

ヒト腎癌細胞に対する抗癌剤の効果 -15d-PGJ2 と DOX の相乗効果の検証-

久保美知華、里井俊太、島田愛理、田中涼葉、田村佳織、日向優太、山本健裕 (兵庫県立神戸高等学校 総合理学科2年)

導入

腎細胞癌は癌全体の約2%を占める癌であり、その約8割は淡色細胞癌である。一般的な抗癌剤を用いた化学療法に抵抗性を示し、予後も悪いため、新しい治療法の確立が求められている。一方、内因性抗癌剤である15d-PGJ2はトポイソメラーゼIIを阻害することが知られてきた。そこで、抗癌性抗生物質を用い、腎癌細胞に対する抗癌剤の相乗効果を検証した。

目的

内因性抗癌剤である15d-PGJ2と抗癌性抗生物質であるドキソルビシン(DOX)を用いて、ヒト腎癌淡明細胞株であるCaki-2に対する抗癌剤の相乗効果をインビトロで検証する。

方法

1. 冷凍保存したCaki-2を37°Cで解凍し、シャーレの培地(RPMI1640、10%胎児ウシ血清入り)に移し、インキュベーター(CO₂濃度5%、37°C)内で培養した。
2. 1週間後トリプシン処理しシャーレの底面から細胞を剥がし、 1.0×10^5 cells/cm²の密度で24wellプレートに播種し、更に24h培養した。
3. 各wellの培養液を抗癌剤(DOXのみ、DOX+PGJ₂)入りの培地に置換し、1日、2日培養後に抗癌活性を評価した。
4. 抗癌活性は、細胞の形態、MTTアッセイ、クロマチン凝集およびPI染色を指標とした。

抗癌剤

- ドキソルビシン (DOX)** ……腫瘍細胞のDNAと複合体を形成することによって、DNA polymerase や RNA polymerase 反応を阻害し、DNA複製、RNAの合成、ひいては蛋白合成を阻害し、腫瘍細胞の増殖を抑制する。
- 15-デオキシ-Δ12,14-プロスタグランジン J2 (15d-PGJ2)** ……多くの腫瘍細胞でアポトーシスを誘導する内因性抗癌剤。トポイソメラーゼIIを阻害する。

- ※ V1(PBS) ……DOXの溶媒として用いるリン酸塩緩衝液PBSを用いた対照群
- ※ V2(酢酸メチル) ……15d-PGJ2の溶媒として用いる酢酸メチルを用いた対照群

測定方法の原理

●**MTTアッセイ**: MTTは細胞内のミトコンドリアの酵素によってホルマゼンという赤紫色の難溶性物質に還元される。これをDMSOに溶かし570nmにおける吸光度を測定する。抗癌剤の溶媒を適用したControl群での吸光度を100%とすることにより抗癌剤適用群での細胞生存率を評価する。

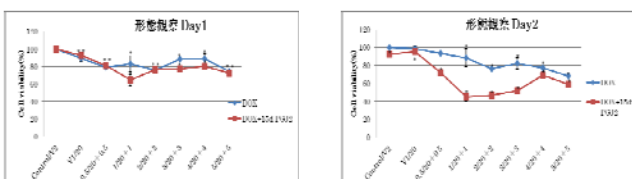
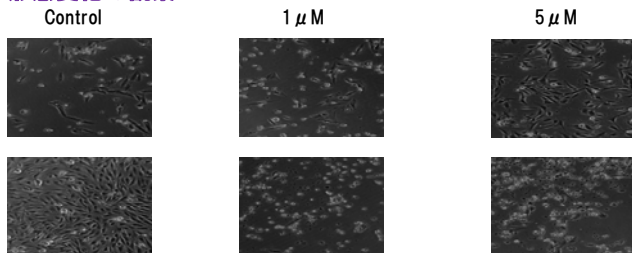
●**クロマチン凝集**: アポトーシスが報告されており、その指標の一つとしてクロマチン凝集が知られている。Hoechst33342(核酸染色色素でUVで蛍光を発する物質)で癌細胞を染色し、蛍光顕微鏡下で観察し、クロマチンが凝集している細胞の割合を出す。

●**PI染色**: 蛍光核酸染色色素で、DNAの二重螺旋構造に介入することにより、特有の赤色蛍光が増強される。一般に生細胞の細胞膜は透過せず、死細胞にのみ入り込み核内のDNAに介入し赤色蛍光を発するため、死細胞染色色素として利用される。

結果

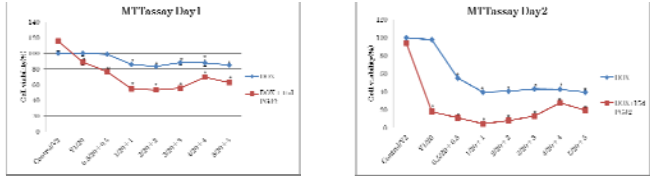
各濃度条件n=3で実験を行ってグラフ化した。縦軸は対照群(Control)を100とした場合の細胞生存率の相対値である。(mean±SEM、*は対照群と有意差ありp<0.05)写真は上が1日目、下が2日目の様子を表している。

形態変化の観察



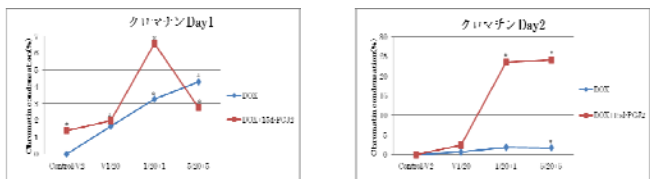
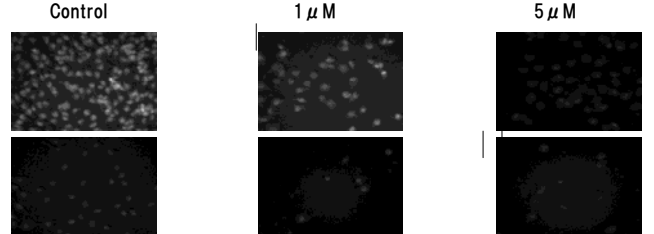
結果: 相乗効果は1 μMで強く認められ、濃度依存性は見られなかった。

MTTアッセイ



結果: 相乗効果は1 μMで強く認められ、濃度依存性は見られなかった。クロマチン凝集

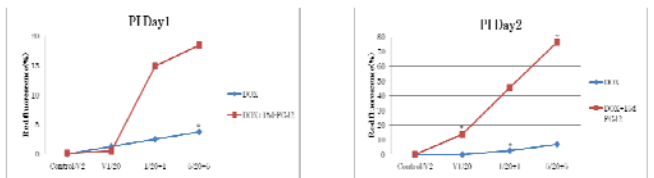
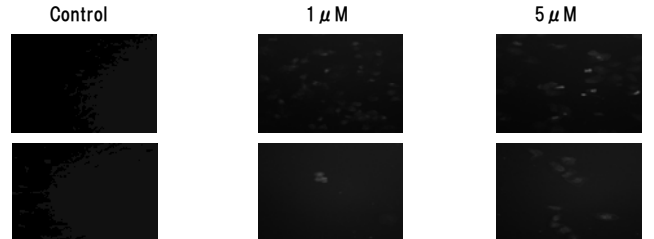
全細胞のうち蛍光を発している(クロマチン凝集している)割合を計算した。



結果: 1日目は1 μMで相乗効果が強く認められ、2日目は濃度依存的に相乗効果が認められた。

PI染色

全細胞のうち蛍光を発している(PI染色された)割合を計算した。



結果: 相乗効果が濃度依存的に認められた。

考察

PGJ2単独適用での効果よりも併用の場合の効果が上回ったため、DOXと15d-PGJ2の相乗効果が確認できた。その理由としては、PGJ2とDOXの作用機序に相違点があり、より多くの細胞に作用する事ができたためと考えられる。

今後の実験方針

- ・DOXについて、5 μM以降も15d-PGJ2との相乗効果も測定し、DOXを併用する際の最適濃度を検証してみる。またクロマチン凝集、PI染色ではDOXの濃度設定をより細かく設定することを試してみたい。
- ・DOXの濃度設定を一定にし、15d-PGJ2がDOXに与える影響を検証してみる。

謝辞

本研究を進めるにあたり、私たちの実験に協力して頂いた姫路獨協大学薬学部矢上教授と、矢上研究室の方々により感謝申し上げます。

参考文献

- ・Yamamoto et al., 15-Deoxy-Δ12,14 prostaglandin J₂ enhanced the anti-tumor activity of camptothecin against renal cell carcinoma independently of topoisomerase-II and PPARγ pathways, Biochem Biophys Res Commun 2011;410(3):563-567
- ・腎癌のすべて(メジカルビュー社)
- ・今日の治療薬2012 解説と便覧(南江堂)