

氏名(本籍)	いしだともゆき 石田智之(群馬県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博乙第1764号
学位授与年月日	平成13年9月30日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
審査研究科	医学研究科
学位論文題目	Circumvention of glutathione-mediated mitomycin C resistance by a novel mitomycin C analogue, KW-2149 (新規マイトマイシンC誘導体, KW-2149によるグルタチオン関連マイトマイシンC耐性の検討)
主査	筑波大学教授 医学博士 三輪正直
副査	筑波大学教授 医学博士 大塚藤男
副査	筑波大学助教授 医学博士 相吉悠治

## 論文の内容の要旨

### (目的)

マイトマイシンC (MMC) は臨床的に有益な抗癌抗生物質であるが、細胞内グルタチオン (GSH) に代表される解毒機構により自然耐性、獲得耐性が存在する事は大きな問題である。MMCの誘導体である7-N-[2-[( $\gamma$ -L-glutamyl-amino) ethyl] dithio] ethyl] mitomycin C (KW-2149) は細胞内GSHによって活性化されることが報告されているため、GSH合成の律速酵素である $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase ( $\gamma$ -GCS) のcDNAを細胞に遺伝子導入して細胞内GSH濃度を上昇させた細胞を作製し、細胞内GSH量とKW-2149の殺細胞効果の関係を明らかにする事を目的とした。

### (対象と方法)

$\gamma$ -GCS cDNA 遺伝子のNIH/3T3への遺伝子導入のため、G418耐性遺伝子を含む発現ベクター (pCR3) にヒト $\gamma$ -GCS cDNAを導入し、NTH/3T3に遺伝子導入した。G418で選択した後、pCR3- $\gamma$ -GCSを導入した細胞を3T3/GCSと命名した。細胞内RNAをフェノール抽出し、 $\gamma$ -GCS mRNAの発現確認のためRT-PCRを行った。細胞内GSH濃度は、enzyme recycling assayで測定した。

$\gamma$ -GCS活性の測定には、細胞溶液を、システイン、グルタミン酸、ATPと反応させ、HPLCで $\gamma$ -glutamylcysteineのピークを測定した。抗癌剤感受性試験は、MMCとKW-2149の発育阻止効果をMTT方で評価した。また、DNA鎖間架橋量は、アルカリエルーション法を用いて測定した。

### (結果)

NIH/3T3と比較して、3T3/GCSでは、 $\gamma$ -GCS mRNAの発現は強く、 $\gamma$ -GCS活性は約2倍、細胞内GSH濃度も2倍高値であった。

3T3/GCSは、NIH/3T3と比較してMMCに対して4.4倍耐性を示したが、KW-2149に対しては耐性を示さなかった。

NIH/3T3でDNA鎖間架橋形成ができるMMCの濃度を用いても、3T3/GCSでは、DNA鎖間架橋形成は見られな

かった。しかしKW-2149はNIH/3T3, 3T3/GCSともにDNA鎖間架橋形成量は同等であった。これより, 3T3/GCSはNIH/3T3と比較してMMCでのDNA鎖間架橋は形成しにくい, KW-2149では同等の形成を示した。

シスプラチン耐性細胞とアドリアマイシン耐性細胞は親細胞と比較してMMCに対してそれぞれ6.4倍と7.5倍の耐性を示したが, KW-2149に対してはそれぞれ3.7倍, 2.9倍の耐性であった。KW-2149はMMCよりも獲得耐性株に対してより強い発育阻止効果を示した。

#### (考察)

MMCは細胞内GSH濃度を増加させた細胞(3T3/GCS)に対して親細胞より強い耐性を示し, DNA鎖間架橋形成量もより少なかった。これはMMCの殺細胞効果に細胞内GSH濃度が関係することを示唆している。一方, KW-2149はNIH/3T3と比較して3T3/GCSに対して交叉耐性を示さず, DNA鎖間架橋形成にも違いはなかった。これからKW-2149の殺細胞効果は細胞内GSH量によって影響を受けないことが推測された。また, KMCと交叉耐性を示す抗癌剤獲得耐性株に対してKW-2149はMMCよりもより効果的であったことより, MMCに対する耐性機序の一部はKW/2149に影響を与えず, それはGSH関連耐性機構であると推察された。よってGSHによって活性化されるというKW-2149は臨床上有益な薬物になると考えられた。

### 審 査 の 結 果 の 要 旨

#### (批評)

癌細胞における抗癌剤耐性機構にはいくつかあるが, その中でGSHは解毒機構として働き, 多くの抗癌剤耐性細胞で上昇していることが報告されている。そこで著者らは細胞内のGSHのみを上昇させた細胞を作成し, 抗癌剤の感受性変化を検討しようと考えた。通常, 培養細胞内GSHを上昇させようとする場合, GSHを多く含んだ培養液で培養してGSHを細胞内に移行させるのであるが, 著者等はGSH合成の律速酵素である $\gamma$ -GCS遺伝子を導入することで, 細胞内GSH濃度を上昇させることを考えた。実際,  $\gamma$ -GCS遺伝子導入細胞では細胞内GSH濃度が上昇し, MMCのDNA鎖間架橋形成量を低下させ, MMCに対して耐性を示した。この細胞にGSHによって活性化されるというKW-2149を用いて同様の実験を行い, GSHの増加した細胞でも他の細胞と同等の殺細胞効果を示した。この知見は, GSH関連耐性機構を解明する上で新たな実験系を提唱したと考えられる。また, KW-2149のようにGSHによって活性化される薬剤も今後の癌化学療法においてkey drugになる可能性を持っており, 今後のさらなる解析が期待される。

よって, 著者は博士(医学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。