

氏名	木 岡 紀 幸 （き おか のり ゆき）
学位(専攻分野)	博士 (農 学)
学位記番号	農 博 第 696 号
学位授与の日付	平成 3 年 11 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	農学研究科農芸化学専攻
学位論文題目	STUDIES ON THE MECHANISM OF ACQUIRING RESISTANCE BY HUMAN MULTIDRUG-RESISTANCE GENE <i>MDR1</i> (ヒト多剤耐性遺伝子 <i>MDR1</i> による耐性獲得機構に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教授 駒野 徹 教授 大山 莞爾 教授 佐々木隆造

論 文 内 容 の 要 旨

癌細胞が治療の途上で多くの薬剤に対して同時に耐性になることがあるが、この現象は多剤耐性とよばれ、癌化学療法の大きな障害となっている。多剤耐性には *MDR1* 遺伝子が密接に関与していることが示唆されているが、多剤耐性獲得機構については十分な解明がなされていない。本研究は *MDR1* 遺伝子による多剤耐性獲得機構を解明するとともに、正常組織における *MDR1* 遺伝子の役割についても明らかにしたことについて述べたものである。

MDR1 遺伝子は多剤耐性細胞だけでなく正常な組織、特に副腎で高い発現が観察され、ステロイドホルモンなどの輸送に関与していると考えられている。そこで正常組織より *MDR1* 全長 cDNA を単離し、多剤耐性細胞由来の遺伝子との質的な相違について検討したところ、正常組織中で発現している *MDR1* 遺伝子も細胞を多剤耐性とする能力を有していた。しかし多剤耐性細胞中で発現している *MDR1* 遺伝子産物 (P-糖タンパク質) には185番目のアミノ酸に置換が生じており、それがコルヒチンに対する薬剤耐性を大きく上昇させていた。

転写産物の解析の結果、*MDR1* 遺伝子には2つのプロモーターが存在していたので、転写産物の量的変化を検出するためには、2種類の転写産物を正確に区別する必要がある。そこで正常組織由来の遺伝子ライブラリーより、下流プロモーターを含む領域を単離しこれを用いて2種類の転写産物を区別できる感度の良い検出法を確立した。実際にこの方法を用いてヒト癌組織における *MDR1* 遺伝子の発現を調べ、この方法が癌における *MDR1* 遺伝子の検出に有効であることを確認した。

正常組織で主に利用されている、*MDR1* 遺伝子の下流プロモーターには、2つのストレス応答 (熱ショック) 因子が存在していることを塩基配列の解析により明らかにした。そこでヒ素や熱ショックなどのストレスタンパク質を誘導する種々の刺激が *MDR1* 遺伝子の発現に与える影響について調べた。*MDR1* 遺伝子の発現量は熱ショックでほとんど変化しなかったが、ヒ素により約3倍に増加した。遺伝

子の転写活性を測定する方法及びプロモーターの欠失変異株を用いる解析により、*MDR1* 遺伝子の発現には転写活性の増大が主に関与していること、また2つのストレス応答因子を含む領域が必須であることなどを明らかにした。

フラボノイドの1種であるケルセチンは、ストレスタンパク質の誘導を抑えることが示されている。そこで、ケルセチンの *MDR1* 遺伝子発現に与える影響について検討した。その結果、ケルセチンだけを加えた場合、*MDR1* 遺伝子の発現にはほとんど影響を与えなかったが、ヒ素と同時に加えた場合、ヒ素による *MDR1* 遺伝子の誘導を完全に抑制することがわかった。これまで *MDR1* 遺伝子の発現を抑制する物質は見いだされておらず、ケルセチンが多剤耐性を克服するための新たな手段となり得ることを示している。

論文審査の結果の要旨

癌細胞は化学療法による治療の途上で多くの抗癌剤に対して耐性となることがある。このような現象を多剤耐性といい、多剤耐性遺伝子 (*MDR1*) が関与している。本論文はこの *MDR1* 遺伝子による耐性獲得機構について述べたものである。

著者はまず正常組織で発現している *MDR1* 遺伝子を単離し、これが抗癌剤感受性の細胞で発現すると細胞を多剤耐性にする能力があることを見いだした。多剤耐性細胞ではP-糖タンパク質の185番目のアミノ酸に置換が生じており、これがある種の抗癌剤に対する耐性度を上昇させることを確認した。また *MDR1* 遺伝子の発現による耐性獲得機構の解明のために、新たに単離した *MDR1* 遺伝子のプロモーター近傍のDNA断片を利用した高感度で特異性の高い分析方法を考案し、実際にヒトの腎臓癌で *MDR1* 遺伝子が発現していることを確認した。

次に *MDR1* 遺伝子のプロモーター領域の解析を行い、この領域に2つのストレス応答因子が並んで存在することを明らかにした。この事実に基づき、ストレスタンパク質の誘導を引き起こすDNA損傷試薬、重金属及び熱ショックなどによる *MDR1* 遺伝子の発現量の変化を調べた結果、ヒ素により *MDR1* 遺伝子の転写活性及び転写産物の蓄積量が増加することを見いだした。プロモーターの欠失変異株を用いた解析により、転写活性の増加に必須の領域は、*MDR1* 遺伝子の上流にある2つのストレス応答因子を含んでいることを明らかにした。

著者はさらに、ストレスタンパク質の誘導を抑制する効果を持つケルセチンが転写産物の蓄積量のレベルでもタンパク質の合成量のレベルでも、*MDR1* 遺伝子のヒ素による誘導を完全に阻害することを見いだした。ヒ素による誘導の起こらない欠失変異株ではケルセチンによる抑制効果がみられないことから、ケルセチンはストレス応答因子に作用していることが確認された。この事実は癌細胞の抗癌剤耐性を克服するための1つの可能性を示している。

以上のように本論文は、*MDR1* 遺伝子による多剤耐性獲得機構を明らかにしたもので、核酸の生化学、分子生物学及び細胞生化学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士(農学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成3年9月20日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士(農学)の学位

を授与される学力が十分あるものと認めた。