

氏 名 (本籍)	かく 角	た 田	ひで 英	き 樹
学 位 の 種 類	医	学	博	士
学 位 記 番 号	医	第	1768	号
学位授与年月日	昭和61年2月26日			
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当			
最 終 学 歴	昭和54年3月 弘前大学医学部医学科卒業			
学位論文題目	Methotrexate と 5 - fluorouracil の併用効果に 関する基礎的研究			

(主 査)

論文審査委員 教授 涌 井 昭 教授 今 野 多 助

教授 渡 辺 民 朗

論文内容要旨

目 的

Methotrexate (MTX) と 5-fluorouracil (5-FU) 併用による抗腫瘍効果増強の機序を解明するとともに、両薬剤の至適投与間隔設定に資するため、L 1210 細胞及び HeLaS₃ 細胞を用い、細胞内 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate (PRPP) 濃度と 5-FU の高分子物質への取り込みとの関連について検討した。

実 験 方 法

L 1210 細胞及び BDF₁ マウス骨髄細胞は、10% 仔牛血清加 RPMI-1640 培地で、HeLaS₃ 細胞は 10% 牛胎児血清加 Eagle MEM 培地で培養した。5-FU の細胞内各画分への取り込みをみるため、³H-5-FU とともに各細胞を培養した。MTX の影響をみる場合は、培地中に MTX を加えた。

細胞内 PRPP の測定には [carboxyl-¹⁴C] orotic acid を用いた。[carboxyl-¹⁴C] orotic acid は、orotidine-5'-monophosphate pyrophosphorylase と orotidine-5'-monophosphate decarboxylase の 2 つの酵素の存在下で、PRPP 依存性に ¹⁴C を放出するため、放出された ¹⁴C の放射活性を測定することにより間接的に PRPP 活性を求めた。

細胞の酸不溶性画分への 5-FU の取り込みは、³H-5-FU を取り込んだ細胞をガラスファイバーフィルター上でトリクロロ酢酸を用いて洗浄し、フィルター上に残った放射活性を測定することにより求めた。

RNA は hot-SDS-phenol 法で細胞から抽出し、その OD を測定することにより定量した。また RNA 中の ³H-5-FU の放射活性を測定し、RNA への 5-FU の取り込みを求めた。さらに、抽出した RNA の一定量を蔗糖密度勾配遠心法によって解析し、その OD 及び 5-FU の取り込みのパターンをみた。

酸可溶性画分への 5-FU の取り込みは、過塩素酸を用いて、それに可溶性画分の ³H-5-FU の活性を測定することで求めた。また、過塩素酸に不溶性画分を 65°C、20 分間温浴中に保つことにより、その中に含まれる 5-fluoro-2'-deoxyuridine-5'-monophosphate (FdUMP), 5, 10-methylenetetrahydrofolate, thymidylate synthetase よりなる ternary complex から ³H-FdUMP を放出させ、その放射活性を測定して ternary complex に取り込まれた 5-FU を求めた。

結 果 及 び 考 察

10^{-7}M – 10^{-5}M 濃度のMTX処理により、L 1210細胞及びHeLaS₃細胞のいずれも濃度依存性に細胞内PRPPは上昇したが、L 1210細胞ではMTX処理後2–3時間で最大値を示し、HeLaS₃細胞では12–24時間で最大値に達した。またMTX耐性L 1210細胞におけるPRPPの上昇は、感受性細胞に比較して軽度で、最大値に達する時間も遅延した。一方BDF₁マウス骨髄細胞では、MTXによるPRPPの上昇は認められなかった。

L 1210細胞の酸不溶性画分への³H-5-FUの取り込みはMTX前処理により増大したが、BDF₁マウス骨髄細胞では、MTX処理の影響はみられなかった。この取り込みの程度は、MTXによる細胞内PRPPの上昇レベルと関連を有し、BDF₁マウス–L 1210細胞という担癌モデルにおけるMTX、5-FU併用効果の腫瘍選択性が示唆された。

L 1210細胞における酸可溶性画分、ternary complexへの³H-5-FUの取り込みは、細胞とMTXの接触時間に依存したPRPP上昇と相関した増加を示したが、RNAへの取り込みの増加はPRPPの上昇より長時間の接触を必要とした。またL 1210細胞では、MTXの前処理によりRNAへの5-FUの取り込みが増大すると、45S preribosomal RNAへの5-FUの蓄積が生じ、5-FUを取り込んだRNAのプロセシングの障害が示された。

HeLaS₃細胞の各画分への³H-5-FUの取り込みは、いずれもMTXとの接触時間に依存したPRPPの上昇と相関した増加を示した。

以上より、MTX、5-FUの併用においては、MTXによる細胞内PRPPの上昇が5-FUの細胞各画分への取り込みを増加させ、抗腫瘍効果を高めるものと考えられた。また、両薬剤の投与間隔は、MTX処理によるPRPPの上昇と、高分子物質への5-FUの取り込み増加との間に関連がみられたことから、L 1210細胞では、MTX処理後少なくとも3時間以上、HeLaS₃細胞では12時間以上を必要とすると考えられた。

審査結果の要旨

Methotrexate (MTX) と 5-fluorouraci (5-FU) の併用は癌化学療法効果の増強策としての biochemical modulation の 1 つとして注目されているが、未だこの両薬剤併用効果発現の生化学的基盤は明らかでない。

本研究は、MTX・5-FU 併用による抗癌効果の生化学的機序を明らかにし、両薬剤の至適投与間隔設定に資するため、癌細胞内 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate (PRPP) 濃度と 5-FU の高分子物質への取り込みとの関連について検討したものである。

著者はまず L1210 細胞、HeLaS₃ 細胞および正常マウス骨髄細胞を 10^{-7} ~ 10^{-5} M 濃度の MTX で処理し、これらの細胞内 PRPP 濃度を検討した。腫瘍細胞ではいずれも MTX 濃度依存性に PRPP は上昇したが、L1210 細胞では MTX 処理後 2 - 3 時間で、HeLaS₃ 細胞では 12 ~ 24 時間でピークに達した。また MTX 耐性 L1210 細胞の PRPP の上昇は感受性細胞に比較して軽度で、ピークまでの時間も遅延しており、骨髄細胞では MTX による PRPP の上昇はみられないことを示した。さらに L1210 細胞の酸不溶性画分への ³H-5-FU の取り込みは MTX 前処理により増大したが、BDF₁ マウスの骨髄細胞では、MTX 処理の影響はみられなかったことから、³H-5-FU の取り込みの程度は、MTX による細胞内 PRPP の上昇レベルと関連を有することが明らかになり、BDF₁ マウス-L1210 細胞系の担癌モデルにおいて MTX 5-FU 併用効果の腫瘍選択性を示唆する成績を得ている。次に著者は L1210 細胞の酸可溶性画分、ternary complex への ³H-5-FU の取り込みを検討したが、この取り込みは細胞と MTX の接触時間に依存した PRPP の上昇レベルに相関した増加を示し、RNA への取り込みの増加は PRPP の上昇より長い接触時間を必要とすることを指摘した。最後に著者は、RNA 庶糖密度勾配遠心パターンを検討し、L1210 細胞では、MTX の前処理により RNA への 5-FU の取り込みが増大すると、45S preribosomal RNA の蓄積が生じ、5-FU を取り込んだ RNA はプロセッシングの障害を受けることを示す成績を得ている。また HeLa S₃ 細胞の各画分への ³H-5-FU の取り込みも、MTX との接触時間に依存した PRPP の上昇と相関した増加が示されている。以上の検討成績から、MTX と 5-FU の併用においては、MTX による細胞内 PRPP の上昇が 5-FU の細胞各画分への取り込みを増加させて抗癌効果を高めるものであり、両薬剤の投与間隔は、MTX の処理による PRPP の上昇と高分子物質への 5-FU の取り込み増加との間に関係がみられたことから、L1210 細胞では 3 時間以上、HeLa S₃ 細胞では 12 時間以上を必要とすると結論している。この研究は、MTX、5-FU 併用効果の機序の一端を明らかにし、biochemical modulation の立場からの抗癌剤併用を開発する上で多くの示唆を与えるものである。よって本論文は学位授与に値する。