確立に資する、興味深い知見・結論を得た。

1. 低用量のアルキル化剤による前処理は、高用量のアルキル化剤によって誘発される形質転換に対し、耐性獲得をもたらし得ることを先駆けて明らかとした。
2. アルキル化剤の低用量効果は、ミトコンドリアを作用点とし、ミトコンドリアの安定性を保護・向上させる細胞内環境へと調節することが示唆された。
3. アルキル化剤の低用量効果は、培養細胞からマウスまで普遍的な作用として存在し得ることを先んじて明らかとした。
4. 事前の弱い刺激による耐性獲得は、下等動物からげっ歯類に至るまで、保存されていることが示唆された。

以上、本研究で得られた知見は、安全かつ有効ながん化学療法の新たな治療プロトコルの確立に大きく貢献できるものと期待され、がん化学療法の発展やがん患者のQOLの向上に寄与するものであり、博士(薬学)の学位を授与するにふさわしいものと考えられる。