

氏 名（本籍） 柴 田 浩 行

学 位 の 種 類 医 学 博 士

学 位 記 番 号 医 博 第 1 0 7 4 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 3 年 3 月 28 日

学 位 授 与 の 条 件 学 位 規 則 第 5 条 第 1 項 該 当

研 究 科 専 攻 東 北 大 学 大 学 院 医 学 研 究 科  
（ 博 士 課 程 ） 内 科 学 系 専 攻

学 位 論 文 題 目 多 剤 耐 性 ヒ ト 慢 性 骨 髄 性 白 血 病 細 胞 株 K562 に お  
け る ， MDR1 遺 伝 子 発 現 調 節 へ の 分 化 レ ベ ル の 関  
与 に つ い て  
－ 酪 酸 ナ ト リ ウ ム に よ る P－ 糖 蛋 白 質 mRNA  
（ MDR1 mRNA ） の 発 現 増 強 －

（ 主 査 ）  
論 文 審 査 委 員 教 授 涌 井 昭 教 授 本 宮 雅 吉  
教 授 帯 刀 益 夫

## 論文内容要旨

多剤耐性は、癌化学療法を施行するうえでの大きな障害となっている。多剤耐性の一部は多剤耐性遺伝子（MDR 1 遺伝子）とその産物であるP-糖蛋白質が担っている。P-糖蛋白質は、分子量170キロダルトンの糖蛋白質で細胞膜に存在しており、その機能はATP依存性薬剤排出ポンプである。この蛋白質の作用を受けるビンカアルカロイド、ドキシソルピシン、コルヒチンなどは構造上や機能上の類似性が乏しい。この働きによって細胞内抗癌剤濃度が低下し、細胞は多剤耐性を獲得する。MDR 1 遺伝子の発現制御機構について現在盛んに研究が行われており、以下のような興味深い事実が明らかになっている。すなわちMDR 1 遺伝子の発現制御は、細胞、組織、発生段階などと特異的に関連している可能性がある。また、熱、ショック、ある種の薬剤などでMDR 1 遺伝子のプロモーター活性が上昇することがある。大腸癌細胞株では、高分化なものほど高いレベルのMDR 1 遺伝子の発現が認められるという報告もある。著者はMDR 1 遺伝子の発現調節に影響を与えるものについて検討してきたが、本研究は分化のレベルがP-糖蛋白質遺伝子（MDR 1 遺伝子）の発現調節にどのように関与しているかを調べることを目的として行った。ヒト慢性骨髄性白血病細胞K562を赤芽球へ分化誘導する作用のあるヘミン、酪酸ナトリウム、マイトマイシンCによってP-糖蛋白質mRNAを発現している多剤耐性K562細胞株を処理した場合、P-糖蛋白質mRNAの発現レベルがどのように変化するかをP-糖蛋白質遺伝子のc-DNAをプローブとしてnorthern blot hybridization法にて解析した。その結果、酪酸ナトリウム処理にてアドリアマイシン耐性K562細胞およびピンクリスチン耐性K562細胞では、P-糖蛋白質mRNA発現レベルは濃度依存性に増加し、10mM酪酸ナトリウム処理によって、アドリアマイシン耐性K562細胞のP-糖蛋白質mRNAの発現レベルはコントロールの20倍に、ピンクリスチン耐性K562細胞では、30mM酪酸ナトリウム処理によって5倍に増加した。一方、ヘミンやマイトマイシンC処理では、P-糖蛋白質mRNA発現レベルに影響を与えなかった。この時同時に、赤芽球への分化をBenzidine染色法にて調べたところ、アドリアマイシン耐性K562細胞では、ヘミン処理で高率にBenzidine陽性細胞が出現したが、ピンクリスチン耐性K562細胞ではBenzidine陽性細胞の出現率は低かった。酪酸ナトリウムやマイトマイシンC処理では、両細胞株ともにBenzidine陽性細胞の出現率は低かった。これらの結果より、本実験で使用したK562細胞株ではBenzidine陽性細胞の出現率とP-糖蛋白質mRNA発現レベルとは、必ずしも相関せず、分化レベルがP-糖蛋白質mRNA発現制御に関与している可能性は、この細胞株においては少ないと考えられた。さらにまたP-糖蛋白質mRNA発現調節への分化レベルの関与は、細胞もしくは組織特異性がある可能性がしめされた。また本研究で酪酸ナトリウム自身にP-糖蛋白質mRNA発現レ

ベルを増強する作用があることが示されたので、このメカニズムについて調べた。酪酸ナトリウムのP-糖蛋白質mRNA発現に与える影響をnorthern blot法にて経時的に調べると、その変化は二相性に推移することが判明した。3.0mM酪酸ナトリウムでアドリアマイシン耐性K562細胞を処理すると、処理後30分から12時間後までP-糖蛋白質mRNA発現量は対照の約30%まで抑制されるが、12時間以降、発現量は回復し、24時間後には対照の約10倍程度に発現が増強する。さらに蛋白質合成阻害剤であるサイクロヘキシミドでアドリアマイシン耐性K562細胞を処理し、リン酸緩衝液で洗浄した後、酪酸ナトリウム処理を行うとP-糖蛋白質mRNA発現増強はサイクロヘキシミド前処理によってsuperinductionされることが分った。このことから酪酸ナトリウムはP-糖蛋白質mRNAの転写レベルを活性化しているか、もしくはP-糖蛋白質が短寿命の蛋白質の制御を受けている可能性が示唆された。これらの詳細についてはrun off transcription法やCAT assayにて究明する必要がある。またアドリアマイシン耐性K562細胞を酪酸ナトリウム処理した時、アドリアマイシンに対する薬剤耐性を調べたが、対照と比べて薬剤耐性に差がなかった。P-糖蛋白質mRNAの発現増強は薬剤耐性の増強を伴わないことから、酪酸ナトリウムによって誘導されるP-糖蛋白質は正常なものとは若干異なっているのではないかと考えられた。今後は薬剤耐性を克服することを目標としてP-糖蛋白質mRNAの発現制御機構をさらに解明する必要があるが、今回得られた結果は、このような方法による薬剤耐性解除の可能性を示すものである。

## 審査結果の要旨

現状における癌化学療法は、白血病など一部に比較的満足し得る結果を得ているが、胃癌や大腸癌などの固形癌に対する治療成績は必ずしも良好とはいえない。

近年、多剤耐性という現象が発見され、これが癌化学療法の、大きな障害となっている。多剤耐性は、多剤耐性遺伝子MDR-1とその産物であるP-糖蛋白質の発現により構造上類似性の乏しい多くの抗癌剤に同時に耐性を獲得するという現象である。P-糖蛋白質は分子量170キロダルトンの膜蛋白質でエネルギー依存性に抗癌剤などを細胞外へ排出することが近年明らかになった。又その遺伝子、MDR-1のクローニングとその構造も決定された。MDR-1遺伝子のプロモーター領域の解析、MDR-1遺伝子の発現誘導に関する研究、P-糖蛋白質の構造と機能及びその機能を阻害する物質の検索、更にモノクローナル抗体の作製とその機能に関する研究などが行なわれている。更に分化誘導剤レチノイン酸で神経芽細胞腫細胞株を、酪酸ナトリウムなどで大腸癌細胞株を処理するとMDR-1遺伝子の発現が増強されることも報告されている。これらの事実よりMDR-1遺伝子の発現制御に細胞の分化レベルが関与している可能性が示唆されていた。

本研究は、MDR-1遺伝子の発現制御機構に関する基礎的研究であり、ヒト白血病細胞株K562をヘミン、酪酸ナトリウム、マイトマイシンCで分化誘導処理した時のMDR-1遺伝子の発現に与える影響と細胞の分化誘導レベルとの相関を調べたものである。その結果、K562細胞株においてはMDR-1遺伝子の発現は細胞の分化誘導レベルと相関せず、酪酸ナトリウムにのみ濃度依存性にMDR-1遺伝子の発現増強作用があることを明らかにした。この結果は、MDR-1遺伝子の発現は必ずしも細胞の分化レベルと相関するとはいえず、組織、細胞特異性があることを示している。

本研究では更に、酪酸ナトリウムによるMDR-1遺伝子発現に与える影響が、経時的に2相性に推移し、処理直後から短時間は発現を抑制し、その後発現の増強が認められることや、この発現増強は転写レベルの活性化による可能性があることなどの新しい知見を得ている。

現在、臨床的にも多剤耐性が関与している事実が数多く報告されており、多剤耐性克服のため、P-糖蛋白質を標的としたカルシウム拮抗剤やモノクローナル抗体の有効性が実験的にも確認されている。更に、P-糖蛋白質の発現阻止による多剤耐性の克服にも有効な治療法としての期待が寄せられており、その基礎的な研究としても本研究は意義があると考えられるので、学位授与に値するものである。