細胞周期の進行阻害で誘発される4倍体細胞は各種制がん剤に対する耐性細胞出現頻度を増強しゲノム不安定性を獲得する

氏　　　名	橋本光正
生年月日	
本　　　籍	大阪府
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	博甲第178号
学位授与の日付	平成8年3月25日
学位授与の要件	課程博士（学位規則第4条第1項）
学位授与の題目	細胞周期の進行阻害で誘発される4倍体細胞は各種制がん剤に対する耐性細胞出現頻度を増強しゲノム不安定性を獲得する （Inhibition of cell cycle progression produces tetraploid V 79 cells which have both increased drug resistance and genomic instability with a propensity for gene amplification）
論文審査委員	（主査）二階堂　修 （副査）正宗行人，大熊勝治 鈴木文男，森　俊雄

学位論文要旨

Various cell cycle inhibitors (aphidicolin, colcemid and K-252a) pruduced tetraploid or polyploid cells and increased the frequency of methotrexate-resistant (MTX^r) cells in a dose-dependent manner in Chinese hamster V79 cells. Colcemid increased the frequency of Doxorubicin-resistant or Taxol-resistant cells as well. Tetraploidization was suggested to be one of the mechanisms for enhancement ot resistance to various chemicals, since tetraploid V79 clones were more resistant to Doxorubicin than deploid V79 cells, possibly by having a reduced drug uptake. When tetraploid 150 nM-MTX^r clones were cultured with stepwise increased MTX selection, they readily developed resistance to 40,000 nM MTX with amplification in the dihydrofolate reductase (*dhfr*) gene within three months. On the other hand, near-diploid 150 nM-MTX^r clones could not acquire resistance beyond 5,000 nM MTX during the same period, and did not show any amplification of the *dhfr* gene even at 5,000 nM-MTX resistant stage. These results suggest that the near-tetraploid clone have genomic instability with the propensity for gene amplification during stepwise MTX selection.

がん細胞は形態学的に極めて変化に富み，異常な増殖能を持ち，浸潤転移する能力を持っている。このようながん細胞の中には，ゲノム不安定性を持つものがあることが知られている。ゲノム不安定性の特徴は染色体の構造異常，多倍体，遺伝子増幅，転座，欠失や点突然変異である。がん細胞では，正常細胞に比べて核の形態学的な変化，大きさや形，染色体の数，および構造の異常等が認められる。またこのようながん細胞の中には，変異率が異常に高く，その進展を助長し，化学療法剤の攻撃から逃れるように変化するものも存在している。これらのことから，正常細胞がゲノム不安定性を獲得することは，細胞レベルにおける発がんの重要な鍵を握り，その進行にも関係してくる可能性が考えら

れる。一方，DNA 合成阻害剤（アフィディコリン：APH，ハイドロキシウレア）を細胞に処理すると，制がん剤の一つであるメソトレキセート（MTX）に対して耐性を獲得すること，また，近年の細胞周期に関する研究によれば，DNA 合成阻害剤を含む細胞周期の進行を阻害するような処理を施すと，細胞は多倍体化することが知られている。そこで，本研究では，細胞周期進行の阻害剤を処理することによって4倍体を含む多倍体細胞が誘導されると同時に，種々の制がん剤に対する耐性化の頻度が高まる現象について機構解析を試みた。さらに，細胞周期進行の阻害剤等で誘導された4倍体細胞は，遺伝的に最も安定した2倍体を逸脱したゲノム不安定状態にあることを，MTX を用いた選択培養下における *dhfr* 遺伝子の遺伝子増幅動態を検討することにより明らかにすることを試みた。

まず，細胞周期の進行を阻害する薬剤を処理したとき，細胞の DNA 量分布がどのように変化するかについて検討した。細胞周期進行阻害剤として次の3種類を選んだ。Aphidicolin は DNA polymerase α，δ，ε の阻害剤であり，S 期で細胞を停止させる。Colcemid はチューブリンの重合阻害剤であり，M 期で細胞を停止させる。また，K-252a はプロテインカイネースの阻害剤であり，G2 期の停止剤として知られている。これらの細胞周期進行阻害剤をチャイニーズハムスター V79 細胞に処理したときの，DNA 量分布の変化（倍数性の変化）をフローサイトメトリーで調べた。

Aphidicolin 0.1 μM の54時間処理では，対照の細胞と比較して変化は認められなかった。しかし，0.3および0.5 μM 処理では，8C（4倍体細胞のG 2/M）ピークが濃度依存的に上昇し，4倍体細胞の出現が明らかとなった。0.5 μM 処理の場合，4倍体細胞の全細胞に占める割合は約10%であった。

Colcemid 0.015 μg/ml の48時間処理では，未処理の細胞との間にほとんど差異は認められなかった。しかし，0.025 μg/ml 処理においては，8C（4倍体細胞の G2/M）ピークが現れ，4倍体細胞の出現が明らかとなった。4倍体を含む多倍体細胞の割合は約30%であった。0.05 μg/ml 処理では，2倍体細胞はほとんど存在せず，ほぼ完全に多倍体細胞に変化し，8C ピークに加え，16C（8倍体細胞の G2/M）ピークも認められた。

K-252a を48時間処理した場合も，Colcemid 処理の場合と同様に濃度依存的に多倍体細胞の誘導が認められた。200 nM 処理で4倍体細胞は50%を占め，250 nM 処理では4倍体および8倍体細胞はそれぞれ50%および30%を占めるに至った。さらに，500 nM 処理ではもはや2倍体細胞はほとんど認められず，4倍体および8倍体細胞が30%および60%となった。

処理条件の違いによって効果に差はあるものの，3種類の細胞周期進行阻害剤の処理によって4倍体を含む多倍体細胞が誘発されることが明らかとなった。

続いて，多倍体細胞を誘発したのと同じ条件下で細胞周期進行阻害剤を処理したときの生存細胞当たりの MTX 耐性細胞出現頻度を検討した。Aphidicolin で54時間処理した場合，150 nM の MTX に対する耐性細胞の出現頻度が濃度依存的に上昇した。0.5 μM 処理では，未処理の場合に比べて約60倍の MTX 耐性細胞出現頻度が得られた。Colcemid，あるいは K-252a で48時間処理したときも同様に，350 nM の MTX に対する耐性細胞出現頻度が濃度依存的に上昇することがわかった。0.05 μg/ml の Colcemid 処理および250 nM の K-252a 処理では，未処理の細胞に比べて MTX 耐性細胞出現頻度が各々約50倍および40倍増加した。これらの処理が他の制がん剤に対しても有効性があるのかを確かめた。V79 細胞を Colcemid で48時間処理した後，Doxorubicin，Taxol，ACNU に対する耐性獲得頻度を求めた。Colcemid で48時間処理した細胞は，Doxorubicin，Taxol に対しては未処理のものに比べて耐性獲得頻度が上昇した。しかし ACNU についてはそのような効果は認められなかった。これらの結果を考え合わせると，4倍体を含む多倍体細胞の誘導がある種の制がん剤に対する抵抗性獲得頻度の上昇に関与している可能性が示唆される。そこで次に，プラスチックシャーレ上に形成された多くの Colcemid 誘発 MTX 耐性コロニーについて，直接 DNA 量を測定することにより，コロニーを形成する細胞が2倍体由来かあるいは多倍体由来かについて調べ，自然発生の MTX 耐性細胞のものと比較した。0.015 μg/ml の Colcemid で誘発された MTX 耐性細胞の DNA 量は自然発生のものと変わらず，全て2倍体由来であることがわかった。一方，高濃度の Colcemid（0.025，0.05 μg/ml）

処理で誘発したMTX耐性細胞の中には処理濃度に依存して2倍体を超えるDNA量を持つものが多くなった。つまり，MTX耐性細胞を高頻度で出現させるような濃度のColcemidの処理で誘発された耐性細胞には，多くの多倍体細胞（主に4倍体細胞）が含まれていることを示している。

制がん剤耐性細胞出現頻度の上昇と細胞の多倍体化との関連を更に研究するために，AphidicolinおよびColcemidで誘発したMTXおよびDoxorubicin耐性コロニーをランダムにクローニングし，各クローンについて，耐性獲得の原因となりうる性質を検討した。なお，自然発生およびAphidicolin誘発の150 nM-MTX耐性クローンをS150MXおよびA150MXと，自然発生およびColcemid誘発の350 nM-MTX耐性クローンをC350MXおよびS350MXと，さらには，Colcemid誘発の250 nM-Doxorubicin耐性クローンをC250DXと表記した。これらの制がん剤耐性クローンから代表的なものを選び，耐性に関係する性質を詳細に解析した。2つの自然発生MTX耐性クローンは，22本の染色体を持つ2倍体細胞であり，一方は*dhfr*遺伝子の増幅（1.8倍）を原因とするDHFR蛋白の増加を，もう一方は*dhfr*遺伝子の増幅を原因としないDHFR蛋白の増加を示した。Aphidicolin誘発4倍体細胞由来のMTX耐性クローンでは，単位DNAあたりの*dhfr*遺伝子の増幅は見られなかったが，2倍体のV79細胞に比べ，約2倍の細胞あたりのDHFR蛋白量を示した。また，Colcemid誘発Doxorubicin耐性クローンでは，2倍体細胞も4倍体細胞由来も共に*pgp* 1遺伝子の増幅を示さなかった。こうした結果は，4倍体であること自体が制がん剤に対する耐性度を増加させていることを示唆している。

これまでの結果から，制がん剤耐性細胞出現頻度の上昇の一つの機構として細胞の4倍体化が強く示唆された。この関連性をさらに確実なものにするために，V79細胞から正4倍体クローン（T1, T2）を樹立し，これらの細胞におけるDoxorubicinに対する生存率を調べた。その結果，4倍体細胞T1, T2は，明らかにV79よりも制がん剤Doxorubicinに対して抵抗性であった。4倍体クローンがV79細胞に比べDoxorubicinに対して抵抗性である機構を解析する目的で，Doxorubicinの細胞内取り込みを調べた。各細胞におけるDoxorubicinの細胞内取り込みは処理濃度に依存して増加した。興味あることには，4倍体クローンにおける細胞内取り込み量はV79細胞の2倍を下回ることがわかった。また，T1はT2に比べてDoxorubicinに対してより抵抗性であったが，細胞内取り込みもより少ないことがわかった。Doxorubicinの細胞内取り込み量，DNA量，および細胞体積の相関性を調べると，Doxorubicinの細胞内取り込み量は，各細胞の細胞体積と極めてよく相関することがわかった。このことは，Doxorubicinの単位体積当たりの取り込みは3種類の細胞で同等であり，最終的な細胞内取り込み量は各細胞の細胞体積に依存することを示唆している。それ故，T1，T2のように，4倍体クローンにおける細胞体積が2倍体であるV79細胞の2倍に満たない場合は，単位DNA当たりの取り込み量は相対的に少ないものとなり，DoxorubicinのもたらすDNA損傷は4倍体クローンの方がV79よりも少なくなると考えられる。以上のことから，4倍体細胞のDoxorubicinに対する耐性度の上昇の原因の一つとして，染色体DNAが2倍に増加しても，細胞体積の増加は2倍に満たない場合があり，それに伴い単位DNA当たりの制がん剤の取り込みが低くなることが制がん剤に対する抵抗性を増加させる原因であると考えられる。従来，その細胞のDNA量と体積は比例すると考えられていたが，本研究の結果からはそれほど高い相関性はないことがわかった。

次に近4倍体クローンと近2倍体クローンにおける*dhfr*遺伝子の増幅動態を指標にしたゲノム不安定性の比較を行った。2倍体を逸脱した近4倍体の150 nM-MTX抵抗性クロン（A150MX-4, A150MX-6）が，MTX濃度を次第に増加させる段階的選択培養に対してどのように反応するかを検討した。対照の2倍体クローンとして*dhfr*遺伝子の増幅した（S150MX-1）ものと，増幅のない（A150MX-2，A150MX-3）ものの両方を用いた。4倍体クローンは，MTXの段階的濃度増加に伴い容易に耐性を示し，3ケ月以内に40,000 nMのMTXに耐性を獲得した。*dhfr*遺伝子の増幅した2倍体クローンも，予想されたように，わずか2ケ月で50,000 nMのMTXに耐性を獲得した。それに対して，*dhfr*遺伝子の増幅を示さない2倍体クローンは，3ケ月間で高々5,000 nMのMTX耐性を獲得できたにすぎなかった。A150MX-2は，選択培養開始後45日目に5,000 nMのMTX耐性を獲得したが，次の45日間

でも耐性濃度は上昇しなかった。４倍体クローンと *dhfr* 遺伝子の増幅した２倍体クローンは，MTX抵抗性獲得の程度に見合う *dhfr* 遺伝子の増幅，mRNA の過剰発現，DHFR タンパクの過剰生産が認められた。これらのクローンで *dhfr* 遺伝子の増幅過程に差異があるかを検討するために，10,000 nM-MTX耐性を獲得した細胞で Southern blot および FISH 解析を行った。その結果，*dhfr* 遺伝子の増幅部位に大きな再構成が行われたことを示すものはないと考えられた。また FISH 解析により，いずれの10,000 nM-MTX 耐性細胞においても，１本の染色体上に *dhfr* 遺伝子がクラスター状に増幅していることが確認された。

４倍体クローンと遺伝子増幅を伴う２倍体クローンは，両者ともに MTX の選択培養下で *dhfr* 遺伝子を容易に増幅する性質を持っていた。また増幅の仕方は類似した機構によると考えられる。しかし，両者間には決定的な相違が考えられる。つまり，前者が MTX の選択培養下でのみゲノム不安定性である可能性があるのに対し，後者は，あらゆる選択条件下でゲノム不安定性であることが考えられる。何故なら４倍体クローンは全ゲノムセットが倍加しており，あらゆる選択圧に対して有効である可能性がある。

学位論文の審査結果の要旨

本論文の審査は，各審査員が提出された論文の内容につき慎重な審査を行い，かつ申請者と面接した結果，並びに平成５年２月６日開催の口頭発表の内容を踏まえて，同日開催の論文審査委員会で行われ，以下の通り判定した。

本研究論文は，チャイニーズハムスターＶ79細胞を用いてその細胞周期の進行を阻害すると，阻害時期（M, S, G2 期）に関わらず４倍体及び多倍体細胞が誘発されること，さらに各種の制がん剤に対する耐性頻度が上昇することを明らかにした。本研究はこうした現象をもとに，新しい制がん剤耐性機構を提示した。つまり，細胞は４倍体化にともない，２倍体細胞に比べ，DNA 当たりの制がん剤取り込み量を減少させ，耐性度を高めるというものである。従来，制がん剤に対する耐性については，標的遺伝子の増幅あるいは p- 糖蛋白（*pgp1*）の過剰発現など多くの機構で説明されてきた。しかし，今回提示された機構は全く新しいものであり，構造の異なる少なくとも３種類の制がん剤に対する耐性を説明するものとして貴重である。本研究では Doxorubicin について詳細に検討を加え，細胞の多倍体化が制がん剤の取り込みを低下させて耐性を誘導する結果を得た。がん細胞には染色体数を増加した異数性を示す細胞が高頻度に観察されることから，細胞の多倍体化ががんの化学療法効率を左右する要因の一つとなることを示唆し，制がん剤に対する自然耐性獲得機構を説明するものである。

一方，以上のようにして樹立された４倍体細胞は，２倍体細胞に比べ，制がん剤存在下の段階的選択培養系で容易に遺伝子増幅を引き起こすようなゲノム不安定性を獲得していることを DNA, RNA, 蛋白の各レベルで証明した。また，遺伝子増幅を FISH 法などを用いて検出することが出来た。これらの結果を利用することにより，がん細胞の制がん剤耐性化獲得機構の解析に役立つと考えられる。また，４倍体細胞のゲノム不安定性を利用して特定の標的遺伝子を増幅させ，当該遺伝子のクローニングを行うなど，新しい実験手法としての利用価値は高いと考える。

以上の知見は，細胞の多倍体化が制がん剤への細胞の耐性の獲得を説明するものであり，多媒体細胞が特定の環境条件下では容易に遺伝的不安定性を獲得するに至ることを実証した点で評価される。以上の観点から本論文は博士論文に値すると委員会で判定した。