

[別紙 2]

審査結果の要旨

氏名 中村 ゆかり

がんは、一つの細胞からお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。近年この多段階発がん過程における種々の **molecular event** が各種のがんで明らかにされ、それらの遺伝子の作用が注目されてきた。抗がん剤耐性に関わる遺伝子もその一つである。しかし、どのような選択を経てこれらの遺伝子異常を持つ細胞が前面にでてきたのかは、いまだ明らかにされていない。この選択様式の重要性を示すものとして千勝らは、**c-myc** と活性化型 **H-ras (EJ-ras)** を導入したラット胎児線維芽細胞の培養系に、個体密度による自然選択モデルである *r* 選択と *K* 選択を適用し、*r* 選択で **p53** 遺伝子変異体が、*K* 選択で多倍体クローンが選択されることを報告した。

本研究は、この *r* と *K* 選択という相異なる 2 つの選択が抗がん剤感受性に与える影響を検討し、さらにその機序について解析したもので、下記の結果を得ている。

1. 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低細胞密度で維持して指数関数的増殖が得られる *r* 選択と、3-4 日ごとに培養細胞の 2 分の 1 を継代することで高細胞密度を維持した *K* 選択下で培養した。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、*K* 選択細胞が *r* 選択細胞に比べて、**doxorubicin hydrochloride (DOX)**、**1-β-D-arabinofuranosyl cytosine (Ara-C)**、**vincristine sulfate (VCR)** に対して感受性の有意な低下を示し、*K* 選択下で多剤耐性を獲得することが示された。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。また、*K* 選択下で得られた多剤耐性は一過性ではなく、構成的であった。
2. *K* 選択における多剤耐性機序として、次の結果が得られた。
 - 1) *r* 選択細胞に比べ *K* 選択細胞において、**P-糖蛋白** の高発現が **mRNA** レベルで認められ、**efflux** アッセイ、**SRB** アッセイ、**clonogenic** アッセイによって **P-糖蛋白** が *K* 選択における多剤耐性に関わっていることが示された。
 - 2) **P-糖蛋白** と関連した **NF-YA** の高発現が **mRNA** レベルで認められ、**NF-YA** による発

現調節の可能性が示された。

- 3) P-糖蛋白を強制発現させた細胞は、*K* 選択下で選択される傾向が認められた。
- 4) 細胞の増殖速度と細胞周期特異的抗がん剤の感受性の間に相関が認められ、*K* 選択細胞の増殖速度の低下が抗がん剤耐性に直接関与したと考えられた。
- 5) *r* 選択細胞に比べ *K* 選択細胞で、cytidine deaminase の発現亢進と Equilibrative nucleoside transporter1 の発現低下が mRNA レベルで認められ、Ara-C 耐性への関与が示唆された。
- 6) *K* 選択下では多倍体が優位となるが、倍数性が抗がん剤感受性に直接寄与する証拠は得られなかった。
- 7) p53 遺伝子変異の *K* 選択における耐性への直接的関与は認められなかった。

以上、本研究では *c-myc* と *EJ-ras* を導入したラット胎児線維芽細胞を用いて、*K* 選択においてのみ抗がん剤耐性を獲得することを示した。このことは、同一の遺伝子をもつ細胞株であっても異なる選択が作用することで、異なる抗がん剤感受性を獲得することを意味し、多段階発がんにおける耐性クローンの選択過程を *in vitro* で示した。さらに、その耐性機序は単一ではなく複数のプロセスが関与していることを示し、いずれも臨床上抗がん剤耐性や予後に関わるものであった。よって、それらの疾患における *in vivo* での悪性化への過程にも *K* 選択が関与している可能性を示している。また、これまで報告されている抗がん剤耐性機序を解析するモデルとの比較検討では、*K* 選択における耐性が、抗がん剤耐性遺伝子を導入したり抗がん剤に暴露したりすることなく、またストレス下で誘導した一過性のモデルとは異なり新しくユニークなモデルであると考えられた。

以上より、本論文は *in vitro* の発癌モデルが *r* と *K* 選択を使い分けることで多剤耐性機構の解析に有用であることを示した独創的な研究である。また、がん征圧に向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と期待され、学位の授与に値すると考えられる。