

ヒト腎がん細胞に対する 抗がん剤の併用効果

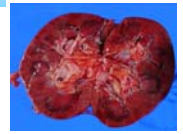
兵庫県立神戸高校総合理学科2年

腎臓と腎細胞がん

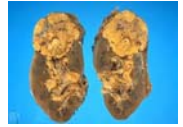


腎臓とは？

生活で生じた毒素や余分な水分を尿として排出する臓器



正常腎



腎がん

腎細胞がんとは？

腎がん全体の80パーセントを占めており、**薬剤耐性が非常に高い**

強い薬剤耐性を持つ

⇒高濃度・多量投与すれば効く

BUT

副作用などのリスク



低濃度・少量で十分な効果を出す方法

相乗効果

副作用の低減

薬学研究への応用

H25年の課題研究

○15-デオキシ $\Delta^{12,14}$ プロスタグランジン J_2 (15d-PG J_2)
: 血中に存在し、抗がん剤としてはたらく**脂質代謝物質**

●ドキシソルビシン(トポイソメラーゼ阻害剤)
: DNA2本鎖のねじれ解消を中断する**抗がん剤**

の併用が相乗効果を示す

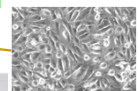
実験手法

• 細胞: ヒト腎がん細胞Caki-2

• 培地: RPMI1640
10%FBS(ウシ胎児血清)

• 薬品: 15d-PG J_2
抗がん剤9種類

• 解析方法
: MTTアッセイ(ミトコンドリア変質評価)
画像解析(形態変質評価)



使用した薬剤

微小管阻害薬..... パクリタキセル
 抗腫瘍性抗生物質..... プレオマイシン
 分子標的薬(プロテアソーム)..... ボルテゾミブ
 (EGFR)..... エルロチニブ
 (VEGFR)..... ゲニステイン
 白金製剤..... シスプラチン
 代謝拮抗薬..... メルカプトプリン
 mTOR阻害剤..... ラパマイシン
 アルキル化薬..... シクロホスファミド

用語説明

- 15-デオキシ $\Delta^{12,14}$ プロスタグランジン J_2 (15d-PG J_2)
 血中に存在し、抗がん剤としてはたらく脂質代謝物質
- パクリタキセル(微小管阻害薬)
 微小管を標的とする抗がん剤
 - ボルテゾミブ(分子標的薬)
 がん細胞のプロテアソームを標的とする抗がん剤
 - プレオマイシン(抗腫瘍性抗生物質)
 DNA鎖を切断する抗がん剤

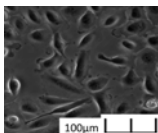
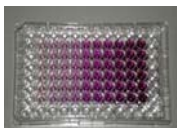
実験の流れ

24wellプレートに播いたCaki-2を
 CO $_2$ インキュベーター内で37°C、CO $_2$ 5%で24h培養。

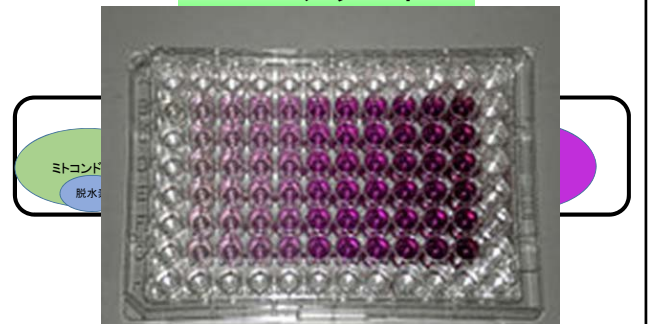
↓
 培養液で希釈した薬剤を加え、24hさらす。

↓
 画像解析(形態観察)

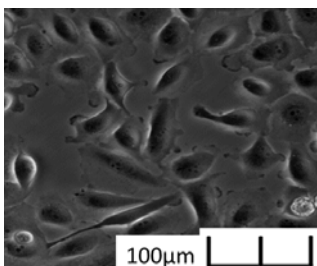
↓
 MTTアッセイ



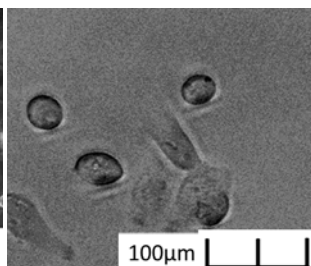
MTTアッセイ



形態観察



左: 正常なCaki-2

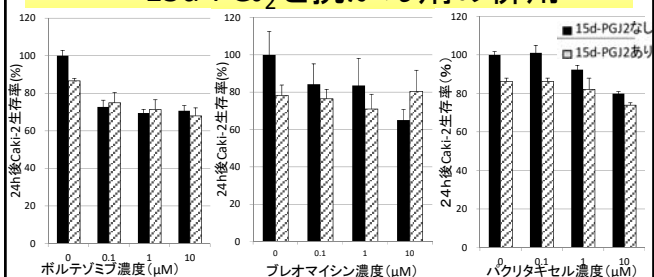


右: 変性したCaki-2

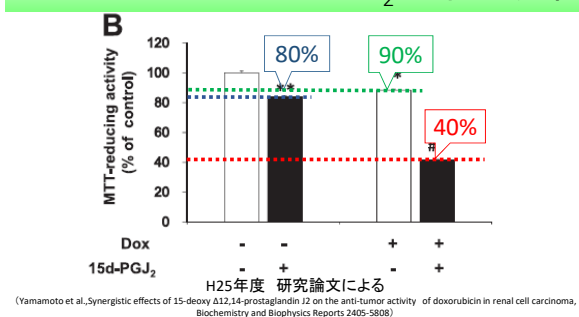
用語説明(おさらい)

- 15-デオキシ $\Delta^{12,14}$ プロスタグランジン J_2 (15d-PG J_2)
 血中に存在し、抗がん剤としてはたらく脂質代謝物質
- パクリタキセル(微小管阻害薬)
 抗がん剤
 - ボルテゾミブ(分子標的薬)
 抗がん剤
 - プレオマイシン(抗腫瘍性抗生物質)
 抗がん剤

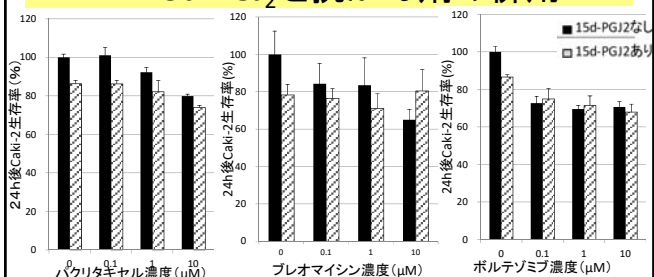
MTTアッセイ結果（ミトコンドリア変性） 15d-PGJ₂と抗がん剤の併用



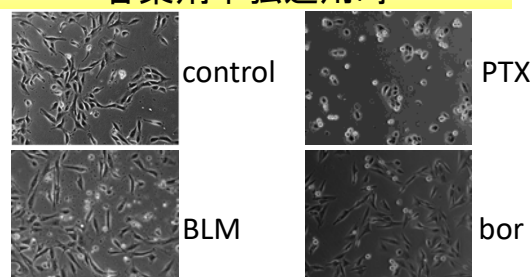
ドキソルビンと15d-PGJ₂の相乗効果



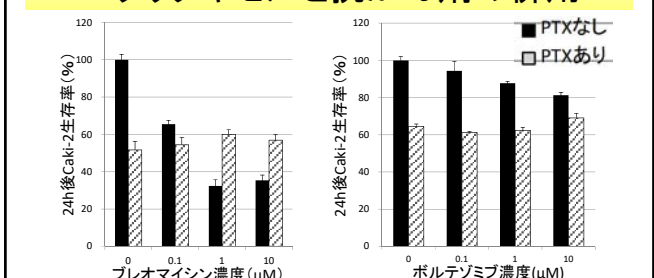
MTTアッセイ結果（ミトコンドリア変性） 15d-PGJ₂と抗がん剤の併用



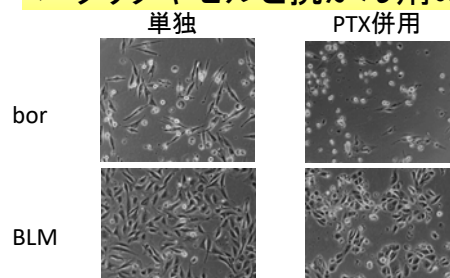
画像解析結果（形態観察） 各薬剤単独適用時



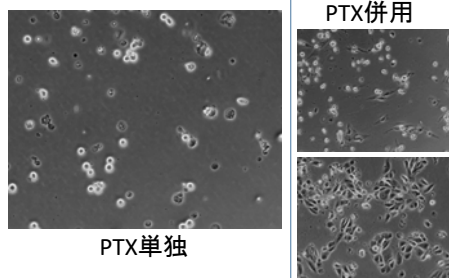
MTTアッセイ結果（ミトコンドリア変性） パクリタキセルと抗がん剤の併用



画像解析結果（形態観察） パクリタキセルと抗がん剤の併用



画像解析結果（形態観察） パクリタキセルと抗がん剤の併用



考察

- 15d-PGJ₂、パクリタキセルともに相乗効果を示す新たな薬はない

15d-PGJ₂と相乗効果を持つ抗がん剤は
トポイソメラーゼ阻害剤のみである

腎細胞がん細胞Caki-2において分子標的薬
ボルテゾミブは単独で抗腫瘍効果を示す。

考察

- 15d-PGJ₂、パクリタキセルともに相乗効果を示す新たな薬はない

- 腎細胞がん細胞Caki-2において分子標的薬
ボルテゾミブは単独で抗腫瘍効果を示す。

考察

分子標的薬ボルテゾミブがCaki-2に対する効果を示す

がん細胞のみを攻撃できる

副作用の低減

今後の展望

15d-PGJ₂とトポイソメラーゼ阻害剤の相乗効果は
がん抑制遺伝子vhlの状態に依存するか

■がん抑制遺伝子vhl

腎がん罹患者の約4割で変異が見られる。
この遺伝子の変異が神経、腎臓、精巣、膵臓などの
がん発症の最大の原因の一つとなる。

vhl遺伝子の変異の有無に依存するか

同じ治療がvhlの状態が異なる患者に効くか

多くの人に対して**有効な治療法の開発**の契機

謝辞

姫路獨協大学薬学部医療薬学科

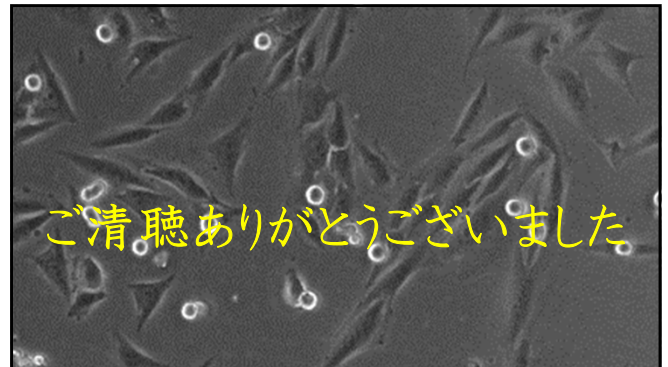
矢上 達郎 教授

生理学研究室スタッフの皆様

兵庫県立神戸高校教諭

野々村 宙 先生

同行して下さった先生方

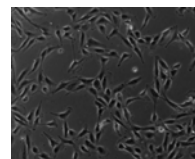


補足説明

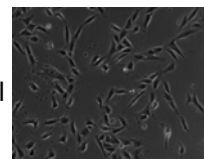
- 各薬剤(9種)実験結果(形態・MTT)
- 各薬剤の作用機序の詳細
- 副作用は絶対悪か
- 厳密な相乗効果とは
- 15d-PGJ₂の代謝経路
- 15d-PGJ₂周辺の話
- 今後使用予定の細胞
- MTTアッセイについて

Erlotinib

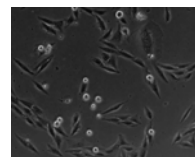
エルロチニブ単体ではあまり効果は見られないが、Jが加わると細胞死を引き起こしている。相乗的ではない。



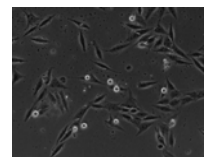
control



erl



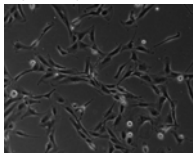
J



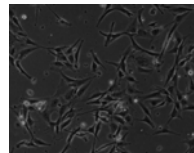
erl+J

Rapamycin

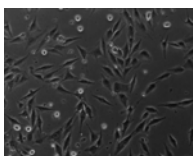
薬物による効果はあまり見られない。J単独の方が薬物併用より効果があると考えられる。



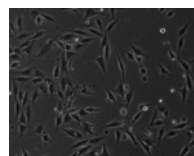
control



rap



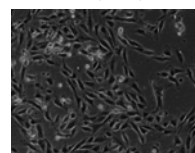
J



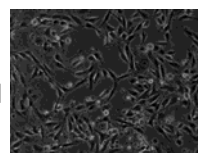
rap+J

6-Mercaptopurine

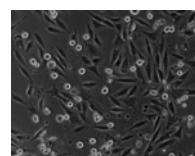
薬物による効果はあまり見られない。Jによる細胞死だと考えられる。



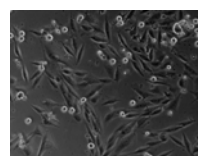
control



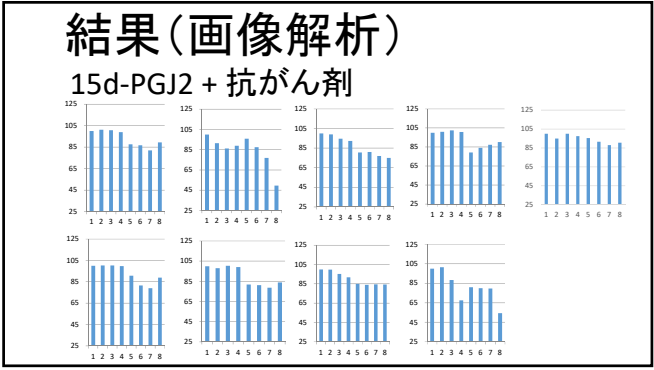
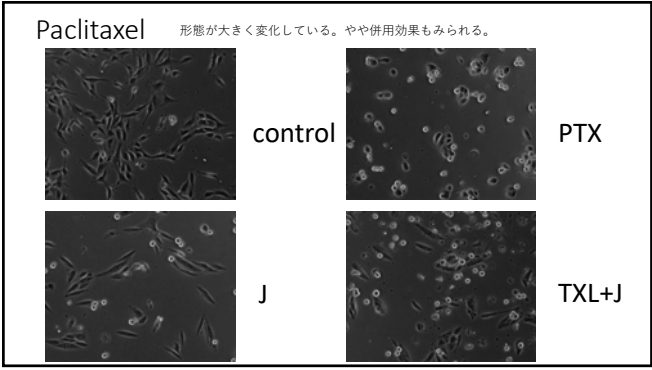
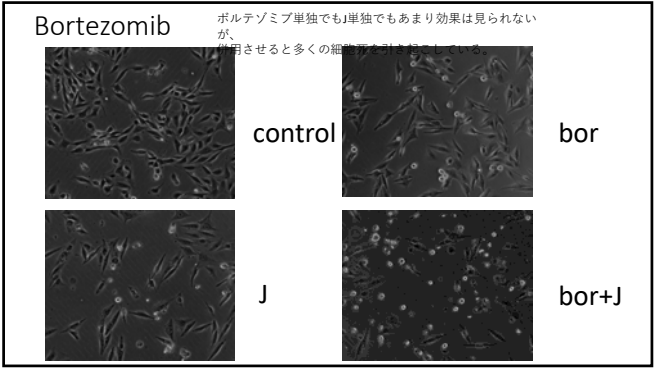
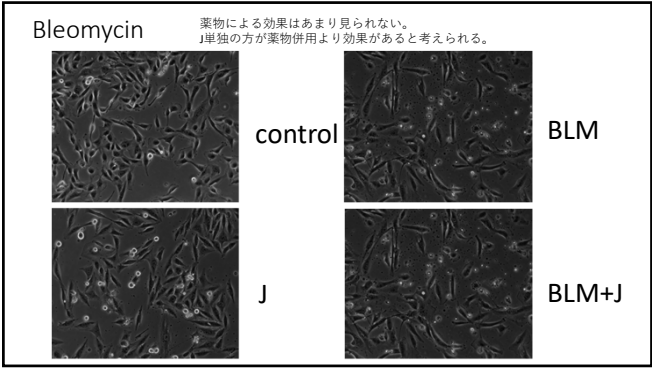
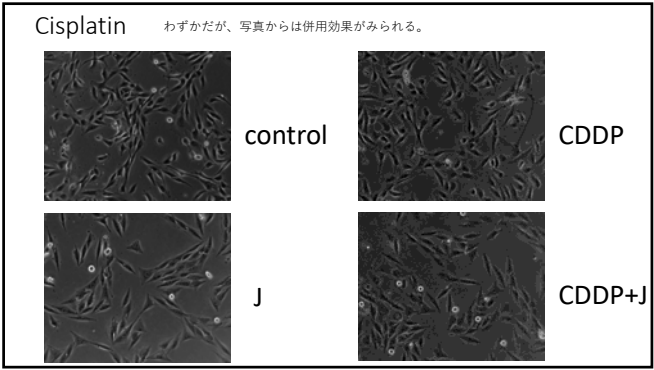
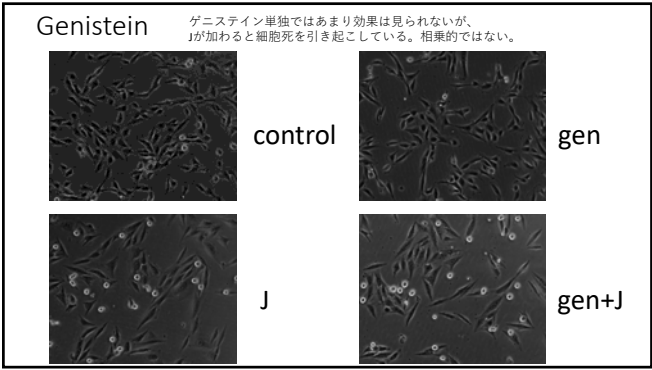
6MP



J

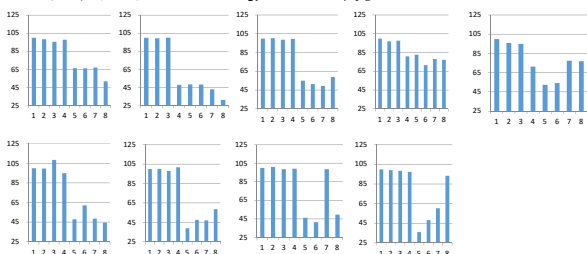


6MP+J

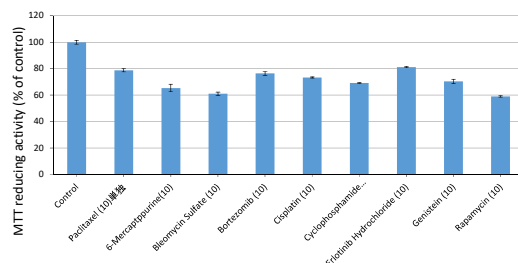


結果(画像解析)

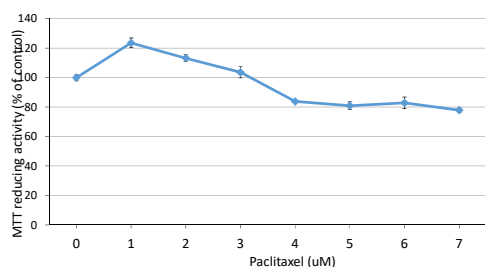
パクリタキセル + 抗がん剤



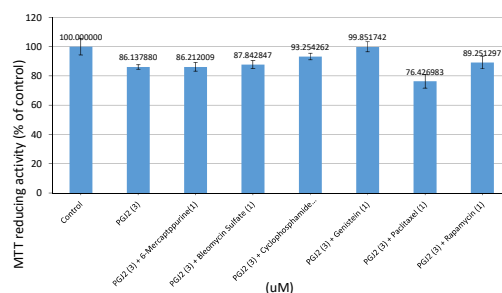
結果



結果



結果



MTTアッセイ結果 (ミトコンドリア変性)

15d-PGJ₂と抗がん剤の併用

bor濃度	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
0.10 μM	0.558	72.2	0.576	74.9
1.0 μM	0.532	69.5	0.547	71.4
10 μM	0.541	70.7	0.519	68.0

表: 15d-PGJ₂とボルテゾミブのMTTアッセイ結果と生存率

MTTアッセイ結果 (ミトコンドリア変性)

15d-PGJ₂と抗がん剤の併用

BLM濃度	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
0.10 μM	0.804	84.3	0.726	76.5
1.0 μM	0.796	83.6	0.671	71.0
10 μM	0.611	65.1	0.765	80.4

表: 15d-PGJ₂とブレオマイシンのMTTアッセイ結果と生存率

MTTアッセイ結果（ミトコンドリア変性） 15d-PGJ₂と抗がん剤の併用

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

表：15d-PGJ₂とパクリタキセルのMTTアッセイ結果と生存率

画像解析結果（形態観察） 15d-PGJ₂と抗がん剤の併用

	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		

MTTアッセイ結果（ミトコンドリア変性） パクリタキセルと抗がん剤の併用

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

表：パクリタキセルとボルテゾミブのMTTアッセイ結果と生存率

MTTアッセイ結果（ミトコンドリア変性） パクリタキセルと抗がん剤の併用

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

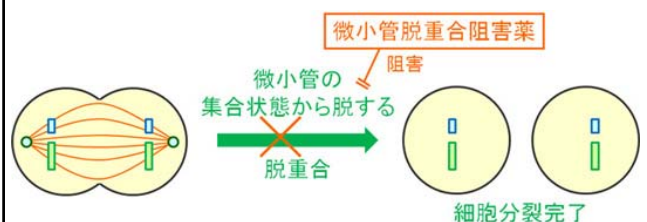
表：パクリタキセルとブレオマイシンのMTTアッセイ結果と生存率

画像解析結果（形態観察） パクリタキセルと抗がん剤の併用

	PTX 0 μM			PTX 20 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	93.9	93.0	92.3	87.5	93.7	86.4
	92.9			89.2		

微小管阻害薬

- 微小管の働きを阻害することで、染色体の分配を阻害し、増殖を抑える抗がん剤。



分子標的薬

•がん特有の分子を標的とし、副作用が少ない

従来の抗がん剤

分子標的薬

全ての細胞の増殖を抑制

癌細胞に特有の分子を認識して増殖を抑制

正常細胞

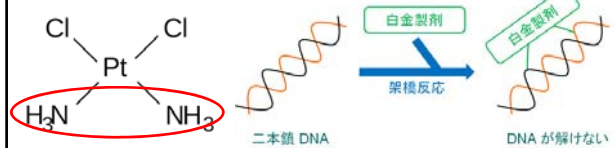
がん細胞

正常細胞

がん細胞

白金(プラチナ)製剤

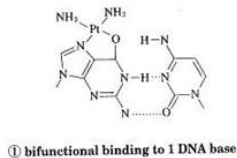
•DNAの二本鎖のグアニン・アデニンをアルキル基で結合し、二重らせんがほどけるのを防ぎ、分裂を停止する(架橋反応)。



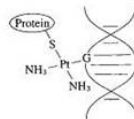
【白金製剤】



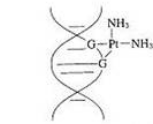
cisplatin



① bifunctional binding to 1 DNA base



② DNA-protein crosslink



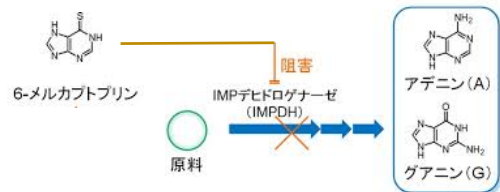
③ intrastrand crosslink



④ interstrand crosslink

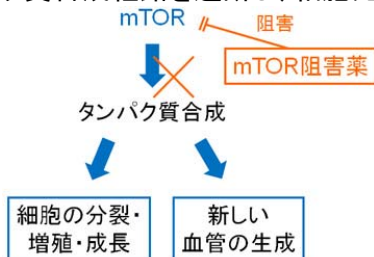
代謝拮抗薬

DNAの構成材料であるプリン塩基やピリミジン塩基を装い、細胞周期のS期において、これらの物質のDNAへの取り込みを妨げ、分裂を停止させる。



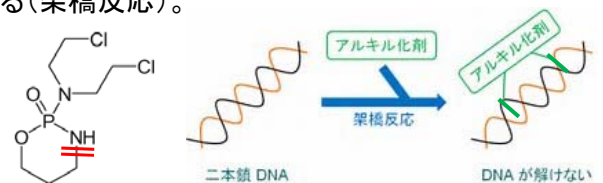
mTOR阻害剤

•タンパク質合成経路を遮断し、細胞死を誘導する。

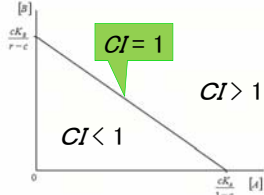


アルキル化剤

•DNAの二本鎖のグアニンをアルキル基で結合し、二重らせんがほどけるのを防ぎ、分裂を停止する(架橋反応)。



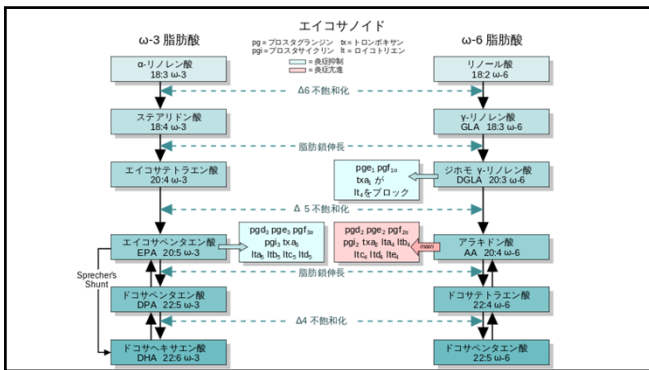
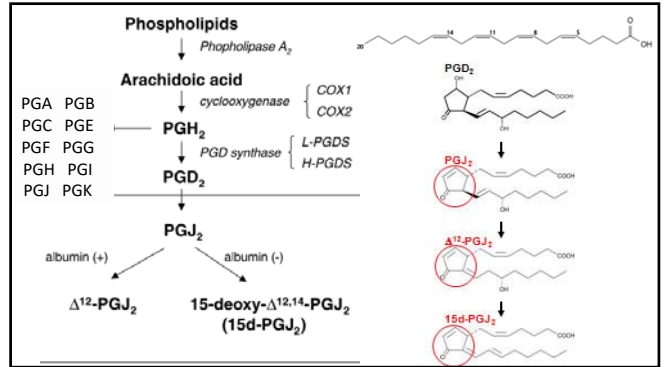
相乗効果とは



$$CI = \frac{[A']}{[A]} + \frac{[B']}{[B]}$$

[A]: A単独の用量
[B]: B単独の用量
[A']: AB併用時の
Aの用量
[B']: AB併用時の
Bの用量

図2 同一反応値を現示する2薬物の配合関係(相加効果の場合)
薬物Aと薬物Bとを併用し一定の反応値を現示させるための各薬物用量の関係は $\frac{1-c}{cK_A} [A] + \frac{1-c}{cK_B} [B] = 1$ である。これを平面に描くと、横軸切片が $\frac{cK_A}{1-c}$ 、縦軸切片が $\frac{cK_B}{1-c}$ の直線となる。



15d-PGJ₂ 周辺の話

15d-PGJ2は

低濃度では細胞保護、高濃度では細胞死誘導

アルブミン非存在下でプロスタグランジンJ₂から代謝

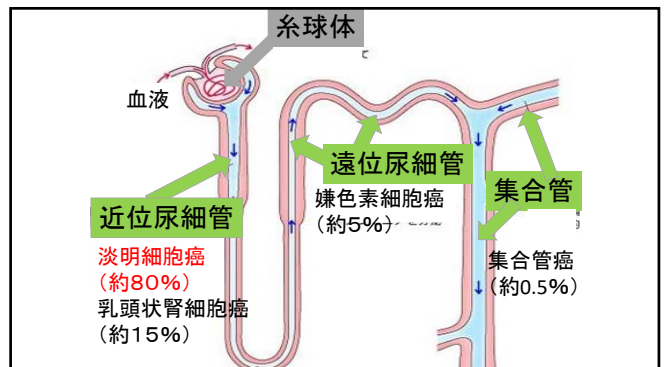
※アルブミン:微量元素・脂肪酸運搬、薬・ホルモン運搬などを担う血中成分

プロスタグランジンは

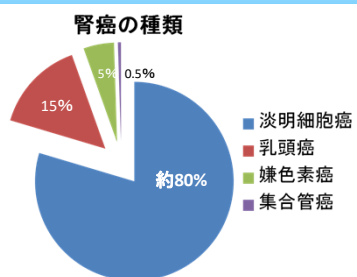
種類によって血圧低下、血小板凝集、血小板合成阻害、睡眠誘発、動脈管開存、末梢血管拡張、発熱・痛覚伝達、骨新生・骨吸収、黄体退化、子宮収縮、平滑筋収縮、眼圧効果などの効果を持つ。アスピリンや避妊薬の作用対象である。

使用予定の細胞とvhl遺伝子の状態

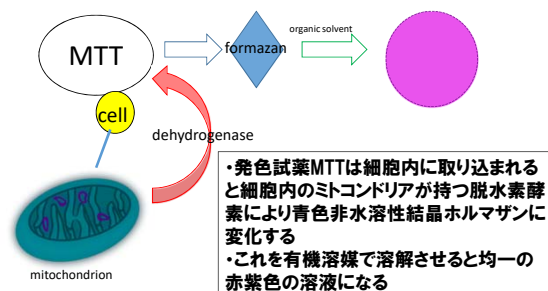
	<i>vhI</i> の状態
Caki-1	正常
Caki-2	欠損
ACHN	正常
RCC-4(-/-)	欠損
RCC-4(+/+)	正常(本来欠損している細胞に <i>vhI</i> を導入)
786-O	欠損



背景② 腎癌概要抵抗性症状等



MTT Assay



3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, yellow tetrazole)

