

論文題目 *K*選択による多剤耐性獲得に関する研究

指導教官 北村 俊雄 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 13 年 4 月 1 日入学

医学博士課程

生殖・発達・加齢医学専攻

氏名 中村 ゆかり

がん治療が進んだ現在においても、我々が直面する大きな障壁に抗がん剤耐性細胞の存在がある。抗がん剤耐性は、成立過程の違いからしばしば自然耐性と獲得耐性に分類される。前者は初回治療時にがんが薬剤に対して抵抗性を示すもので、P-糖蛋白などの抗がん剤排泄機構がもともと存在する部位に発生した消化器がんなどが含まれる。一方後者は化学療法に暴露され、耐性細胞が残存進展した場合をいう。しかし造血器腫瘍分野でしばしば遭遇する初回不応例の耐性は、いずれにも分類することができない。元来耐性の形質を持たない組織から発生し、化学療法に一度も暴露されずに獲得する耐性については、別個に自然獲得耐性として分類するべきではないだろうか。この自然獲得耐性に対する有効な対策を講ずるには、耐性細胞の出現とそのクローン選択過程を再現できる実験系が必要である。

Foulds が、がんがたった一つの腫瘍細胞から起こり、質的に異なった段階を経て多段階的に進展していくという多段階発がんモデルを提唱して以来、がんの発生進展は、突然変異と自然選択の原理に従うミクロの進化過程と考えられてきた。千勝らはこの多段階発がんにおける選択過程に注目し、異なる選択様式が腫瘍細胞に与える作用を解析する目的で、MacArthur と Wilson によって提唱された離島における生物種の進化のメカニズムを解析する概念（*r* と *K* 選択）を、がん細胞の培養法に適用した。すなわち *r* 選択とは個体密度が低く、栄養が十分ある状況で作用する選択で、増加率 *r* がもっとも大きな個体を選択される。一方 *K* 選択では、個体密度が高く十分な栄養が得られない状況で作用する選択で、増殖率ではなく生存率が高い個体を選択される。千勝らは、*c-myc* と活性型 *H-ras* を導入したラット胎児線維芽細胞を *r* と *K* 選択という相異なる

選択様式に置くことで、*K* 選択においてのみ多倍体が出現し、*r* 選択で p53 変異体が選択されることを示し、発がん過程における選択様式の重要性を示唆した。

本研究では *r* と *K* 選択の抗がん剤感受性に及ぼす影響を検討し、*K* 選択下においてのみ多剤耐性が獲得されることを示す。さらに *K* 選択における耐性機序を検討するとともに、これまで報告された耐性機序解析モデルとの比較を行い、*K* 選択が生体内での多段階発がん過程における自然獲得耐性を再現できる実験系であるかを検証する。

ラット胎児線維芽細胞に *c-myc* と *EJ-ras* を導入して腫瘍化させた細胞株を *r* と *K* 選択下で培養した。*r* 選択では指数関数的な細胞増殖が得られ、*K* 選択では、3-4 日ごとに培養皿の 2 分の 1 を継代した。8 週間の選択後、細胞の抗がん剤感受性を sulforhodamine B (SRB) アッセイで検討した。*K* 選択細胞は *r* 選択細胞に比べて、doxorubicin hydrochloride (DOX)、1-β-D-arabinofuranosyl cytosine (Ara-C)、vincristine sulfate (VCR) に対して有意な感受性の低下を認め、多剤耐性を獲得した。さらに DOX、Ara-C に対する耐性は、長期の細胞の生存を評価する clonogenic アッセイでも確認された。

K 選択による多剤耐性獲得の機序としていくつかの可能性が想定され検討を加えた。第一に、本研究で使われた 2 つの細胞株は *K* 選択下において多倍体細胞が優位となる細胞株であるため、細胞の倍数性が抗がん剤感受性に影響している可能性がある。そこで *K* 選択早期に樹立した 2 倍体と 4 倍体細胞の亜株における DOX、Ara-C、methotrexate (MTX) に対する感受性を SRB アッセイで比較検討した。DNA 含量と抗がん剤感受性の関連を示唆する結果は得られなかったが、多倍体が耐性獲得に有利に働いた可能性は否定できない。

第二に、p53 経路の異常の関与である。これまで p53 遺伝子異常が抗がん剤感受性に与える影響が報告されているが、本研究では p53 遺伝子異常を有する細胞株の抗がん剤感受性は、p53 機能が正常な細胞株とほぼ同様であった。さらに p53 機能の正常な細胞に p53 優位抑制型変異体を導入した細胞株の DOX、Ara-C に対する感受性は、*r* 選択細胞に比べむしろやや亢進していた。従って p53 遺伝子異常が直接耐性に関与している可能性は低い。しかし、p53 遺伝子変異は細胞増殖を加速させ、微小環境においては *r* から *K* 選択への急速な移行をもたらす可能性がある。*in vivo* で示される p53 遺伝子変異にともなう抗がん

剤耐性の報告は、p53 変異によって加速された細胞増殖をもたらす生体内での *K* 選択が、多剤耐性クローンの選択を助長しているとも考えられる。

第三に、細胞の増殖速度が抗がん剤感受性に及ぼす影響がある。SRB アッセイのデータから細胞の倍化時間を求めた。*r* 選択に比べ *K* 選択細胞では、多くの細胞で増殖速度が低下しており、DOX、Ara-C、VCR、MTX の細胞周期特異的薬剤の 50%増殖抑制濃度と倍化時間の間に相関関係が認められた。*K* 選択では増殖速度が遅くとも生存力のあるクローンが生き残ると考えられ、*K* 選択による増殖速度の低下が直接的に抗がん剤耐性に寄与した可能性がある。

第四に、*K* 選択自体が直接抗がん剤耐性を誘導する可能性がある。*K* 選択による耐性は高密度の状態を細胞が継代することで得られる。従ってその耐性を考える際には、これまでに報告された高密度で得られる confluence-dependent resistance (CDR) や、低グルコース、低血清、低酸素などのストレスに対する細胞応答によってもたらされる耐性を考慮しなくてはならない。本研究では、感受性試験の前に *K* 選択細胞を *r* 選択に置きストレスから開放しているが、さらに遷延した影響を取り除くために *K* 選択細胞を 2 週間以上 *r* 選択に置き DOX に対する感受性を SRB アッセイ、clonogenic アッセイで検討した。両アッセイにおいて *K* 選択直後とはほぼ同様の感受性が維持されていた。*K* 選択で獲得した耐性形質は失われず、これまで報告されている一過性の現象とは違い構成的であることが示された。

第五の可能性は、P-糖蛋白の発現亢進とそれによる細胞内の DOX 蓄積量の低下である。半定量的 RT-PCR では、*K* 選択細胞において MDR1/P-糖蛋白の発現亢進が認められ、*K* 選択細胞は *r* 選択細胞と比較して、サイクロスポリン存在下で細胞への DOX 蓄積量を増加させ、DOX に対する感受性を亢進させた。また、nuclear transcription factor Y α (NF-YA) の高発現が認められ、MDR1/P-糖蛋白発現亢進に関与している可能性が示めされた。また、MDR1/P-糖蛋白を強制発現させた親株細胞は、*K* 選択下でクローン選択される傾向が認められた。MDR1/P-糖蛋白が抗がん剤をくみ出す機能とは別に抗アポトーシス機能を有するという報告もあり、MDR1/P-糖蛋白発現細胞自体が *K* 選択の直接的な標的になる可能性がある。

さらに第六の可能性として、その他の耐性関連遺伝子の発現変化があげられる。*K* 選択によって獲得された多剤耐性は、P-糖蛋白の基質ではない Ara-C にも耐性であり、半定量的 RT-PCR の結果から cytidine deaminase の発現亢進と

equilibrative nucleoside transporter1 の発現低下の関与が示唆された。以上の検討から *K* 選択細胞では、複数の耐性関連遺伝子の発現が変化していた。*K* 選択では多様性が維持され、生き残るための異なる戦略をもつ個体が共存しうると言われている。*K* 選択による多剤耐性獲得もまた単一の機序では説明できない。

c-myc と *EJ-ras* を導入した発がんモデルでは、多倍体細胞、*p53* 遺伝子変異、*INK4a/ARF* 遺伝子座の欠失などが生じるが、そのうち多倍体と *p53* 遺伝子異常は、*r* と *K* 選択でその出現を操作できることが示されている。本研究では、抗がん剤耐性が *r* 選択ではなく *K* 選択においてのみ出現することが示された。多倍体、*p53* 遺伝子異常、多剤耐性細胞の出現といったヒトのがんで見られる様々な現象が再現できることから、*r* と *K* 選択は多段階発がんにおけるクローン選択過程の一部を再現している可能性がある。また、*K* 選択における多剤耐性は、1) 正常細胞からスタートし、既存の細胞株を使用していない。2) がん遺伝子を導入しており、耐性関連遺伝子は使用していない。3) クローン選択に抗がん剤を使用していない。4) 構成的な多剤耐性が獲得される。5) 1cm 大のがんとなる細胞数で抗がん剤耐性細胞が樹立される。6) ヒト腫瘍で指摘されているいくつかの機序が関与している。7) 正常細胞から耐性クローン出現までの全過程を *in vitro* で再現できる。などが特徴としてあげられる。これらの点から *K* 選択は、これまで報告されている耐性機序解析モデルとは違うユニークな実験系で、生体内での自然獲得耐性の発生を少なくとも一部再現していると思われる。腫瘍の進展に伴う異常な細胞増殖は必然的に *K* 選択に陥るが、その *K* 選択によって多剤耐性形質を獲得することは、がんが治療抵抗性へと進展していく必然性を物語っている。*K* 選択による多剤耐性の分子機序をさらに解明することは、がん征圧にむけて、難治性腫瘍の発生機構の解明とその治療成績の向上に寄与するものと期待される。