

氏 名 (本籍) とく 徳 え 江 ゆたか 豊

学 位 の 種 類 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 医 第 2 3 9 4 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 4 年 2 月 26 日

学 位 授 与 の 条 件 学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当

最 終 学 歴 昭 和 60 年 3 月 26 日
東 北 大 学 医 学 部 医 学 科 卒 業

学 位 論 文 題 目 Increased Levels of Mitochondrial DNA in
an Etoposide-resistant Human Monocytic
Leukaemia Cell Line (THP-1/E)
(エトポシド耐性ヒト白血病細胞株におけるミ
トコンドリア DNA の増幅)

(主 査)

論 文 審 査 委 員 教 授 本 宮 雅 吉 教 授 金 丸 龍 之 介

教 授 及 川 淳

論 文 内 容 要 旨

【目 的】

ミトコンドリアがヒトの種々疾患に際して、あるいはさまざまな実験条件下で多様な形態変化を示すことは広く知られている。またそのDNAは、ヒストンのようなDNA結合蛋白が欠如しており、DNA損傷や複製の誤りに対する修復機構が、核内DNAに比べて簡素であることから、いくつかの発癌物質や抗癌剤の標的となり易いことが指摘されている。しかし、ミトコンドリアに対するエトポシドの影響とその耐性に関する報告はほとんどない。そこで、エトポシド耐性株を樹立し、ミトコンドリアの形態学的変化、酵素活性、RNA、DNAについて検討をおこなった。

【材料および方法】

細胞；ヒト単球性白血病細胞株 THP-1 は、55°C、30分不活化した10%牛胎児血清を加えた RPMI-1640 培地を使用し、5%CO₂ 下37°Cで培養した。エトポシド耐性株 THP-1/E は、エトポシドを持続接触させ、段階的に濃度を増し1.0 μg/ml で安定な細胞を限界希釈法でクローニングし樹立した。この株は薬剤を除去した培地で3ヶ月継代しても耐性度は低下しなかった。

電子顕微鏡；10⁷の細胞を2.5%の冷グルタルアルデヒドにより1時間前固定し、さらに1%冷オスミウム酸で後固定したのち、エタノールで段階的に脱水し、プロピレンオキサイドで置換後、エポキシ樹脂に包埋した。マイクロームで超薄切片を作製し、酢酸ウラニール、およびクエン酸鉛の二重染色を行った後、日立 H-600 電顕により加速電圧75KV で観察撮影を行った。

チトクロム酸化酵素活性の測定；アスコルビン酸を用いて還元型としておいたチトクロム c に、ホモジネイトした細胞を加えて、酸化型に変わる量を550nm の吸光度にて測定した。ブランクとしては、フェリシアン化カリウムで酸化型としておいたチトクロム c を用いた。蛋白定量は Bradford 法にて行った。

RNA の抽出と Northern blot 法；全細胞 RNA は guanidine isothiocyanate/塩化セシウム法で抽出し、2M のホルムアルデヒドを含む1%アガロースゲルで電気泳動し、フィルターにトランスファーした後、hybridization した。28S と18S の ribosomal RNA の2つのバンドを計測して size marker とした。Dot blot は S&S 社の Minifold を用いた。

DNA の抽出と Southern blot 法；感受性株、耐性株より抽出した DNA をそれぞれ EcoRI で切断し、等量 (10 μg) の DNA をアガロースゲル電気泳動法で分離しニトロセルロースフィルターに移し hybridization した。

プローブ；Backer らの方法にて牛の肝臓よりミトコンドリア DNA を抽出し、EcoRI で切断し

た。Northern blot 法と Dot blot 法には4.8Kb-EcoRI断片を, Southern blot 法にはすべての断片を用いてミトコンドリアのプロープとした。核 DNA のプロープとしては α_1 -antitrypsin の全塩基配列を用いた。いずれも Nick translation 法により [α - 32 P] dCTP でラベルした。

【結 果】

1. 形態学的変化; 核, 核小体には大きな差は認められなかったが, 感受性株に比べ耐性株のミトコンドリアは, 著しく膨化していた。クリステは一部消失していたが, 比較的構造を保持していた。この変化は薬剤を除去した後2ヶ月経ても同様で, 不可逆性の変化と考えられた。
2. 酵素活性; 感受性株, 耐性株のチトクロム酸化酵素の活性はそれぞれ 36.1 ± 13.0 ($n=7$), 34.1 ± 11.3 ($n=7$) nmol/min/mg protein で有意差を認めなかった。
3. RNA; Northern blot 法では, 1.7Kbと0.7Kbにバンドを認めたが, 感受性株, 耐性株の間で mRNA の大きさに差を認めなかった。2倍希釈系列で行った Dot blot 法では, 両株間で量的な差を認めなかった。
4. DNA; 核 DNA は感受性株, 耐性株ともに10Kbの大きさの α_1 -antitrypsin の DNA が同定され質的, 量的な差は認められなかった。ミトコンドリア DNA では, 8Kb, 7.4Kbと1.1Kbの3つの断片が同定されたが大きさに差は認められなかった。しかし感受性株に比べ耐性株のバンドの黒化度は増加しており, デンシトメーターで定量してみると約4倍の値であった。

【考 察】

mtDNA の増幅は, エトポシドという生体に不利な環境のなかで生存していくうえで必要な, 生体防御反応のひとつの現れではないかと推測される。現時点ではこれらの変化が耐性獲得の原因であるのか, 結果であるのかは断定できないが, 耐性を獲得する過程において, ミトコンドリアに何らかの影響を与える因子が存在しており, 形態変化, mtDNA の増幅をきたしたと推測された。

審査結果の要旨

本論文は、エトポシド耐性ヒト白血病細胞株 (THP-1/E) とその親株 (THP-1) とを、ミトコンドリアの変化という観点から比較したものである。ミトコンドリア DNA に主要なサブユニットが支配されているチトクロム酸化酵素の活性や、定常状態の mRNA に変化がないにもかかわらず、ミトコンドリアの膨化という形態変化、ミトコンドリア DNA の増加をきたしていたと報告している。ミトコンドリアに対するエトポシドの影響とその耐性に関する報告はほとんどなく、その点で興味深い内容である。

本文でも述べられているように、ミトコンドリアは種々の疾患や実験条件下で多様な形態変化をおこすこと、またミトコンドリア DNA はヒストンのような DNA 結合蛋白が欠如しているため発癌物質や抗癌剤の標的となり易いことから、ミトコンドリアに注目したことも妥当であろう。

エトポシドの作用機序、耐性機序においてタイプ II トポイソメラーゼの関与が報告されている。この観点からは参考論文 2, 3 において同じ細胞株を用いた共同研究をおこないすでに報告しており、その結果もふまえ新しい観点から本研究が行われている。

他の薬剤投与によるミトコンドリアの形態変化の報告では可逆的であるとの報告が多い。しかし、本論文では薬剤を除去した後 2 カ月経っても同様な変化を維持していたことを確かめ、不可逆性の変化であると推論している。また薬剤投与により形態が変化した場合、多くの細胞ではチトクロム酸化酵素の活性が低下するとされるが、THP-1/E においてはその活性が保たれている。クリステが比較的保たれていることと関係するのかもしれない。これらの変化は耐性獲得の過程で起こった形質の変化という点で、今までに報告の無いものである。さらに DNA の変化についても、他の報告では mRNA やその蛋白の増減を伴うとされていることが多く、定常状態の mRNA の変化を伴わず DNA が増幅している点が新しい。考察でこの変化の機序についていくつか推測しているが、この点が解明されているとより優れた内容になったと思われる。

しかし、エトポシド耐性を新しいミトコンドリアという視点でとらえ、単純ではあるが確立した方法で解明し、新しい可能性を示唆した点で評価できるものと思われる。また、本論文の成績はすでに Eur. J. Cancer に受理された内容であり、予備審査の段階で出されたいくつかの意見は今後の研究の指針とすることで、予備審査を終了している。

以上より本論文は学位に値すると考えた。