

ヒト絨毛癌細胞の MTX 耐性機構に関する研究

北海道大学医学部産婦人科学教室 (主任: 一戸喜兵衛教授)

*札幌医科大学癌研分子生物学教室

酒井慶一郎 藤野 敬史 星 信哉 新開奈保子
橋本 昌樹 安田 晶子 加藤 秀則 山田 秀人
和気 徳夫 一戸喜兵衛 藤永 恵*

MTX Resistant Mechanisms in Human Choriocarcinoma Cells

Kei-ichiro SAKAI, Takafumi FUJINO, Shinya HOSHI,
Naoko SHINKAI, Masaki HASHIMOTO, Teruko YASUDA,
Hidenori KATO, Hideto YAMADA, Norio WAKE,
Kihyoe ICHINOE and Kei FUJINAGA*

Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Hokkaido University, Sapporo

*Department of Molecular Biology, Cancer Research Institute, Sapporo Medical College, Sapporo

概要 絨毛癌は、すべてのタイプの妊娠に続発するが、脈管侵襲が著明であるため血行性転移を伴いやすい。このため、治療の主体は MTX を中心とする化学療法であり癌細胞の薬剤耐性能獲得は、絨毛癌患者の予後を大きく左右する。今回、2種類のヒト絨毛癌細胞株(HCCM 株および CC1 株)より、MTX 耐性株を誘導し、HCCM 株からは 10^{-6} M $\sim 10^{-4}$ M MTX 濃度で増殖可能な5種類、CC1 株からは 10^{-8} M $\sim 10^{-7}$ M MTX 濃度で増殖可能な2種類の耐性株を作製した。非耐性株および耐性株の、1) HCG 分泌能、2) 細胞内 3 H-MTX の取り込み、3) 細胞内 DHFR 活性値、4) 核型分析、5) CC1 系耐性株の DHFR 遺伝子の増幅の有無を比較検討した。その結果、1) HCG 分泌能は、耐性能が高まるにつれ低下する傾向が認められた。2) MTX の細胞内取り込みは、耐性能獲得に伴い減少する傾向が認められた。3) DHFR 活性値は、HCCM 系では耐性能獲得に伴い上昇し、 10^{-4} M 耐性株では親株に比し、約10倍の増大を認めたが、CC1 系では差を認めなかった。4) 両耐性株ともに耐性能獲得による特定の染色体変化は同定できなかったが、MTX 耐性による DHFR 遺伝子の増幅で生ずるとおもわれている DMs は、全ての細胞株で観察され、その出現頻度は耐性濃度上昇につれ増大した。5) CC1 10^{-7} M 耐性株の DHFR 遺伝子量は、CC1 親株および CC1 10^{-8} M 耐性株に比べ、約9倍に増幅していた。以上のことより、1) MTX 耐性能獲得には、MTX の細胞膜運搬の低下および DHFR 活性値の増大が少なくとも関与していることが判明した。2) DHFR 遺伝子コピー数の増大は、DHFR 蛋白の増加に先行するらしいことが判明した。3) 絨毛癌細胞で観察された DMs は、DHFR 遺伝子以外の遺伝子の増幅の結果招来されたものであることがうかがわれた。

Synopsis Choriocarcinoma cells grown in the presence of MTX have developed resistance in two ways. The HCCM derived sublines (relatively high MTX resistant) produced enhanced levels of DHFR and had relatively unimpaired transport of MTX, though altered transport was the primary determinant of response in the CC1 derived sublines (low MTX resistant). Since the selection procedure used was identical, it was assumed that altered MTX transport was insufficient to account entirely for various degrees of resistance. Increased DHFR activity was necessary for the development of high MTX resistance. The overproduction of DHFR was the consequence of amplification of the DHFR gene sequence.

The incidence of DMs in metaphases paralleled the degree of resistance. Since DMs were also present in the cells not showing DHFR gene amplification, mechanisms other than DHFR gene multiplication were responsible for the de novo synthesis of DMs.

Key words: MTX resistance • Transport • DHFR • Gene amplification

緒言

絨毛癌は、すべてのタイプの妊娠に続発するが、

とくに奇胎妊娠との密接な関連は臨床上よく知られた事実である。その組織形態は、異型トロホブ

ラストにより構成され、絨毛形態の欠如を特徴とする。本腫瘍は、とくに脈管侵襲が著明であるので、肺などへの血行性遠隔転移を伴いやすい。そのため、化学療法が治療の主体とされている。ときに、妊孕性温存のため、primary chemotherapyが行なわれることもある。この場合、Methotrexate (MTX) を中心とする化学療法が頻用されるが、その抗腫瘍効果は、ジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) と結合しジヒドロ葉酸からテトラヒドロ葉酸の還元を競合的に阻害し還元型葉酸プールを欠乏させ、チミジン体の合成を阻害することにより発現される。しかし、絨毛癌の中にはMTXに対する反応性の低いものも存在し、とくに再発例など以前に大量のMTXが使用された症例に頻発する。このため、臨床的には絨毛癌細胞におけるMTX耐性の存在が推測されているが、その詳細は不明である。

MTXは絨毛癌以外の癌の治療にも使用され、絨毛癌と同様臨床的MTX耐性の存在が治療上の大きな障害となつている。このため、種々の実験動物癌細胞を用い、MTX耐性機構を解明するために多くの基礎的研究が行なわれてきた。しかし、動物癌細胞で得られた結果がすべてヒト絨毛癌細胞に適用可能であるか否かについては全く不明である。このため、ヒト絨毛癌細胞株からMTX耐性株を樹立し、耐性能獲得に伴う生化学的、分子遺伝学的変化を検討することによりその耐性機構の解明を試みた。

実験材料および方法

1) 細胞株および耐性株の誘導

培養ヒト絨毛癌細胞 HCCM 株 (慈恵医大中本博士より供与) および CC1 株 (名古屋大学後藤博士より供与) を今回の実験に使用した。MTX 耐性の誘導は、MTX 濃度 10^{-8} M から開始し、順次段階的に MTX の濃度を上げ HCCM 株から、 10^{-6} M (HCCM-R1), 5×10^{-6} M (HCCM-R2), 10^{-5} M (HCCM-R3), 5×10^{-5} M (HCCM-R4), 10^{-4} M (HCCM-R5) 濃度耐性株を、CC1 株からは 10^{-8} M (CC1-R1), 10^{-7} M (CC1-R2) 濃度耐性株を樹立した。増殖速度が安定であることを確認するため、CC1 系では細胞倍加時間を測定した。MTX の殺

細胞効果を調べるため、CC1 系では MTX の 50% 細胞増殖抑制濃度 (ED50) を調べた。

2) HCG および β HCG の測定

高濃度 MTX 存在下で、培養絨毛癌細胞が、ラングハンス型細胞から合胞体型細胞への転換が生じるか否かを調べるため、24 時間に分泌される培養液中の HCG および β HCG を radioimmunoassay 法により測定した。

3) 3 H-MTX の細胞内取り込み

10^{-8} M 3 H-MTX (13.4 Ci/m mol) を含む培養液中にて 2 時間培養した。その後、冷リン酸緩衝液にて 3 回遠沈 ($1,500$ rpm 5 分間) 洗浄後、細胞内 3 H-MTX の放射活性を液体シンチレーションカウンターにて測定した。

4) 細胞内 DHFR 活性値の測定

細胞塊を超音波破壊し、Stanley et al. の方法に準じて、DHFR 活性を求めた¹⁷⁾。

5) Southern blot analysis

Sodium dodecyl sulfate (SDS) プロナーゼ処理した細胞 (正常満期胎盤, CC1, CC1-R1 および CC1-R2) からフェノール法により高分子量 DNA を精製した⁹⁾¹⁰⁾。細胞 DNA 20μ g を制限酵素 Eco R1 を用いて消化し、0.9% アガロースゲル電気泳動にて分離した後、Southern の方法¹⁶⁾に従いナイロンフィルター上に移し³²P で nick translation したヒト DHFR c-DNA (PHD 84 Dr. Attardi カリフォルニア工科大学教授より供与) をプローブとしてハイブリダイゼーションを行ない、autoradiography (露光時間 96 時間) によりハイブリダイズした DNA 断片を検出した。

6) 核型分析

培養細胞をコルセミド (0.02μ g/ml) にて処理後 0.075 M KCl にて低張処理し、カルノア固定のち、ギムザ染色およびキナクリン分染法にて核型分析をした。

結 果

1) MTX 耐性ヒト絨毛癌細胞株の誘導

MTX 添加培養法により、一定の速度で増殖可能な 7 種類 (HCCM-R1~R5, CC1-R1~R2) の MTX 耐性株の誘導に成功した。絨毛細胞は、多くの場合 MTX 存在下でラングハンス型細胞から

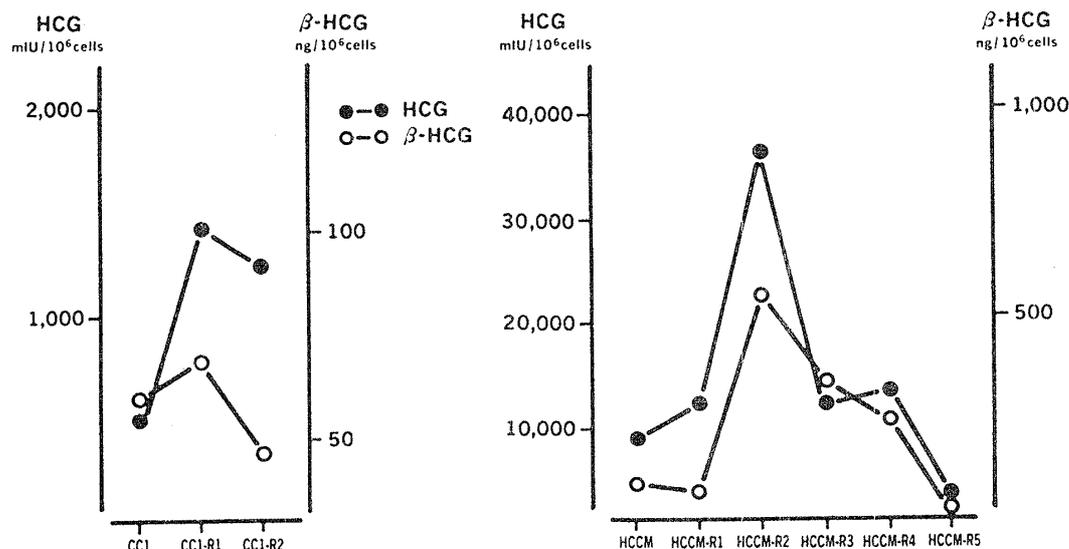


図 1

合胞体型細胞への転換が生じ、HCG 分泌能を獲得するとともに細胞分裂を停止する。今回樹立した耐性株でも同様の現象が生じ、MTX 耐性獲得が見かけ上のものであるという可能性を否定するために、各細胞株の細胞増殖速度および HCG 分泌能を調べた。その結果、CC1, CC1-R1 および CC1-R2 ではそれぞれ 32, 28, 24 時間の細胞倍加時間が示され、MTX 耐性濃度の上昇に伴いむしろ細胞増殖速度の速まる傾向が認められた。同時に、HCCM, CC1 系耐性株において HCG, β HCG 分泌能を測定したが両株ともに、MTX 耐性濃度の上昇に伴い分泌能は一時亢進するものの全体としては低下した(図 1)。この結果はラングハンス型細胞から合胞体型細胞への顕著な転換が生じていないことを示唆しているため、7 種類の細胞株は各 MTX 濃度に真に耐性であると判断した。CC1, CC1-R1 および CC1-R2 の 50% 細胞増殖抑制濃度はそれぞれ、 $1.28 \times 10^{-8} \text{M}$, $4.57 \times 10^{-8} \text{M}$, $1.08 \times 10^{-6} \text{M}$ 濃度であり、親株に比し CC1-R1 は 3.6 倍、CC1-R2 は 84 倍耐性であった。

2) MTX 耐性株における細胞内 MTX 量

種々の基礎的実験から、MTX の細胞内集積性の低下が MTX 耐性の一機構⁶⁾であることが示唆されているので、絨毛癌 MTX 耐性株において MTX の細胞内取り込み量を測定し、親株のそれと比較検討した。HCCM 系における、相対的細胞内取り込み率(耐性株細胞内³H-MTX 量/親株細

胞内³H-MTX 量)は HCCM-R2 では 44%, HCCM-R5 では 50% であった。また CC1 系では、HCCM 系より耐性獲得とともに、さらに急速に MTX の取り込みを減ずる傾向が見られ、CC1-R1 51%, CC1-R2 24% の相対的細胞内取り込み率であった(図 2a)。このため、MTX の細胞内集積性の低下が、ヒト絨毛癌細胞においても、MTX 耐性の一機構であることが推測された。

3) MTX 耐性株の細胞内 DHFR 活性値の測定および DHFR 遺伝子の検出

MTX は DHFR と結合することにより、抗腫瘍効果を発現するので、もし細胞内 DHFR 量が増大しておれば葉酸代謝は支障なく進行し、MTX の抗腫瘍効果は発現されないことになる。このため耐性株の細胞内 DHFR 活性値を測定し、非耐性株のそれと比較した。その結果、HCCM 系耐性株では HCCM-R1 で親株の約 2 倍、HCCM-R5 では約 10 倍の活性値増大が示され、耐性獲得とともに細胞内 DHFR 活性値の増大する傾向が観察された。しかし、CC1 系では CC1-R1, CC1-R2 ともに親株と比較し活性値の増大は認められなかった(図 2b)。HCCM 系と CC1 系耐性株では、耐性 MTX 濃度が異なり、HCCM-R1 が 10^{-6}M MTX 濃度耐性、CC1-R2 が 10^{-7}M MTX 濃度耐性であることから DHFR 活性値の増大は恐らく 10^{-6}M MTX 濃度付近で開始されることが推測された。

ヒト絨毛癌 MTX 耐性細胞の場合、DHFR 活性

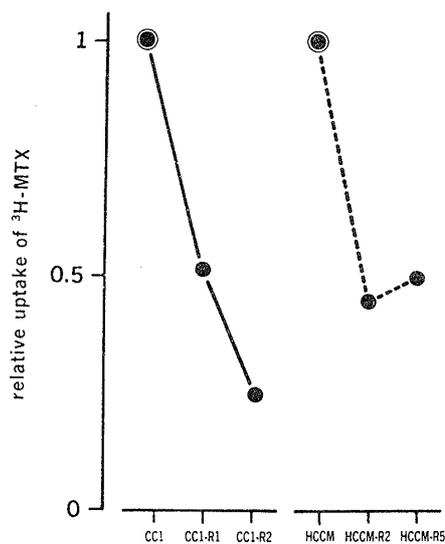


図 2 a

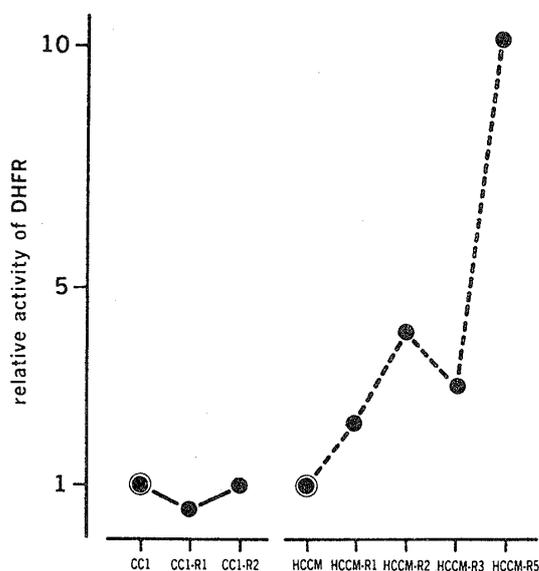


図 2 b

値の増大がいかなる分子遺伝学変化により招来されるかは不明であるため、耐性細胞内 DHFR 遺伝子量の変化について検討した。正常満期胎盤組織 DNA を対照とし、CC1, CC1-R1 および CC1-R2 DNA に存在するヒト DHFR 遺伝子を Southern blot hybridization により検出した。4 種類の DNA とともに介在配列を欠如する DHFR 偽遺伝子 DNA 断片のほかに、13kbp, 6kbp および 4kbp に 3 種類のヒト DHFR 遺伝子 DNA 断片が観察された。この偽遺伝子にも機能的に活性があるらしいことが示唆されている³⁾が、本研究ではこの方面の究明は行なわなかつた。

13kbp, 6kbp および 4kbp の DNA 断片は、正常満期胎盤、CC1 および CC1-R1 では同等のバンドとして検出されたが、CC1-R2 では明らかな増幅が観察され、正常満期胎盤などに比較し、約 9 倍の増幅が存在することが判明した(写真 1)。このため MTX 耐性に関する分子遺伝学的レベルの変化は、既に 10^{-7} M MTX 濃度付近から開始し、その遺伝子コピー数を増大することが示唆された。

4) MTX 耐性能獲得に伴う細胞遺伝学的変化

DHFR 遺伝子増幅が、いかなる細胞遺伝学的変化として表現されるかを調べるため、親株および耐性細胞株の染色体分析を行なった。HCCM 株は、染色体数 80 と異数性を示し、種々の構造異常

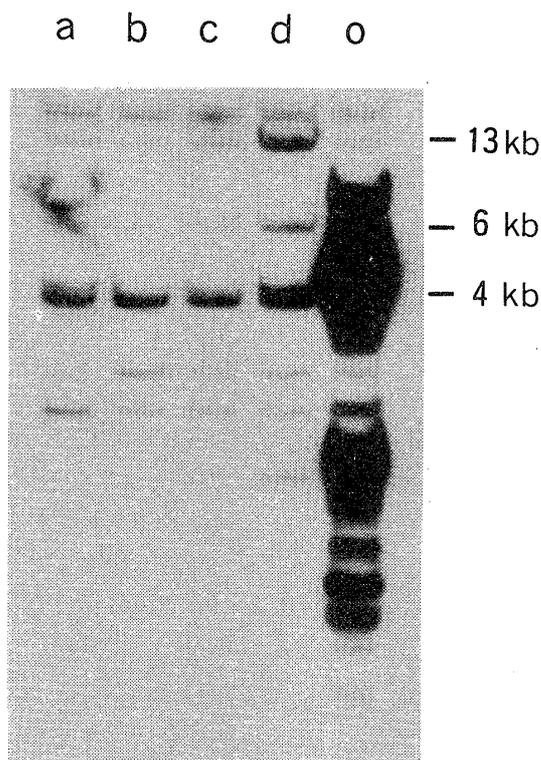


写真 1 Southern blot hybridization probe PHD84 (ヒト-DHFR c-DNA) 4×10^8 cpm/ μ g DNA

a 正常満期胎盤, b CC1 親株, c CC1 10^{-8} 耐性株, d CC1 10^{-7} 耐性株, o 正常満期胎盤 + Marker
13kbp, 6kbp, 4kbp に 3 種類のヒト DHFR 遺伝子 DNA 断片が観察された。13kbp, 6kbp, 4kbp の DNA 断片は、正常胎盤 CC1 および CC1-R1 では同等のバンドとして検出されたが CC1-R2 では明らかな増幅が観察され、正常満期胎盤などに比較し、約 9 倍の増幅が認められた。

表1a HCCM およびその耐性株の核型分析

	No. of cells examined	Range (modal number)	No. of cells karyotyped	consistent chromosomal abnormalities		
				gain	loss	structural abnormalities
HCCM	45	70~148 (80)	6	2, 3, 3, 6, 7, 8, 12, 14, 14, 17, 18, 19, 20	13	1p ⁺
HCCM-R4	49	63~85 (70)	4	4, 5, 7, 21		1p ⁺ , 1p ⁺ i(13q)
HCCM-R5	38	62~88 (74)	5	2, 3, 3, 5, 6, 7, 11, 21		1p ⁺ , 1p ⁺ i(13q)

表1b CC1 およびその耐性株の核型分析

	No. of cells examined	Range (modal number)	clonal abnormality	
			gain	structural abnormalities
CC1	24	55~131 (89)	3, 8, 9, 9, 9, 10, 10, 11, 12, 16, 17, 18, 19, 19, 20, 21, X	1q ⁻ , 2q ⁺ , i(2q), 3p ⁺ , 4p ⁻ , 6q ⁻ , 6q ⁻ , 19q ⁺
CC1-R1	33	79~108 (94)	1, 2, 5, 7, 7, 8, 11, 11, 12, 13, 14, 14, 17, 20, 20, 22	i(2q), 2q ⁺ , 3p ⁺ , 6q ⁻ , 6q ⁻ , 19q ⁺
CC1-R2	27	53~107 (96)	1, 2, 2, 5, 8, 9, 10, 11, 11, 13, 14, 16, 17, 20, 21	2q ⁺ , 2q ⁺ , 3p ⁺ , 4q ⁺ , 6q ⁻ , 6q ⁻ , 19q ⁺ , 20q ⁺

および由来不明の異常染色体が観察された。これらの染色体変化は、耐性株でも同様に観察されたが、耐性能獲得に伴いさらに染色体数の減少およびi(13q)の新たな出現がHCCM系耐性株に共通して観察された(表1a)。これら2種類の染色体変化がCC1株の耐性能獲得に際しても同様に出現するか否かを検討したが、CC1系では染色体数の増加以外に耐性能獲得に伴い出現する染色体変化はないことが判明した(表1b)。このため、これらの染色体変化はMTX耐性能獲得に関与する染色体変化ではなく、むしろ癌細胞の細胞遺伝学的不安定さにより招来されたものと解釈された。

次に、基礎的実験よりMTX耐性能獲得に伴うDHFR遺伝子の増幅の結果生ずることが示唆されている微小染色体(DMs)およびHomogeneously staining region(HSR)⁴⁾の出現頻度を調べた。その結果、HSRの出現は9種類の細胞株で全く認められなかったが、DMsはHCCMおよびCC1系細胞株でその存在が確認された。HCCM 10%, HCCM-R4 24.5%, HCCM-R5 32.2%, CC1 19%, CC1-R1 73%, CC1-R2 65%の出現率であり、

表2 微小染色体の出現頻度

	DMs/metaphases
CC1	19 % (10/ 53)
CC1-R1	73 % (53/ 73)
CC1-R2	65 % (44/ 68)
HCCM	10 % (7/ 70)
HCCM-R4	24.5% (35/143)
HCCM-R5	32.2% (59/183)

両株ともにMTX耐性能濃度の増大に伴い、DMsの出現を増やすことが判明した(表2)。これらの結果は、絨毛癌細胞におけるMTX耐性能獲得とDMsの出現の間に相関関係のあることを示唆するが、同時に非耐性株である親株およびDHFR遺伝子の増幅が認められなかつたCC1-R1でもDMsが高率に観察されることから、ヒト絨毛癌細胞に出現するDMsはMTX耐性能以外の機構に原因することが推測された。

考 案

腫瘍細胞におけるMTX耐性能獲得の機構を解明するために多くの基礎的研究が行なわれ、その結果、1) MTXの腫瘍細胞内への移行障害⁵⁾、2)

DHFR の MTX に対する親和性の低下⁷⁾, 3) DHFR の特異的増加⁹⁾という三つの基本的な耐性獲得機構が示されてきた。研究の対象となつた動物細胞株の種類によつてこの三者のうち、いずれかが顕著になつたものと考えられるが、ヒト絨毛癌細胞の耐性獲得機構については報告が全くないため詳細は不明である。

本研究では、2種類のヒト絨毛癌細胞株より MTX 耐性細胞株の誘導に成功した。MTX 高濃度耐性株 HCCM 系細胞では、DHFR 活性値の増大および軽度の MTX 細胞内集積性の低下が観察されたのに対し、低濃度耐性株 CC1 系細胞では、高度の MTX 細胞内集積性の低下のみが観察された。このため 10^{-8} M から 10^{-7} M MTX 濃度耐性細胞 (CC1 系耐性株) では、MTX の細胞膜運搬の低下が、耐性能獲得に際し主要な役割を果たすものと判断された。しかし、 10^{-6} M MTX 濃度以上の MTX 耐性細胞 (HCCM 系耐性株) では、細胞膜運搬の低下のみでは、耐性獲得に不十分であり、DHFR 活性値の増大が必要となるものと考えられる。一方、DHFR 活性値の増大は、多量の MTX が細胞内に存在しても、葉酸代謝を支障なく回転できることを意味するため、MTX の細胞膜運搬の低下を必要としなくなり、高濃度耐性株では、徐々に MTX 運搬が再開されることが推測される。

MTX の運搬は MTX に高い親和性を示す温度およびエネルギー依存担体を介する経路が主体となり行なわれる¹⁰⁾。ハムスター卵巣細胞における抵抗性株では、MTX 親和性担体の欠如が抵抗性出現の原因となつている⁸⁾が、ヒト絨毛癌細胞でも同様の機構が作動するか否かについては不明である。

腫瘍細胞の多剤耐性獲得機構の研究から、その耐性機構は、抗癌剤の膜輸送に関与する糖蛋白の変化によりもたらされる¹³⁾ことが判明している。耐性細胞では、抗癌剤が能動的に細胞外へと排泄され、その結果細胞内濃度が低下することにより耐性を獲得する。耐性細胞におけるこの膜輸送の変化は、Ca 拮抗剤などにより改善され、細胞内濃度が高まり再度耐性細胞の抗癌剤に対する感受性

が高まる¹⁴⁾。MTX の細胞膜輸送に関しても、これと同様に糖蛋白の変化が関与していることも推測されるため、MTX の細胞膜運搬の低下が主要な耐性機構である細胞株において、糖蛋白の同定および Ca 拮抗剤により MTX の抗腫瘍効果が増強されるか否かの検討が必要である。いずれにせよ、MTX 運搬システムはある種の遺伝子制御のもとに作動するため絨毛癌細胞においても遺伝子変異が運搬の低下の原因と推測される。しかし、高濃度 MTX 耐性絨毛癌細胞には、なお抗腫瘍効果発現可能な MTX 量を取り込まれていることも事実であるため、MTX の細胞内取り込みの低下のみでヒト絨毛癌細胞のすべてを説明することは困難である。

高濃度 MTX 耐性絨毛癌細胞では、DHFR 活性値の増大が観察されるという結果は、絨毛癌細胞の MTX 耐性機構を考える上で重要である。DHFR 活性値の増大は、 10^{-6} M MTX 濃度付近から開始され、 10^{-4} M MTX 濃度では約10倍に達する。MTX の抗腫瘍効果は、DHFR の作用を阻害することにより発現される。このためには、多量の MTX が DHFR と結合しているだけでなく、“自由”な MTX として細胞内に存在することが要求される。耐性細胞における DHFR 産生の増大は、この“自由”な MTX の存在をなくし、葉酸代謝を正常に回転させることにより MTX の抗腫瘍効果を消去するものと考えられる。

ヒト白血病由来の MTX 耐性細胞の細胞内 DHFR は非耐性のものと比較し約200倍にも増加することが知られている¹¹⁾。しかし、本研究で樹立されたヒト絨毛癌耐性株の DHFR 活性値の増大は軽微で約10倍の増加が示されたにすぎない。両者の MTX 耐性の程度が異なることが最も大きな原因と想像されるが、本研究の結果から、ヒト絨毛癌細胞の場合は、少なくとも二つ以上の耐性獲得機構 (MTX の腫瘍細胞内への移行障害および DHFR 量の増大) が有機的に関連して作動するため、DHFR 量の過剰な増大を必要としないものとも推測される。いずれにせよ、DHFR 量の増大が MTX 耐性獲得に主要な役割を果たすことは事実で、しかも 10^{-6} M MTX 濃度付近から

DHFR 活性値の増大が認められるという事実は、癌化学療法における薬剤選択を行なう上で重要である。

すべての蛋白合成は、DNA上の構造を決定する遺伝子情報からm-RNAが合成されることで開始される。このため、絨毛癌細胞のDHFR活性値の増大は、DNA上のDHFR遺伝子量の増大により招来されるのではないかと推測し、絨毛癌MTX耐性細胞DNAのDHFR遺伝子の検出を試みた。その結果、 10^{-7} M MTX耐性細胞DNA中にすでに約9倍のDHFR遺伝子コピー数の増大が生じていることが判明した。しかも、実際の耐性獲得の主役であるDHFR蛋白の増加が開始するMTX濃度よりもさらに低い濃度でDHFR遺伝子コピー数の増大が、すでに生じていることも同時に観察された。CC1 10^{-7} M MTX耐性細胞は、耐性獲得に際しMTXの細胞膜運搬の低下のみで充分であり、DHFR蛋白の増大を必要としないことが推測される。そして、細胞が生存するのにDHFR蛋白の増大が必要になった濃度で、はじめてDHFR遺伝子の増幅に見合うDHFR蛋白の増大が生じるかもしれない。或いは、増幅遺伝子は当初通常の方法でDHFR活性値として測定できぬ変異蛋白のみを合成するのかもしれない。今後、CC1 10^{-7} M MTX耐性細胞の主要な耐性機構を確認する上で、DHFR m-RNAの同定が必要である。

MTX存在下で樹立したマウス耐性株をMTXの存在しない状態でしばらく培養すると、MTX耐性の低下する不安定型¹¹⁾(DMs所有)と耐性をもち続ける安定型¹²⁾(HSR所有)に区別される。さらに、DMsおよびHSRの中に増幅DHFR遺伝子が存在することが明らかとされている¹¹⁾¹²⁾。絨毛癌耐性細胞でも同様のことが存在するのではないかと推測し、絨毛癌MTX耐性細胞の染色体分析を行ない、DMsおよびHSRの出現の有無を検討した結果、前者の存在のみが確認された。耐性濃度の上昇に伴い、DMsの出現も増大する傾向にあったが、DHFR遺伝子の増幅が招来されていない細胞でもその存在が観察されたため、ヒト絨毛癌細胞ではDHFR遺伝子の増幅とは異なる機

構によりDMsのde novo合成が起こるものと推測された。ヒト神経芽細胞腫¹⁵⁾や大腸癌²⁾などでは、発癌遺伝子の増幅の結果として、DMsおよびHSRが表現されることがある。このためDMsおよびHSRという染色体変化は、DHFR遺伝子の単純増幅に特定されたものではなく何らかの原因によりある種の遺伝子のコピー数増大が招来された場合に生ずるものと解釈される。このため、ヒト絨毛癌細胞で観察されたDMsもむしろ発癌に関与する遺伝子などの増幅の結果、形成されたものと想像された。

文 献

1. Alam, A., Geddes, A.J. and North, A.C.T.: Methods and mechanisms for the development of MTX resistance in human lymphoid cells. *Int. J. Cancer*, 31: 45, 1983.
2. Alitalo, K., Schwab, M., Lin, C.C., Varmus, H. E. and Bishop, J.M.: Homogeneously staining chromosomal regions contain amplified copies of an abundantly expressed cellular oncogene (c-myc) in malignant neuro-endocrine cells from a human colon carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 80: 1707, 1983.
3. Bar-Eli, M., Stang, H.D., Mercela, K.E. and Cline, M.J.: Expression of a methotrexate-resistant dihydrofolate reductase gene by transformed hematopoietic cells of mice. *Somatic Cell Genet.*, 9: 55, 1983.
4. Biedler, J.L., Schrecker, A.W. and Hutchison, D. J.: Selection of chromosomal variant in Amethopterin-resistant sublines of leukemia L1210 with increased levels of dihydrofolate reductase. *J. Natl. Cancer Inst.*, 31: 575, 1963.
5. Bostock, C.J., Clark, E.M., Harding, N.G.L., Mounts, P.M., Tyler-Smith, C., Van, H.B. and Walker, P.M.B.: The development of resistance to methotrexate in a mouse melanoma cell line. *Chromosoma*, 74: 153, 1979.
6. Fischer, G.A.: Defective transport of amethopterin (methotrexate) as a mechanism of resistance to the antimetabolite in L5178Y leukemic cells. *Biochem. Pharmacol.*, 11: 1237, 1962.
7. Flintof, W.F. and Essani, K.: Methotrexate-resistant chinese hamster ovary cells contain a dihydrofolate reductase with an altered affinity for methotrexate. *Biochemistry*, 19: 4321, 1980.
8. Flintof, W.F. and Nagainis, C.R.: Transport of methotrexate in chinese hamster ovary

- cells: A mutant defective in methotrexate uptake and cell binding. *Arc. Bioch. Bioph.*, 223: 433, 1983.
9. *Fujinaga, K., Sawada, U. and Sekikawa, K.*: Three different classes of human adeno-virus transforming DNA sequences highly oncogenic subgroup A, weakly oncogenic subgroup B, and subgroup C specific transforming DNA sequences. *Virology*, 93: 578, 1979.
 10. *Fujinaga, K., Sawada, U. and Uemigu, Y.*: A rapid screening for the specific DNA sequence: Analysis of the transforming DNA segments in adeno-virus transformed cells. *Gann*, 70: 239, 1979.
 11. *Kaufman, R.J., Brown, P.C. and Schimke, R. T.*: Amplified dihydrofolate reductase genes in unstably methotrexate-resistant cells are associated with double minute chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 76: 5669, 1979.
 12. *Nunberg, J.H., Kaufman, R.J., Schimke, R.T., Urlaub, G. and Chasin, L.A.*: Amplified hydrofolate reductase genes are localized to a homogeneously staining region of a single chromosome in a methotrexate-resistant chinese hamster ovary cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 75: 5553, 1978.
 13. *Riordan, J.R., Deucharst, K., Kartner, N., Trent, J. and Ling, V.*: Amplification of P-glycoprotein genes in multidrug-resistant mammalian cell lines. *Nature*, 316: 817, 1985.
 14. *Rogan, M.B., Hamilton, T.C. and Young, R. C.*: Reversal of adriamycin resistance by verapamil in human ovarian cancer. *Science*, 224: 994, 1984.
 15. *Schwab, M., Ellison, J., Busch, M., Rosenau, W., Varmus, H.E. and Bishop, J.M.*: Enhanced expression of the human gene N-myc consequent to amplification of DNA may contribute to malignant progression of neuroblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 81: 4940, 1984.
 16. *Southern, E.M.*: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, 98: 503, 1975.
 17. *Stanley, B.J., Neal, G.E. and Williams, D.C.*: Dihydrofolate reductase (5,6,7,8-Tetrahydrofolate: NADP oxidoreductase, EC 1.5.1.3). *Method of Enzymology*, 13: 775, 1971.
 18. *Warren, R.D., Nichols, A.P. and Benders, R. A.*: Membrane transport of methotrexate in human lymphoblastoid cells. *Cancer Res.*, 38: 668, 1978.

(特別掲載 No. 6132 昭62・2・3受付)