

15 デオキシ- Δ 12,14 -プロスタグランジン J2 はトポイソメラーゼ II 阻害剤の抗癌作用を亢進する

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

腎癌細胞は全癌の約2%を占め、一般的な抗癌剤に対し抵抗性を示すことが知られている。

昨年の研究では、腎癌細胞はインビトロにおいては主な抗癌剤に対して抵抗性を示さないことが確認された。

目的

昨年の結果から、高濃度、長期暴露でより効果を示すだろうと考えられた。しかし、同程度の薬効を得るためには腎癌細胞ではより高濃度の抗癌剤が必要であり、この場合副作用が懸念される。

そこで、我々は抗癌剤を併用することでこれを克服しようと考えた。

方法

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。

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、 1.0×10^4 cells/cm² の密度で24well プレートに播種し、更に 24h 培養した。

各 well の培養液を抗癌剤(VP-16 のみ、VP-16+PGJ2、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。

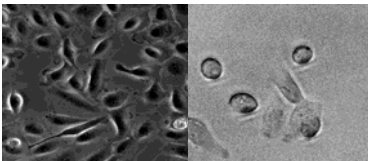
4.抗癌活性は、細胞の形態、MTT アッセイ、クロマチン凝集、PI 染色およびカスパーゼ活性を指標とした。

抗癌剤

- ドキシロピシン(DOX)**・・・DNA を切断した後、トポイソメラーゼ II と複合体を形成。DNA 再結合を阻害。結果的に DNA の複製障害を起こす。
- エトポシド(VP-16)**・・・DNA を切断した後、トポイソメラーゼ II と複合体を形成。DNA 再結合を阻害。結果的に DNA の複製障害を起こす。
- 15-デオキシ- Δ 12,14-プロスタグランジン J2(15d-PGJ2)**・・・内在性抗癌剤で、脂質代謝物で尿中に存在する。腎癌に対して抗癌作用を持ち、PPAR γ の内因性リガンドである。

測定方法の原理

- 形態観察**：細胞の形を見て判断した。判断基準は以下の写真に基づく。



写真の左側は生細胞、右側は変性細胞の例

- 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ザ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。

- クロマチン凝集**：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。

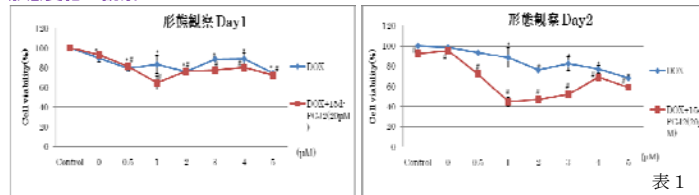
- PI 染色**：一般に生細胞の細胞膜は透過せず、死細胞にのみ入り込み核内の DNA の二重螺旋構造に介入し特有の赤色蛍光を発するため、死細胞染色色素として利用される。

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 \pm SEM、* は対照群と有意差あり p<0.05)。

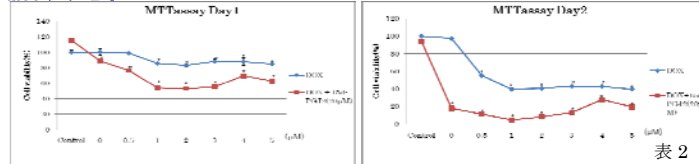
DOX を用いた結果

形態変化の観察



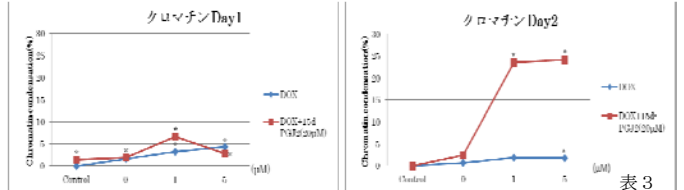
結果：相乗効果は 1 μ M で強く認められた。グラフはほぼ右肩下がりなので濃度依存性がみられた。

MTT アッセイ



結果：相乗効果は 1 μ M で強く認められた。グラフはほぼ右肩下がりなので濃度依存性がみられた。

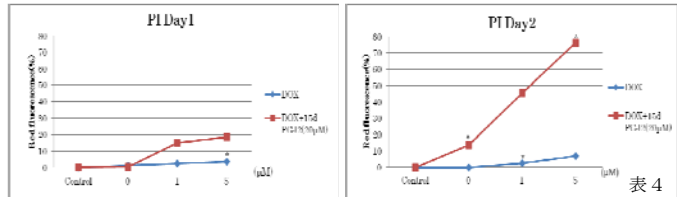
クロマチン凝集



結果：二日目の結果より相乗効果は強く認められた。グラフは右肩上がりなので濃度依存性がみられた。

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：二日目の結果より相乗効果は強く認められた。グラフは右肩上がりなので濃度依存性がみられた。

VP-16 を用いた結果

MTT アッセイ

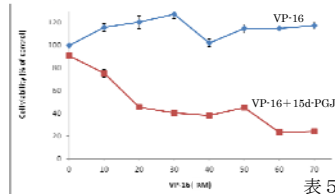


表 5

カスパーゼ活性

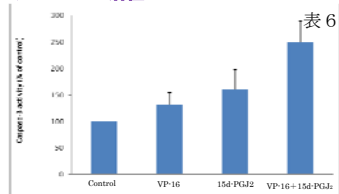


表 6

クロマチン凝集

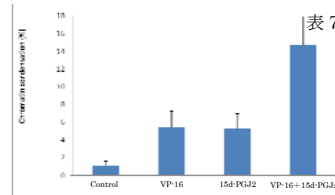


表 7

GW9662 との併用

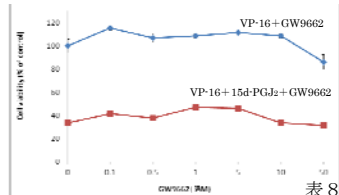


表 8

考察

- ・15d-PGJ2 と DOX, VP-16 との併用効果が確認されたことから、15d-PGJ2 とトポイソメラーゼ II 阻害剤の相乗効果があることが分かった。
- ・GW9662 による腎癌細胞の保護効果が確認できなかったことから、相乗効果は PPAR γ に非依存的であることが分かった。

今後の実験方針

- ・DOX と 15d-PGJ2 の併用においてカスパーゼ活性における検証と GW9662 との併用
- ・Catalase, VAS2870, DPI, Apocynin(抗酸化剤)の使用
- ・15d-PGJ2 のターゲットの特定

謝辞

本研究を進めるにあたり、私達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、矢上研究室の方々々に心より感謝申し上げます。

参考文献

- ・Yamamoto et al., 15-Deoxy- Δ 12,14 prostaglandin J₂ enhanced the anti-tumor activity of camptothecin against renal cell carcinoma independently of topoisomerase- II and PPAR γ 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)

・Hideki MIZUTANI, Mechanism of DNA Damage and Apoptosis Induced by Anticancer Drugs through Generation of Reactive Oxygen Species, YAKUGAKU ZASSHI 127(11) 1837-1842(2007)©2007 The Pharmaceutical Society of Japan