

ヒト腎がん細胞に対する抗がん剤の併用効果

兵庫県立神戸高等学校 総合理学科 2年

がんにはさまざまな種類があるが、腎臓がんは薬剤耐性が強いことで知られている。本研究では、腎臓がんの効率的治療のために、ヒト腎がん細胞 Caki-2 での抗がん剤の併用効果を調べた。現在臨床では多様な抗がん剤が使用されているが、それらは大きく 10 種類に分類することができ、本研究ではそのうちの 7 種類を使用した。また、今回は体内で生成され、細胞死に関与する物質である 15-deoxy $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J_2 (以下 15d-PG J_2 と略す) 及び微小管阻害薬パクリタキセルに着目し、これと抗がん剤の組み合わせによる Caki-2 への効果を、ミトコンドリア変質検出手段である MTT アッセイと、顕微鏡画像の解析によるがん細胞の形態変化を用いて評価した。その結果、15d-PG J_2 またはパクリタキセルとその他の抗がん剤との併用では、新規の相乗効果は確認されなかった。しかし、Caki-2 において分子標的薬ボルテゾミブが抗腫瘍効果を示すことが発見された。

1. はじめに

腎臓がんは薬剤耐性の高いがんである。薬を高濃度・多量に投与すればこれを克服できるが、人体への影響が大きくなりすぎる。そこで、低濃度・少量の抗がん剤で十分な効果を出すために、薬剤同士の相乗効果を模索しようと考えた。

私たちは、体内で分泌され、細胞死に関与する 15d-PG J_2 という物質に着目した。平成 25 年度の課題研究では、この物質とトポイソメラーゼ II 阻害剤ドキシソルビシン (DNA 鎖のねじれ解消を阻害し、細胞分裂を中断する抗がん剤) とを組み合わせ使用したところ、相乗効果が確認された。

本研究で、腎がん細胞を効果的に死滅させるために、15d-PG J_2 や様々な抗がん剤の中で、どの組み合わせが最も有効かを MTT アッセイ及び形態観察で評価した。

2. 方法

2.1 実験手順

冷凍保存した Caki-2 を 37°C で解凍し、シャーレ培地 (RPMI1640、10%胎児ウシ血清 (FBS) 入り) に移し、CO $_2$ インキュベーター (CO $_2$ 5%、37°C) 内で培養した。1 週間後にトリプシン処理することでシャーレの底面から細胞を剥がし、 1.0×10^4 cells/cm 2 の密度で 24well 培養プレートに播種した。24 時間培養した後に、各 well の培養液を抗がん剤入りの培養液に置換した。そして、さらに 24 時間後に細胞生存率を算出した。

2.2 抗がん剤について

今回実験で用いた抗がん剤は次の 10 種類である。

- 15-deoxy $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J_2 (15d-PG J_2)
多くの腫瘍細胞でアポトーシスを誘導する内因性抗がん物質。アクチンを標的の一つとする。
- ボルテゾミブ (bor: 分子標的薬)
プロテアソームを標的とし、タンパク質を分解するシステムを阻害する抗がん剤。
- ブレオマイシン (BLM: 抗腫瘍性抗生物質)

DNA 鎖を切断して増殖を抑制する抗がん剤。

- パクリタキセル (PTX: 微小管阻害薬)
微小管を標的とし、染色体脱重合の阻害によって細胞分裂を中断する抗がん剤。
- エルロチニブ (分子標的薬)
上皮成長因子受容体 (EGFR) を阻害し、増殖促進タンパク質の生成を阻害する抗がん剤。
- ゲニステイン (分子標的薬)
血管内皮増殖因子受容体 (VEGFR) を阻害し、酸素などの供給を遮断する抗がん剤。
- シスプラチン (白金製剤)
DNA の二本鎖のグアニン・アデニンを結合し、二重らせんがほどけるのを防ぐ抗がん剤。
- シクロホスファミド (アルキル化薬)
DNA の二本鎖のグアニンを結合し、二重らせんがほどけるのを阻害する抗がん剤。
- メルカプトプリン (代謝拮抗薬)
プリン塩基 (アデニン・グアニン) の代わりに DNA に取り込まれ、分裂を停止させる抗がん剤。
- ラパマイシン (mTOR 阻害剤)
タンパク質合成経路を遮断する抗がん剤。

2.3 解析に用いた物質

○ ジメチルスルホキシド

抗がん剤、15d-PG J_2 、MTT 試液の溶媒として用いた有機溶媒。なお、これは腎がん細胞に対して影響を与えないことが確認されている。

2.4 抗腫瘍効果の測定法

抗腫瘍効果は、MTT アッセイおよび形態観察を指標とした。

2.4.1 MTT アッセイについて

MTT 試液は、ミトコンドリアに取り込まれると、酸化還元反応によって、有機溶媒に溶けて赤紫色を示す物質となる。ミトコンドリアが活発に働くほどこの変化が進むので、赤紫色が濃くなる。プレートリーダーで各 well の吸光度を測定することで、この色の濃さを測定し、細胞生存の指標として生存率を算出する。

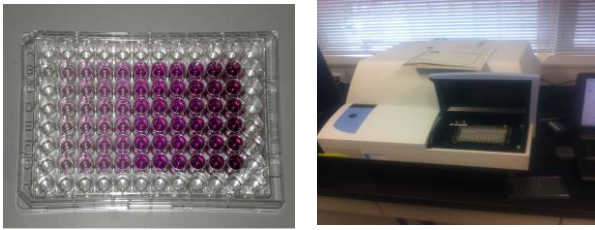


図1 (左)処理後のプレート (右)プレートリーダー

2.4.2 形態観察について

プレートのwell内で培養したヒト腎がん細胞の抗がん剤の効果による変形を、顕微鏡を用いて観察・撮影した。通常Caki-2の生細胞は、細長い形態となるが、変性細胞は接着が弱く底から剥がれてくるため丸い形態となる(図2)。この基準に基づき、生死それぞれの細胞数をカウントして細胞生存率(%)を求めた。

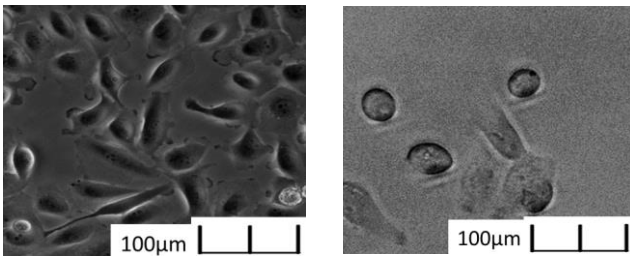


図2 (左)正常細胞(Caki-2) (右)変性細胞(Caki-2)

3. 15d-PGJ₂を用いた実験

3.1 条件設定

15d-PGJ₂ 0 µM または 20 µM のもとで9種類の抗がん剤をそれぞれ0, 0.1, 1, 10 µMで適用する計8条件でCaki-2を24時間薬剤に暴露したのち、MTTアッセイと形態観察で効果を評価した。細胞生存率はcontrolでの吸光度を100%として算出した。

3.2.1 結果(MTTアッセイ)

15d-PGJ₂と9種類の抗がん剤のうち、単独で効果が見られたのはボルテゾミブ(表1、図3)、ブレオマイシン(表2、図4)、パクリタキセル(表3、図5)の3種類のみであった。また、解析からは、いずれの薬剤でも15d-PGJ₂との相乗効果は検出されなかった。

表1 bor+15d-PGJ₂のMTTアッセイ結果

Bor	15d-PGJ ₂ 0 µM		15d-PGJ ₂ 20 µM	
	吸光度	生存率%	吸光度	生存率%
0 µM	0.782	100.0	0.672	86.6
0.1 µM	0.558	72.2	0.576	74.9
1 µM	0.532	69.5	0.547	71.4
10 µM	0.541	70.7	0.519	68.0

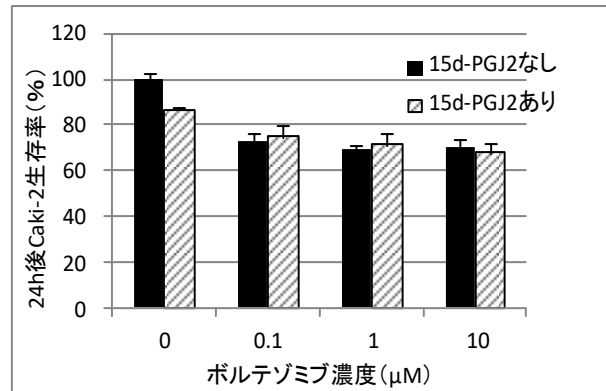


図3 15d-PGJ₂とborの併用時のCaki-2生存率

表2 BLM+15d-PGJ₂のMTTアッセイ結果

BLM	15d-PGJ ₂ 0 µM		15d-PGJ ₂ 20 µM	
	吸光度	生存率%	吸光度	生存率%
0 µM	0.961	100.0	0.743	78.3
0.1 µM	0.804	84.3	0.726	76.5
1 µM	0.796	83.6	0.671	71.0
10 µM	0.611	65.1	0.765	80.4

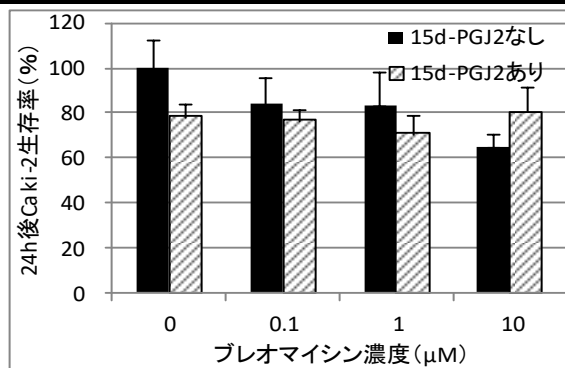


図4 15d-PGJ₂とBLMの併用時のCaki-2生存率

表3 PTX+15d-PGJ₂のMTTアッセイ結果

PTX	15d-PGJ ₂ 0 µM		15d-PGJ ₂ 20 µM	
	吸光度	生存率%	吸光度	生存率%
0 µM	0.857	100.0	0.734	86.3
0.1 µM	0.867	101.1	0.733	86.2
1 µM	0.788	92.3	0.697	82.1
10 µM	0.677	79.9	0.623	73.9

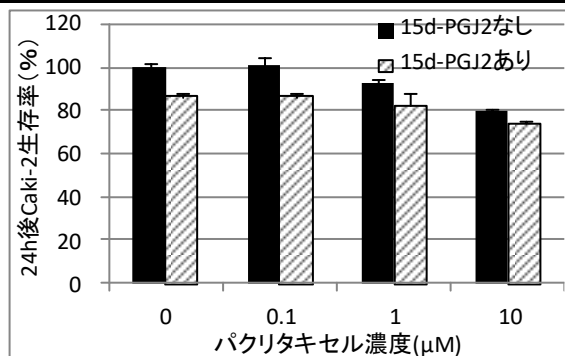


図5 15d-PGJ₂とPTXの併用時のCaki-2生存率

3.2.2 結果(形態観察)

形態観察で、ボルテゾミブ、ブレオマイシン、パクリタキセルはいずれも単独で効果を示したが、相乗効果は検出されなかった(表4、表5、図6)。

本実験においてパクリタキセルが顕著な抗腫瘍効果を示したことに着目し、以降はパクリタキセルと他の抗がん剤を併用する実験をおこなった。

表4 形態観察によるwell 毎細胞生存率
(上段: well 毎細胞生存率 下段: 条件内平均値)

	15d-PGJ ₂ 0 μM			15d-PGJ ₂ 20 μM		
	1	2	3	1	2	3
control	94.7	93.9	91.5	78.9	81.0	79.6
	93.4			79.7		
bor 10 μM	83.9	83.6	86.3	50.7	44.9	45.8
	84.6			47.1		
BLM 10 μM	88.9	83.8	87.5	79.8	78.7	80.7
	86.7			79.7		
PTX 10 μM	58.6	57.7	66.7	33.7	52.6	60.5
	61.0			48.9		

表5 control 基準の相対生存率

	15d-PGJ ₂ 0 μM	15d-PGJ ₂ 20 μM
control	100	85.3
bor 10 μM	90.6	50.4
BLM 10 μM	92.5	85.3
PTX 10 μM	65.3	52.4

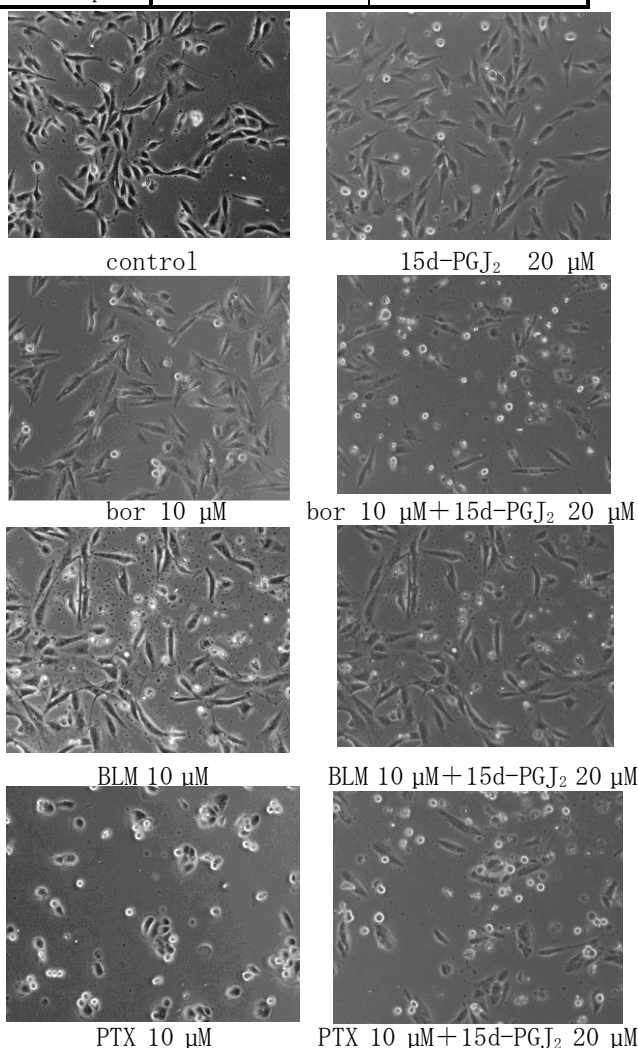


図6 解析画像

4. パクリタキセルを用いた実験

4.1 条件設定

パクリタキセル 0 μM または 1.0 μM のもとで各種抗がん剤 0, 0.1, 1, 10 μM を適用する計8条件で24時間薬剤に暴露し、効果を評価した。

4.2.1 結果(MTT アッセイ)

ブレオマイシン(表6、図7)・ボルテゾミブ(表7、図8)単独では効果を示したが、パクリタキセルと各抗がん剤との併用によって、相乗効果は確認できなかった。

表6 PTX+bor の MTT アッセイ結果

bor	PTX 0 μM		PTX 1.0 μM	
	吸光度	生存率%	吸光度	生存率%
0 μM	0.584	100.0	0.364	64.5
0.1 μM	0.549	94.4	0.344	61.3
1 μM	0.508	87.7	0.351	62.4
10 μM	0.648	81.3	0.392	69.1

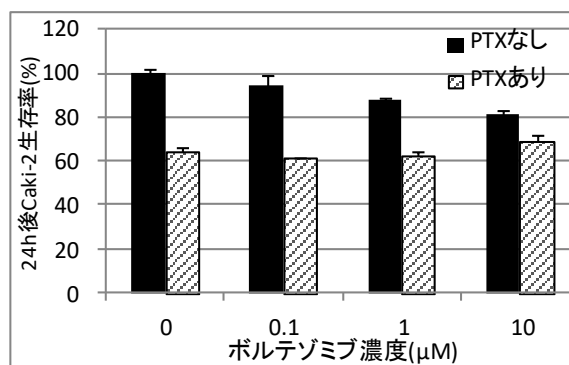


図7 PTX と bor の併用時の Caki-2 生存率

表7 PTX+BLM の MTT アッセイ結果

BLM	PTX 0 μM		PTX 1.0 μM	
	吸光度	生存率%	吸光度	生存率%
0 μM	0.644	100.0	0.315	51.7
0.1 μM	0.409	65.5	0.334	54.5
1 μM	0.184	32.4	0.372	60.0
10 μM	0.204	35.5	0.351	57.0

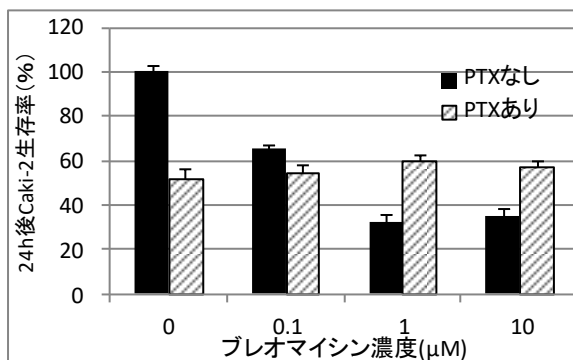


図8 PTX と BLM の併用時の Caki-2 生存率

4.2.2 結果(形態観察)

形態観察からは、パクリタキセルが各薬剤の効果を顕著に増強したデータは得られず、パクリタキセルと抗がん剤の併用で相乗効果は検出できなかった。

表8 形態観察による well 毎細胞生存率 (%)
(上段: well 毎細胞生存率 下段: 条件内平均値)

	PTX 0 μM			PTX 1.0 μM		
	1	2	3	1	2	3
control	93.8	93.0	94.1	56.6	49.0	52.4
	93.6			52.7		
bor 10 μM	71.9	68.0	85.1	65.7	67.7	81.6
	75.0			71.7		
BLM 10 μM	93.3	93.0	92.3	87.5	93.7	86.4
	92.9			89.2		

表9 control 基準の相対生存率 (%)

	PTX 0 μM	PTX 1.0 μM
control	100	56.3
bor 10 μM	80.1	76.6
BLM 10 μM	99.3	95.3

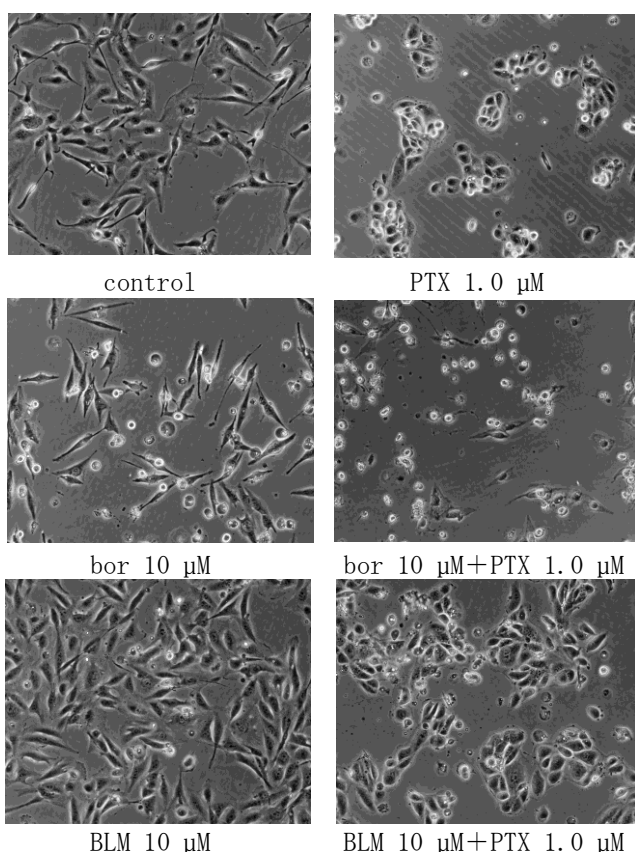


図9 解析画像

5. 考察

今回の実験では、現在臨床で使われている抗がん剤を中心に、ボルテゾミブ、ブレオマイシン、パクリタキセル、エルロチニブ、ゲニステイン、

シスプラチン、シクロホスファミド、メルカプトプリン、ラパマイシンの9種類を適用したが、このうち単独でCaki-2において抗腫瘍効果を示したものはボルテゾミブ、ブレオマイシン、パクリタキセルの3種類のみであった。

この3種と15d-PGJ₂をCaki-2に対して併用したところ、いずれも相乗効果は確認できなかった。このことは、Caki-2において15d-PGJ₂と相乗効果を示す抗がん剤は、ドキシソルビシンのみであることを示した。

また、単独で安定して大きな抗腫瘍効果を示したパクリタキセルとボルテゾミブ、ブレオマイシンの併用実験からも、相乗効果を検出することはできなかった。

しかし、分子標的薬ボルテゾミブについて、いままでCaki-2での適用試験は行われていなかったが、私たちは、この薬剤がCaki-2において効果を示す最初の証拠を提供した。

6. 今後の実験方針

今後は、平成25年度の課題研究で発見された15d-PGJ₂とトポイソメラーゼII阻害剤ドキシソルビシンの相乗効果が、*vhl*遺伝子の変異の有無に依存するかどうかを調べる実験を行う。

*vhl*遺伝子とは、がん抑制遺伝子で、腎臓がん患者の約4割でこの遺伝子の変異が見られる。*vhl*依存性を調べることは、*vhl*の状態が異なる腎臓がん患者にも同じ治療法が適用できるかどうかを調べることであり、より多くの腎がん患者に対して有効な治療法の開発の動機となるかもしれない。

謝辞

本研究を進めるにあたり、姫路獨協大学薬学部医療薬学科の矢上達郎教授をはじめ、研究室の皆様にご協力を賜りました。心より御礼申し上げます。また、兵庫県立神戸高校の野々村宙教諭には一年を通して熱心にご指導頂きました。本当にありがとうございました。

参考文献

- ・今日の治療薬2012 解説と便覧(南江堂)
- ・腎癌のすべて(メジカルビュー社)
- ・Synergistic effects of 15-deoxy Δ 12,14-prostaglandin J₂ on the anti-tumor activity of doxorubicin in renal cell carcinoma, *Biochemistry and Biophysics Reports* 9 (2017) 61-66