

微小染色体を有する新しいヒト白血病細胞株での
メソトレキセート耐性機構に関する
細胞遺伝学的検討

— ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子の増幅を中心に —

新潟大学医学部第一内科学教室 (主任: 柴田 昭教授)

斎藤 弘行

Cytogenetic Analysis of Methotrexate (MTX) Resistant Mechanisms using a
New Human Leukemia Cell Line with Double Minute Chromosomes:
Induction of MTX Resistance and Amplification of
Dihydrofolate Reductase Gene

Hiroyuki SAITO

*First Department of Internal Medicine,
Niigata University School of Medicine
(Director: Prof. Akira SHIBATA)*

To obtain drug resistance in newly established AML cell line KY821 with double minute chromosomes (DMs) and its subclone KY821A3 without DMs, they were cultured in increasing concentrations of methotrexate (MTX). KY821 became resistant against 2×10^{-4} M MTX (KY821/MTX), whereas KY821A3 did against 2×10^{-5} M MTX (KY821A3/MTX) in a same period.

Enhanced enzyme activities of DHFR corresponded to increased DMs numbers and to amplifications of dihydrofolate reductase (DHFR) gene in both resistant clones. The amplified DHFR gene was proved to be located on DMs by *in situ* hybridization. These data indicated that the presence of DMs in KY821 would facilitate an acquisition of drug resistance.

Unstable MTX resistance was shown to be associated with instability of amplified DHFR gene located on DMs, and the message (mRNA) of DHFR was less stable than gene amplification or cytogenetic alteration (DMs).

Reprint requests to: Hiroyuki SAITO,
First Department of Internal Medicine,
Niigata University School of Medicine,
Asahimachi-dori 1, Niigata City, 951,
JAPAN.

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通1番町
新潟大学医学部第一内科学教室

斎藤 弘行

In conclusion, KY821 is a very unique and valuable human leukemic cell line for studies of drug resistance and gene amplification.

Key words: KY821 (human myeloblastic leukemia cell line), double minute chromosomes, methotrexate resistance, dihydrofolate reductase, gene amplification

緒 言

腫瘍細胞では種々の染色体異常が観察される。このうち遺伝子増幅に関連する異常に、均一染色体領域 homogeneously staining region (HSR) と微小染色体 double minute chromosomes (DMs) とがある。腫瘍細胞における遺伝子増幅を考える時、抗腫瘍剤 Methotrexate (MTX) 耐性細胞に関する一連の研究成果は極めて重要である。Schimke らを中心として、MTX の標的酵素 dihydrofolate reductase (DHFR) の cDNA が分離され、MTX 耐性細胞において DHFR 遺伝子の増幅が示された¹⁾。さらに *in situ* hybridization により、増幅した DHFR 遺伝子が HSR や DMs 上に存在することも確認された²⁾³⁾。その後各種の細胞系において、あるひとつの遺伝子の増幅によって特定の薬剤に対して耐性を獲得しうること、そのような細胞にはしばしば HSR や DMs など、特異的な異常染色体が出現することも明らかにされた⁴⁾。

しかし、ヒト由来の細胞株、特に白血病細胞株において、このような薬剤耐性化に関する細胞遺伝学的な検討は充分なされているとはいえない。また、他の細胞系におけるこれまでの研究成果をそのまま、ヒトの白血病細胞において適応できるかに関しても不明であろう。

筆者らは、DMs を有するヒト骨髄性白血病細胞株 KY821 と、クローニングを繰り返し行うことにより得た DMs をもたないサブクローン KY821A3 とを樹立し、両クローンから MTX 耐性株の作成を試みた。すなわち、培養液中の MTX 濃度を徐々に増加させていくことにより、耐性株 KY821/MTX と KY821A3/MTX とを樹立したが、前者では DMs の増加を、後者では DMs の出現をみた。

本稿では、両耐性細胞株における DMs 上における遺伝子増幅と MTX 耐性との相関関係、および樹立された MTX 耐性株での、MTX を除去した培養液中での細胞遺伝学的な経時的変化について検討し、その耐性

機構について考察する。

材料および方法

1) MTX 耐性ヒト白血病細胞株の樹立

ヒト白血病由来細胞株 KY821 および KY821A3 は 10% fetal bovine serum 添加の PRMI1640 medium にて継代した。KY821 は急性骨髄性白血病症例の髄液中の白血病細胞から樹立した細胞株であり、細胞倍加速度は 20~28 時間、軟寒天培養法による plating efficiency は約 50% であった。染色体分析の結果、多くの細胞は種々の数の DMs を有していた⁵⁾。一方、メチルセルロース中でのクローニングを 3 回繰り返すことにより KY821 より得られたサブクローン KY821A3 は DMs を持たず、細胞倍加速度は original clone である KY821 より短かった (12~16 時間)。KY821 と KY821A3 は、MTX 10^{-8} M を添加した培養液から培養を開始し、1~2 週間ごとに徐々に MTX の濃度を上昇させ、約 7 か月間の MTX 添加培養により、KY821 では 2×10^{-4} M、KY821A3 では 2×10^{-5} M まで耐性の 2 つの MTX 耐性株 (KY821/MTX, KY821A3/MTX) を樹立した。

2) プローブ DNA

プローブ DNA として用いた DHFR 遺伝子および多剤耐性遺伝子 (MDR1) はいずれも full length の cDNA であり、それぞれプラスミド pHD84 (Dr. G. Attardi, カルフォルニア工科大学より供与)⁶⁾⁸⁾、および pCA12-2 (Dr. T. Turuo, 癌研究会化学療法センターより供与)⁹⁾ より insert DNA を分離し準備した。nick translation 法により ³²P および ³H で radioactive し、各種 hybridization に用いた。

3) 各細胞株における遺伝子増幅の検討

KY821, KY821A3, KY821/MTX, KY821A3/MTX の各細胞より高分子 DNA を Blim-Stafford 法¹⁰⁾ に準じて抽出し、Southern blot hybridization 法¹¹⁾ などにより DHFR 遺伝子の増幅の検討を行った。各高分子 DNA を制限酵素 BamHI および EcoRI にて処理し、0.8

% agarose gel にて電気泳動後 nitrocellulose 膜に blotting し、上記の ^{32}P でラベルした DNA プローブとの間で hybridization を行い、autoradiography (露光時間; ~72時間) によりハイブリダイズした DNA 断片をフィルム上のバンドとして検出した。遺伝子増幅についての検討は、バンドの濃さを densitometer で計測、あるいは電気泳動する制限酵素処理 genomic DNA 量を段階希釈法にて調整することにより行った。対照には、ヒト胎盤および HL60 細胞株から抽出した genomic DNA を用いた。

4) 染色体分析

各培養細胞を 0.02 $\mu\text{g}/\text{ml}$ colcemid (GIBCO) にて10分間の処理後、0.075M KCl 中にて低張処理し、Carnoy液でスライド上に固定した。その後、Giemsa 染色、quinacrine 染色による分染法にて核型の解析を行った。

5) 細胞内 DHFR 酵素活性の測定

各培養細胞 (約 10^8 個) をハーベストし Ringer's phosphate glucose 液にて3回洗浄後、1mM potassium phosphate buffer にて溶解し 15,000 rpm で30分遠心後、その上清を測定時まで -80°C にて保存した。DHFR 活性の測定は既報の方法¹²⁾¹³⁾に従い、スペクトロフォトメーターにより行った。蛋白濃度は Folin-Lowry 法¹⁴⁾により算定し、酵素活性1単位は 30°C にて基質 1 μM を還元する活性として DHFR 活性を求めた。

6) 染色体標本上での *in situ* hybridization

未染の染色体標本を 37°C 、1時間 RNase (Sigma type IA) で処理後、 72°C に保温した 70% formamide/2XSSC 溶液中に2分間つけ染色体 DNA を denature し、その後直ちに各濃度の冷エタノールに通して脱水処理を行った。 ^3H -dCTP と ^3H -dTTP を用い nick translation 法にて ^3H label した DHFR 遺伝子の cDNA を含む hybridization 溶液 (50% formamide, 2XSSCP, 1X Denhardt sol., 10% dextran sulfate, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ salmon sperm DNA, 10^6 cpm radio-labeled DNA) を、スライド標本1枚当たり 50 μl 滴下し、カバーガラスをかけ、 41°C で18時間、50% formamide/2XSSC の moist chamber 内で hybridization を行った。その後、各濃度の formamide/SSC 溶液にて充分洗浄後、再び冷エタノールにて脱水処理を行い、造影溶液 (MR-N2, Konica) を用いて 4°C で10日間の autoradiography を行い、スライドはそのまま現像液 (KonidorX, Konica) および固定液に通した後風乾させた。RI プローブ (^3H labeled DHFR) がハイブリダイズすることによって認められる銀粒子の染色体上の位置の同定は、quinacrine に

よる分染 (Q-banding) 後、蛍光顕微鏡下にて行った。

7) MTX 非存在培養下での細胞遺伝学的な経時的变化の検討

まず、樹立した MTX 耐性細胞株 (KY821/MTX, KY821A3/MTX) を RPMI1640 にて洗浄後、MTX を含まない培養液中で培養を継続し、各細胞株での DHFR の遺伝子増幅の経時的变化の相違を観察した。さらに、MTX 感受性株では DMs を有しない KY821A3/MTX において、MTX 非存在培養下における DHFR 遺伝子増幅とその mRNA 発現、細胞倍加速度および細胞あたりの DMs 数の経時的变化について週単位で検討を行った。なお、遺伝子増幅に関しては Southern blot hybridization 法により、mRNA の発現に関しては Northern blot hybridization 法により、染色体の経時的变化については G-banding 法により検討した。

結 果

1) KY821 および MTX 耐性細胞株の性状

樹立された細胞株 KY821 は、その細胞生化学的所見より骨髓芽球性白血病細胞株と考えられた。peroxidase および naphthol ASD chloroacetate esterase 染色は陽性、naphthyl butylate esterase 染色は弱陽性であり、細胞表面マーカーの解析では、CD13 (MY7)、CD33 (MY9) および CD15 (LeuM1) が陽性であったが、CD14 (MY4, LeuM3)、CD34 (HPCA) および各種リンパ球系マーカーはいずれも陰性であった。

染色体の解析は50核版で行った。多くは DMs を有する tetraploid の染色体構成 (平均染色体数: 86) を示し、HSR は認めなかった (図 1-A, 1-B)。DMs は

表 1 KY821 各細胞株の細胞遺伝学的性状

細胞株	DHFR 遺伝子増幅**	DHFR 酵素活性 (U/mg)	細胞あたりの DMs 数中央値 (範囲)
KY821	X 1	0.909	3(0-28)
KY821/MTX *	X 42	20.115	33(4-99)
KY821A3	X 1	0.651	0(0)
KY821A3/MTX *	X 20	8.406	9(0-121)

* KY821/MTX は 0.2 mM, KY821A3/MTX は 0.02 mM の MTX 添加培養液中の細胞株である。

** 遺伝子増幅は densitometry にてバンドの濃さを計測し、ヒト胎盤 DNA のそれと比較した。

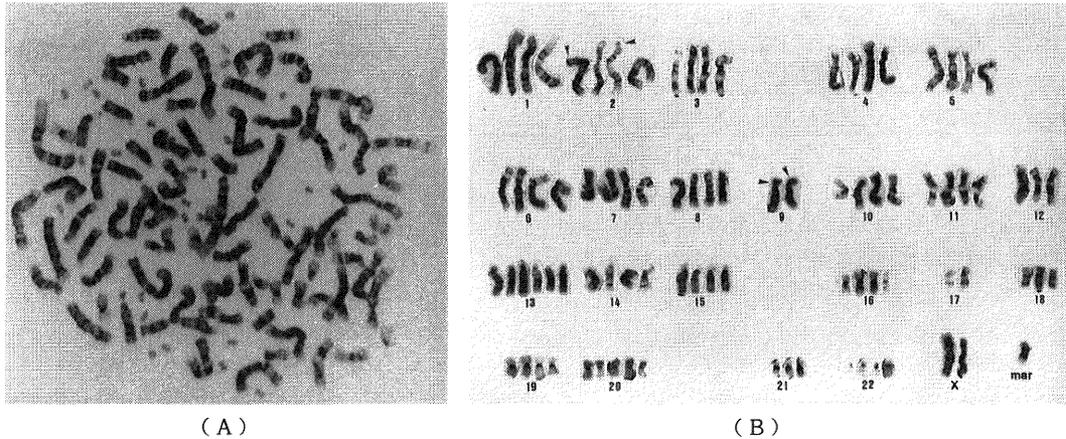


図1 白血病細胞株 KY821 の核型分析

- (A) 多数の double minute chromosomes (DMs) を有し、基本的には tetraploidy の核型構成を示した。
- (B) KY 821 の代表的な一核型
 86, X, X, -Y, +1, +1, +3, +3, +4, +4, +5, +5, +6, +6, +7, +7, +8, +8, +10, +10, +11, +11, +12, +13, +13, +13, +13, +14, +14, +15, +15, +16, +16, +18, +19, +19, +20, +20, +21, +22, +22, +der(2)t(2;?) (p25;?), del(9)(p22 p24), del(9)(p22 p24), +mar. (矢印は転座切断点を示している)

50核版中42細胞に認められ、その中央値は3であった(表1)。

DMs は、癌遺伝子の増幅や薬剤耐性化に伴う特定遺伝子増幅の結果表現される、染色体の形態異常のひとつと考えられている。そこで、KY821 の cytosine arabinoside (Ara-C), daunorubicine (DNR), vincristine (VCR) および MTX に対する薬剤感受性試験も施行したが、他の白血病細胞株と比較して各薬剤への耐性化は認めなかった。また、*c-myc* の遺伝子増幅に関しても検討したが、DMs との相関性は認めなかった。

次に、培養液中の MTX 濃度を徐々に増加させることにより、MTX 耐性細胞株 KY821/MTX および KY821A3/MTX を樹立した。MTX 耐性化にともない、KY821/MTX では各細胞あたりの DMs 数の増加、KY821A3/MTX では DMs を有する細胞の出現が観察された(表1)。また、同一培養期間にも関わらず、KY821 の方が KY821A3 に比べてより高度の MTX 耐性能を獲得しており、KY821/MTX と KY821A3/MTX の細胞株の間には MTX 耐性獲得度に明らかな差異が認められた。

2) MTX 耐性株での DHFR 遺伝子増幅とその酵素活性の亢進

MTX 耐性化に伴い KY821 および KY821A3 は DMs

の増加を示した(図2)。2つの細胞株間での DMs の増加は MTX に対する耐性度と相関傾向を示すものと考えられた。この事実から、MTX 耐性化の機序としてこれらの細胞株では DHFR 遺伝子の増幅が関与していることが強く推定されたので、DHFR 遺伝子の増幅とその酵素活性の亢進について、次の検討を行った。

各細胞株から高分子 DNA を抽出し、EcoRI 処理後の Southern blot hybridization の結果を図3に示す。各細胞株における DHFR 遺伝子増幅の程度、DHFR の酵素活性、および細胞あたりの DMs 数に関する成績はまとめて表1に示した。この結果より、原株 KY821 における DMs は DHFR 遺伝子の増幅によるものではないこと(データーとしては示さないが *c-myc* の増幅の結果でもなかった)が示され、MTX に対する耐性度と、細胞あたりの DMs 数・DHFR 遺伝子の増幅度・DHFR の酵素活性との間には相関性を認めた。したがって、これらの細胞株での MTX 耐性の主要な機序は DMs という染色体形態をとった DHFR 遺伝子の増幅であることが強く示唆された。

そこで次に、DHFR 遺伝子の増幅が DMs によって生じていることを、染色体標本上での *in situ* hybridization 法を用いて検索した(図4)。KY821/MTX の metaphase の細胞で、オートラジオグラフィ上解析

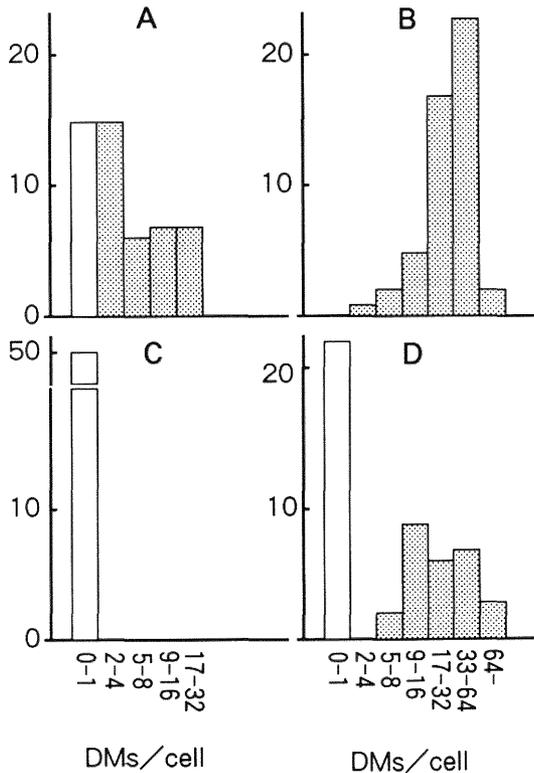


図 2 各細胞株における double minute chromosomes の分布頻度

(A) KY 821 (C) KY 821A3
(B) KY 821/MTX (D) 821A3/MTX

可能であった43細胞の核版を対象とした。43核版中のDMsの総数は1,915個であった。全染色体上に存在する銀粒子の総数は1,012個で、そのうち921個がDMs上に局在していた。したがって、全DMsの48.9%に銀粒子が認められ、また同時に全染色体上に存在する銀粒子の91.0%がDMs上に認められたことになる。また、No. 3, No. 6の染色体上にも銀粒子の高頻度な局在が認められたが、これらの染色体上にはDHFRのpseudogenesが存在していることが解っている(図4)。最近、多剤耐性化において大きな問題となっているMDR1遺伝子についても、pCA12-2をプローブとして用いて検討を行ったが、KY821のMTX耐性株ではMDR1に関しては、その遺伝子増幅・発現亢進いずれも認められなかった。

3) 培養液からMTXを除去後の細胞遺伝学的変化

KY821/MTX, KY821A3/MTX 両細胞株の培養液からMTXを除去して培養を続けると、増幅していたDH-

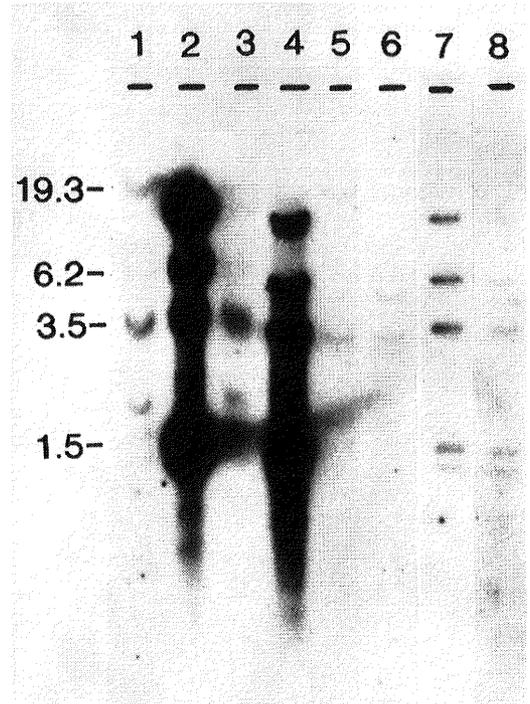


図 3 各細胞株における DHFR 遺伝子の増幅

各 genomic DNA は EcoRI にて完全消化後電気泳動し、³²P ラベル pHD84 インサート DNA と Southern blot hybridization を行った。

レーン 1: KY 821 レーン 5: HL60
2: KY 821/MTX 6: ヒト胎盤 DNA
3: KY 821 A3 7: KY 821/MTX
4: KY 821 A3/MTX 8: KY 821 A3/MTX
(1-6: 8 μ g DNA/lane, 7-8: 0.5 μ g DNA/lane)

表 2 MTX 無添加培養液中での KY821A3/MTX の経時的変化

	DHFR の mRNA	DHFR 遺伝子の増幅*	DMs 数 (/細胞)	細胞倍加時間 (hrs)
MTX 添加培養中	100 %	100 %		45.2
MTX 除去 1 週間後	14 %	62 %	↓**	21.2
MTX 除去 2 週間後	0 %	40 %	↓↓**	16.5

* DHFR の mRNA および遺伝子増幅に関しては densitometry にて計測し KY821A3/MTX (0.02 mM) と比較した。

** 細胞あたりの DMs 数分布の経時的変化については図 6 に示した。

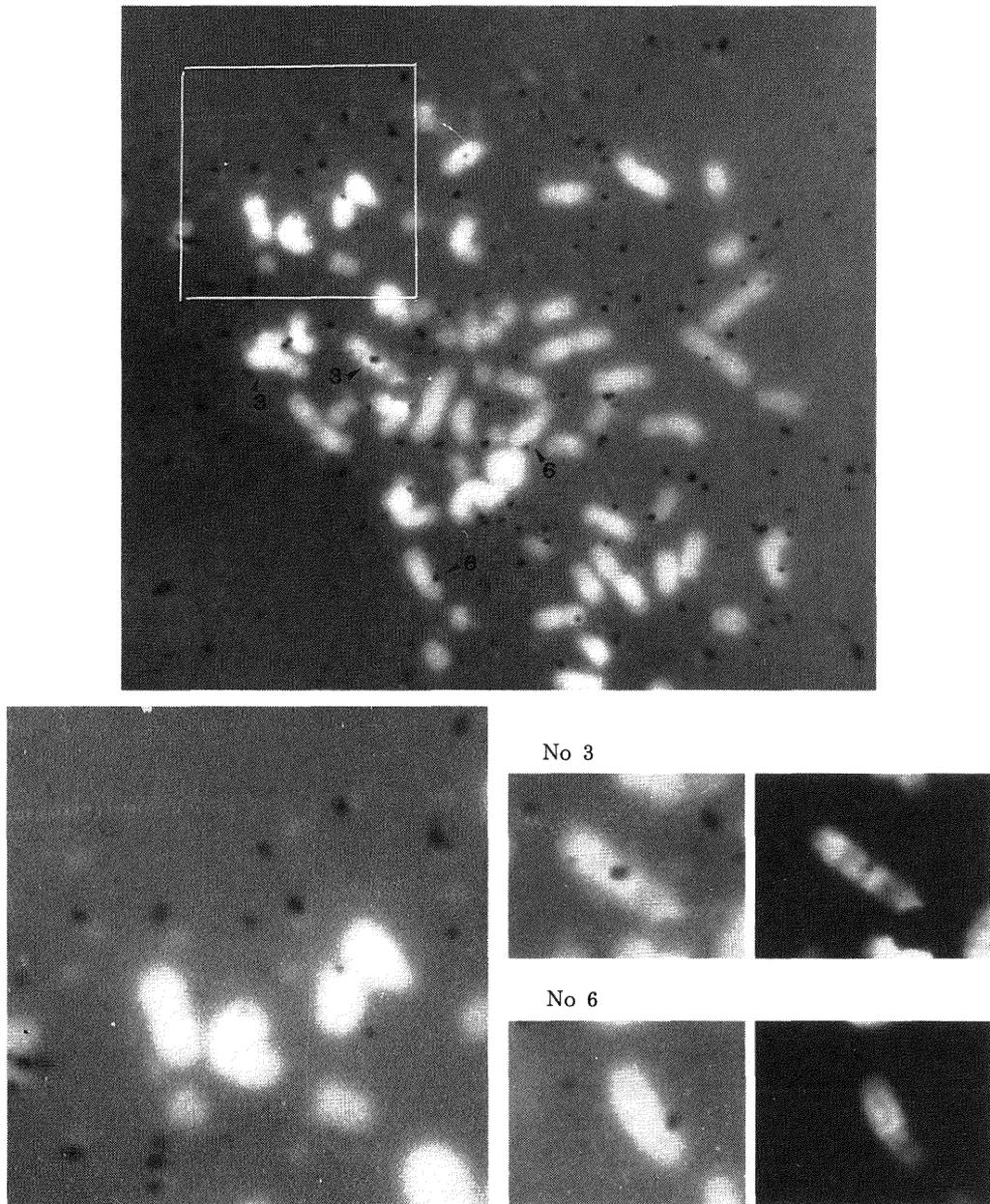


図4 染色体標本における *in situ* hybridization

DMsの増加しているKY821A3/MTXの染色体上で ^3H ラベルpHD84インサートDNAをプローブとして*in situ* hybridizationを行った。autoradiography後のプローブDNAの存在は銀粒子として認められるが、DMs上に数多く認められた。また、#3、#6の染色体上にも高頻度に認められることがQ-バンド法によって確認された。

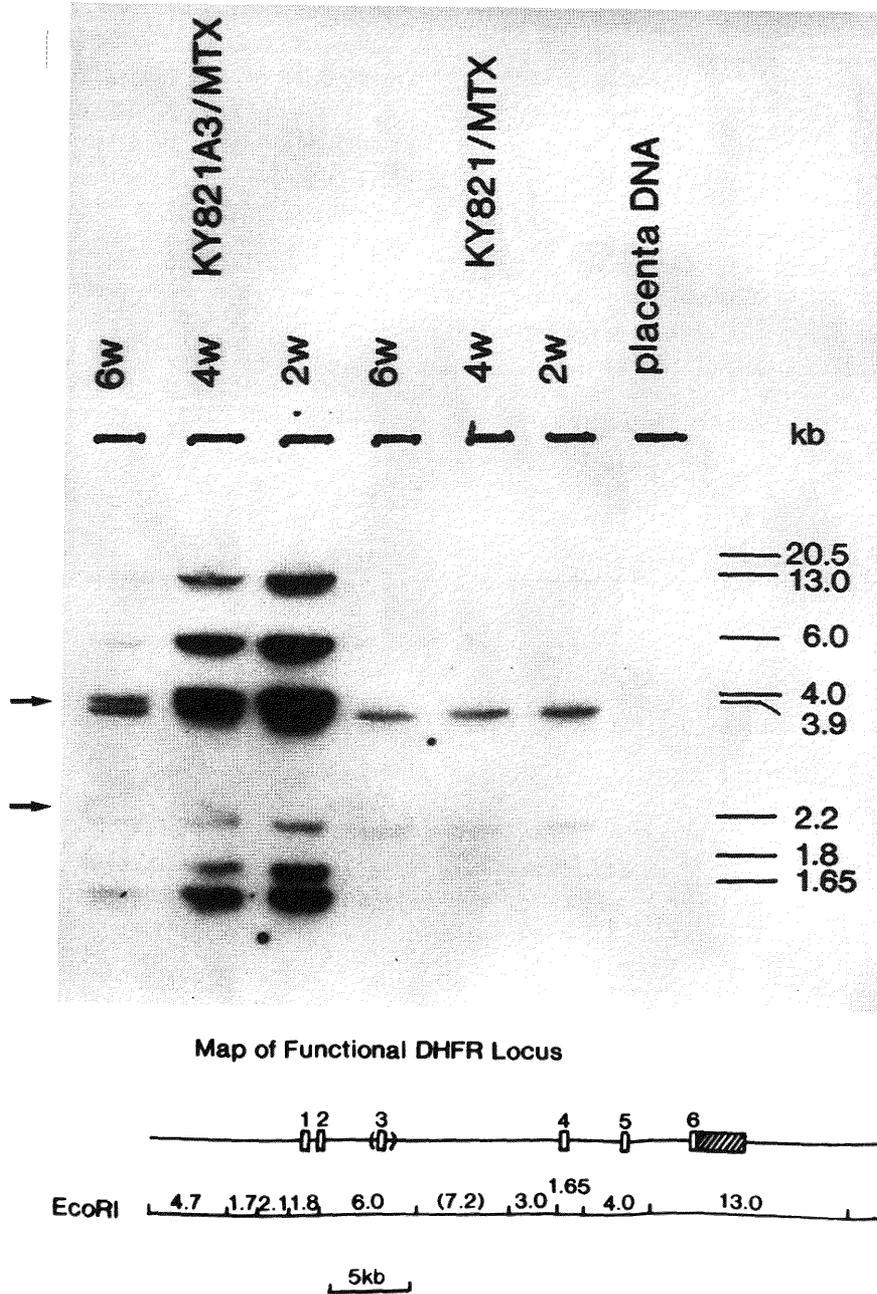


図 5 各耐性細胞株の MTX 無添加培養中の増幅 DHFR 遺伝子の経時的变化

各レーンあたり EcoRI 消化 genomic DNA を 10 μ g 電気泳動し, [³²P] ラベルした pHD84 インサート DNA と Southern blot hybridisation を行った。矢印で示す 3.9kb と 2.2kb のバンドは諸報告²⁸⁾⁻²⁹⁾より DHFR の pseudogene と考えられる。

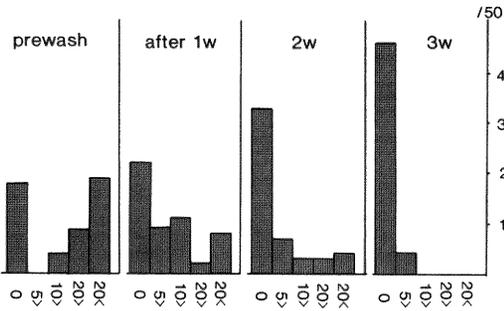


図6 KY821A3/MTX の MTX 無添加培養における細胞あたりの DMs 数の経時的変化

FR 遺伝子のコピー数は経時的に減少した。この際、両者の細胞株間で増幅している遺伝子コピー数の減少速度には差があり、KY821/MTX の方が KY821A3/MTX

に比べて減少傾向は速やかであった(図5)。また、プローブとして pHD84 を用いた場合、図5に示す functional DHFR gene の genomic map より 13.0, 6.0, 4.0, 1.8, 1.65 kb の位置に観察される DHFR 遺伝子の DNA 断片の他に、介在配列を欠如する DHFR 偽遺伝子の増幅もあることが Southern blot hybridization の経時的観察の結果から推察された。この DHFR の偽遺伝子にも機能的な活性があるらしいことは指摘されている¹⁵⁾。

KY821A3/MTX において、MTX 非存在下で短期培養を続けた際の、同時点での増幅 DHFR 遺伝子コピー数・DHFR の mRNA 量・細胞あたりの DMs 数、および細胞倍加時間についても経時的に観察を行い、表2のような結果を得た。その際、DMs をある程度有する細胞は MTX 除去2週目まではかなり残存していたが、

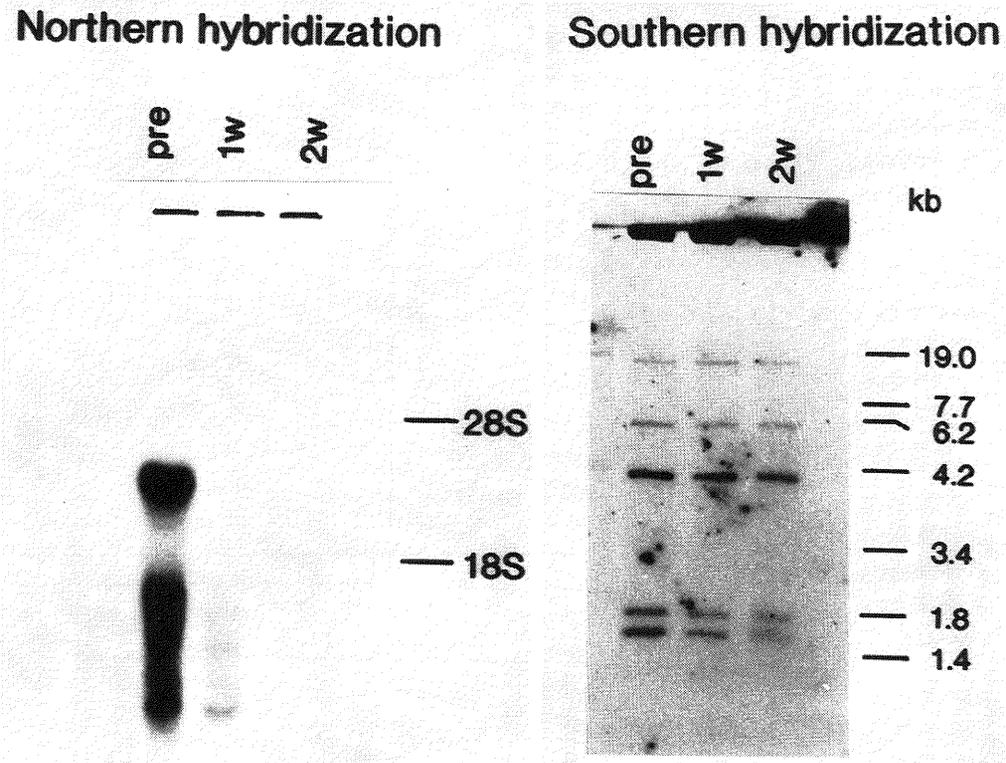


図7 KY821A3/MTX の MTX 無添加短期間培養における DHFR の mRNA 発現および増幅 DNA の経時的変化

MTX 除去前、除去培養後1週目、2週目の KY821A3/MTX から total RNA および genomic DNA を抽出し、total RNA は各レーン 20 μ g、DNA は EcoRI にて消化後各レーン 5 μ g ずつ電気泳動し、pHD84 インサート DNA をプローブとしてそれぞれ Northern blot, Southern blot hybridization を行った。

3週目ではほぼ消失した(図6)。また、MTX非存在下の培養では、MTX存在下で延長していた細胞倍加時間はDMsの減少、消失とともに比較的速やかに短縮・正常化した。一方、DHFRのmRNAの発現は、培養液中のMTX除去1週目ではまだわずかに認められていたが、2週目ではNorthern法の感度ではほぼ認められなくなるまで減少した。したがって、過剰発現しているmRNAの消失までの時間は、染色体レベルでのDMs、およびDNAレベルでのDHFR遺伝子増幅の経時的变化と比べるとかなり速やかであった。また、発現しているDHFRのmRNAは、multiple forms⁶⁾⁷⁾をとっているものと考えられた(図7)。

考 察

メソトレキセート(MTX)は葉酸の代謝拮抗剤で、現在でも抗腫瘍薬として頻用されているものの獲得耐性が生じやすい薬剤でもある。その作用機序としては、MTXがDHFRと結合することによりDHFRの酵素活性を障害し、ジヒドロ葉酸からテトラヒドロ葉酸への還元反応を阻害することにある。したがって、DHFRの酵素活性が異常に亢進すると、競合的にMTXの結合能を凌駕し、障害されなかったDHFR活性が作用することがMTX耐性化の機序と考えられてきた。事実、MTX耐性細胞にはDHFR遺伝子の増幅があることは以前から報告されている^{1)~3)}。しかし、MTX耐性化に関しては、DHFR遺伝子増幅の他にも実にさまざまな段階での耐性化機序の報告がみられる^{16)~21)}。

一方、各種の腫瘍細胞株において時に認められるDMsやHSRは、*c-myc*などのoncogeneの増幅、またはMTX耐性化や多剤耐性化の時に認められるDHFRやMDR1遺伝子などの増幅の染色体レベルでの表現形態としてよく知られているが、ヒト由来白血病細胞株での詳細な検討はそれほど多くない。

今回用いた細胞株KY821は、樹立時より微小染色体(DMs)を有しtetraploidyを基本染色体構造とするヒト骨髓芽球形白血病細胞株であり⁵⁾、5年以上にわたり経代培養を続けている。原株KY821においてDMs上で増幅している遺伝子が何かについては現時点では不明であるが、株化以前の白血病細胞においてもDMsは存在していたので、腫瘍化に関与した遺伝子の増幅の結果形成された染色体異常と推定される。

今回の検討で、KY821およびクローニングによって選択されたサブクローンKY821A3の両細胞株において、MTX耐性化の過程においてDMsという染色体

形態で遺伝子増幅を起こしやすいことを明らかにした。さらに、MTX耐性能と、DHFR遺伝子増幅度、DHFRの酵素活性、および染色体のDMs数との間には相関性が認められ、両細胞株におけるMTX耐性の主たる機序はDHFR遺伝子の増幅であることが強く示唆された。また、DMsがDHFR遺伝子増幅の結果生じていることは、染色体標本上での*in situ* hybridizationによって確認した。

一般に、遺伝子増幅の結果生じる染色体異常のうち、HSRは比較的安定なものであるのに対して、DMsはかなり不安定なものと考えられている³⁾²²⁾。そこで次に筆者は、薬剤による選択的外圧であるMTXを取り除いた培養系においての、MTX耐性白血病細胞株の細胞遺伝学的経時的变化につき検討した。その結果、同一培養期間内でより高濃度のMTXに耐性を獲得したDMs増加率の高い細胞株(KY821/MTX)の方が、増幅遺伝子コピー数の減少がより速やかであった。この結果は、遺伝子増幅の結果DMsが増加しやすい細胞株の方が、その増加したDMsはより不安定なものであることを推察させる。

一方、増幅していたDHFR遺伝子のコピー数は、遺伝子増幅をきたした外的圧力(MTX)が取り除かれた環境下においては、週単位での経時的減少を示した。さらに、その経過が染色体レベルでのDMsの減少傾向とほぼ一致したことより、DHFR遺伝子の増幅はその大部分がDMsにて生じていることを確認する成績と考えられた。それに対して、過剰発現していたmRNAの消失は、染色体および遺伝子レベルに比べるとかなり速やかであった。この結果は、増幅しているDHFR遺伝子は恒常的に発現しているだけではなくある程度の発現調節を受けている可能性を示唆するものであろう。

これまでMTX耐性化とDHFR遺伝子増幅に関する研究の多くは、実験動物癌細胞の系において行われてきた⁴⁾。最近では、ヒトの腫瘍細胞株の系においても同様の検討が報告されているが²³⁾²⁴⁾、ヒト白血病細胞株を用いての研究はそれほど多くない²⁵⁾。実際の臨床の場におけるDHFR遺伝子の増幅症例の報告もなされているが、その頻度は極めて稀なものと考えられる²⁶⁾²⁷⁾。

今回検討を行ったヒト白血病細胞株KY821は、薬剤耐性を獲得する以前よりDMsという異常染色体を保持しており、DMsの存在しないサブクローンの方が細胞倍加時間は短いという特徴を有している。さらに、これらの細胞株はMTX耐性を獲得する培養過程においてDHFR遺伝子の増幅を容易に起こしうること、ま

たそれが MTX 耐性の主たる機序であること、一方、染色体レベルではほとんど DMs によって遺伝子の増幅が生じていることを証明した。このようにして MTX 耐性を獲得した細胞株における DHFR の mRNA 過剰発現は、MTX 非存在下では極めて一過性であり、DNA レベルでの増幅遺伝子や染色体レベルでの DMs も比較的速やかに減少はしたが、mRNA の過剰発現の消退はそれらに先行することも示した。

今回の検討結果より、MTX 耐性細胞株の DMs 上で増幅している DHFR 遺伝子は、培養条件によってある程度の発現調節を受けること、および介在配列を欠如する DHFR 偽遺伝子も増幅しうる可能性があることが示唆された。

今後、このヒト由来の白血病細胞株 KY821 は、種々の薬剤に対する耐性化と遺伝子増幅の研究領域や、遺伝子増幅の機序の解明などにおいて、有用な細胞株となりうるものと期待される。

結 語

当教室で樹立されたヒト白血病細胞株 KY821 を用いて、メソトレキセート (MTX) 耐性と微小染色体 (DMs) および MTX の標的酵素であるジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) 遺伝子の関連につき、細胞遺伝学的な検討を行った。

1. 細胞あたり種々の数の DMs を有し、tetraploid の染色体構成を基本とするヒト白血病細胞株 KY821 と、そのサブクローンで DMs をもたない KY821A3 とを樹立し、それぞれの MTX 耐性株を作製した。同一の継代培養期間内で、KY821 は $2 \times 10^{-4} \text{M}$ まで、KY821 A3 は $2 \times 10^{-5} \text{M}$ までの MTX 濃度に対しての耐性を獲得しえた。

2. 両 MTX 耐性株では細胞あたりの DMs は明らかに増加し、その DMs 数と DHFR 活性および DHFR 遺伝子増幅との間には正の相関性を認めた。さらに、*in situ* hybridization により、増幅した DHFR 遺伝子は DMs 上に局在することを証明した。

3. 不安定な染色体である DMs 上で増幅した DHFR 遺伝子は、培養液から MTX を除去すると比較的速やかにその増幅は減衰した。その際、増幅遺伝子 DHFR は DMs の減少とはほぼ一致した動態を示したが、一方、過剰発現していた DHFR の messenger RNA (mRNA) はより早期の段階で消退をみた。

4. 経時的なサザン解析の結果より、MTX 耐性細胞株の DMs 上で増幅している遺伝子の一部は、DHFR

偽遺伝子である可能性が示唆された。さらに、DMs の増加に伴い遺伝子増幅を生じやすい細胞株は、その増幅した遺伝子はより安定性が低いことを推察される結果も得た。

謝 辞

稿を終わるにあたり、終始御懇篤なる御指導ならびに御校閲を賜りました新潟大学第一内科学教室、柴田昭教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究に際して終始御指導、御鞭撻いただきました同付属病院輸血部、品田章二助教授、細胞株を樹立された実験全般にわたり広く御指導いただきました同付属病院高密度無菌治療部、岸 賢治先生に深謝いたします。さらに、ジヒドロ葉酸還元酵素の酵素活性を測定していただいた国立療養所中部病院内科、名倉英一先生、染色体解析を施行していただいた京都府立医大衛生学教室、前川 平先生および当教室の成田美和子先生、実験に御協力いただいた当教室の古川達雄先生および田中いずみ、木村美奈子の諸嬢にも厚くお礼申し上げます。

参 考 文 献

- 1) Alt, F.W., Kellems, R.E., Bertino, J.R. and Schimke, R.T.: Selective multiplication of dihydrofolate reductase genes in methotrexate-resistant variants of cultured murine cells. *J. Biol. Chem.*, **253**: 1357~1370, 1978.
- 2) Nunberg, J.H., Kaufman, R.J., Schimke, R.T., Urlaub, G. and Chasin, L.A.: Amplified dihydrofolate 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. USA.*, **75**: 5553~5556, 1978.
- 3) Kaufman, R.J., Brown, P.C. and Schimke, R.T.: Amplified dihydrofolate reductase genes in unstable methotrexate-resistant cells are associated with double minute chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **76**: 5669~5673, 1979.
- 4) "Gene Amplification" (ed. Schimke, R.T.), Cold Spring Harbor Lab., New York, 1982.
- 5) Ohta, Y. and Kishi, K.: Double minute chromosome (DMs) in a case of acute myeloblastic leukemia and the cell line derived from the

- patient. *Jap. J. Human Genetics*, **28**: 258, 1984.
- 6) **Morandi, C., Masters, J.N., Mottes, M. and Attardi, G.**: Multiple forms of human dihydrofolate reductase messenger RNA. *J. Molec. Biol.*, **156**: 583~607, 1982.
 - 7) **Masters, J.N., Yang, J., Cellini, A. and Attardi, G.**: A human dihydrofolate reductase pseudogene and its relationship to the multiple forms of specific messenger RNA. *J. Molec. Biol.*, **167**: 23~36, 1983.
 - 8) **Masters, J.N. and Attardi, G.**: The nucleotide sequence of the cDNA coding for the human dihydrofolic acid reductase. *Gene*, **21**: 59~63, 1983.
 - 9) **Sugimoto, Y. and Tsuruo, T.**: DNA-mediated transfer and cloning of a human multidrug-resistant gene of adriamycin-resistant myelogenous leukemia K562. *Cancer Res.*, **47**: 2620~2625, 1987.
 - 10) **Blin, N. and Stafford, D.W.**: Isolation of high molecular weight DNA. *Nucleic Acids Res.*, **3**: 2303~2308, 1976.
 - 11) **Southern, E.**: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, **98**: 503~507, 1975.
 - 12) **Bertino, J.R., Perkins, J.P. and Johns, D.G.**: Purification and properties of dihydrofolate reductase from Ehrlich ascites carcinoma cells. *Biochemistry*, **4**: 839~846, 1965.
 - 13) **Perkins, J.P., Hillcoat, B.L. and Bertino, J.R.**: Dihydrofolate reductase from a resistant subline of the L1210 lymphoma. *J. Biol. Chem.*, **242**: 4771~4776, 1967.
 - 14) **Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.**: Protein measurement from Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**: 265~275, 1951.
 - 15) **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**: 55~62, 1983.
 - 16) **Schilsky, R.L., Bailey, B.D. and Chabner, B.A.**: Characteristics of membrane transport of methotrexate by cultured human breast cancer cells. *Biochem. Pharmacol.*, **30**: 1532~1542, 1981.
 - 17) **Sirotnak, F.M., Moccio, D.M. and Kelleher, L.F.**: Relative frequency and kinetics properties of transport defective phenotypes among methotrexate-resistant L1210 clonal cell lines derived in vivo. *Cancer Res.*, **41**: 4447~4452, 1981.
 - 18) **Hill, B.T., Bailey, B.D. and White, J.C.**: Characteristics of folate compounds by transport of 4-amino antifolate and folate compounds two lines of L5178Y lymphoblasts, one with impaired transport of methotrexate. *Cancer Res.*, **39**: 2440~2446, 1979.
 - 19) **Schilsky, R.L., Bailey, B.D. and Chabner, B.A.**: Methotrexate polyglutamate synthesis by cultured human breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **77**: 2919~2922, 1980.
 - 20) **Fabre, I., Fabre, G. and Goldman, I.D.**: Polyglutamination, an important element in methotrexate cytotoxicity and selectivity in tumor versus murine granulocytic progenitor cells in vitro. *Cancer Res.*, **44**: 3190~3195, 1984.
 - 21) **Allegra, C.J., Fine, R.L. and Drake, J.C.**: The effect of methotrexate on intracellular folate pools in human MCF-7 breast cancer cell. evidence for direct inhibition of purine synthesis. *J. Biol. Chem.*, **261**: 6478~6485, 1986.
 - 22) **Curt, G.A., Carney, D.N., Cowan, K.H., Jolivet, J., Bailey, B.D., Drake, J.C., Kao-Shan, C.S., Minna, J.D. and Chabner, B.A.**: Unstable methotrexate resistance in human small-cell carcinoma associated with double minute chromosomes. *N. Engl. J. Med.*, **308**: 199~202, 1983.
 - 23) **Trent, J.M., Buick, R.N., Olson, S., Horns, R.C. and Schimke, R.T.**: Cytologic evidence for gene amplification methotrexate-resistant cells obtained from a patient with ovarian adenocarcinoma. *J. Clin. Oncol.*, **2**: 8~15, 1984.
 - 24) **Meltzer, P.S., Cheng, Y. and Trent, J.M.**: Analysis of dihydrofolate reductase gene amplification in a methotrexate-resistant human tumor cell line. *Cancer Genet. Cytogenet.*, **17**: 289~300, 1985.

- 25) **Srimatkandada, S., Medina, W.D., Cashmore, A.R., Whyte, W., Engel, D., Moroson, B.A., Franco, C.T., Dube, S.K. and Bertino, J.R.:** Amplification and organization of dihydrofolate reductase genes in a human leukemic cell line, K-562, resistant to methotrexate. *Biochemistry*, **22**: 5774~5781, 1983.
- 26) **Horns, R.C., Dower, W.J. and Schimke, R.T.:** Gene amplification in a patient treated with methotrexate. *J. Clin. Oncol.*, **2**: 2~7, 1984.
- 27) **Carman, M.D., Schornagel, J.H., Rivest, R.S., Srimatkandada, S., Portlock, C.S., Duffy, T. and Bertino, J.R.:** Resistance to methotrexate due to gene amplification in a patient with acute leukemia. *J. Clin. Oncol.*, **2**: 16~20, 1984.
- 28) **Chen, M.J., Shimada, T., Moulton, A.D., Cline, A., Humphries, R.K., Maizel, J.M. and Nienhuis, A.W.:** The functional human dihydrofolate reductase gene. *J. Biol. Chem.*, **259**: 3933~3943, 1984.
- 29) **Anagnou, N.P., O'Brien, S.J., Shimada, T., Nash, W.G., Chen, M.J. and Nienhuis, A.W.:** Chromosomal organization of the human dihydrofolate reductase genes: dispersion, selective amplification, and a novel form of polymorphism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**: 5170~5174, 1984.

(平成3年9月17日受付)
