

# 腎癌細胞に対する抗癌剤の併用効果

## — 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 学年

腎臓癌はインビボ（生体内）では化学療法に対し抵抗性を示すが、昨年の研究ではインビトロ（血清培養系）において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ため、高濃度・長期暴露でより効果を示すだろうと考えられた。しかしインビボ適用の場合に副作用などの弊害が出る可能性が大きいため短期間で効果を得るために 2 種の抗癌剤の併用を考えた。腎臓癌細胞として昨年と同様に Caki-2 を用い、抗癌剤 15-デオキシ- $\Delta$ 12, 14-プロスタグランジン (15d-PGJ2)、ドキソルビシン (DOX) のそれぞれ単独での抗癌活性と 2 種の併用による相乗効果を評価した。次に追加実験として新たにエトポシド (VP-16) を加え、単独での抗癌活性・15d-PGJ2 との併用効果を評価した。抗癌活性は、細胞の形態変化観察, MTT アッセイ, クロマチン凝集, PI 染色および Caspase 活性を指標に評価した。

### 1. はじめに

国内の死因の第 1 位は「がん」である。さまざまな「がん」の中で、腎臓癌は罹患率・死亡率ともに年々増加傾向にある。また、腎臓癌のほとんどが化学療法に対し抵抗性を示すことが問題となっている。腎臓癌に対し化学療法が奏効しない理由の一つに、インビボで抗癌剤に対するヒト腎臓癌細胞の低感受性が示唆されている。

我々は、昨年の結果よりさらに大きな効果を示すと考えられる抗癌剤の相乗効果を検証した。

### 2. 目的

腎臓癌の中で約 8 割を占める「淡明細胞癌」由来のヒト腎臓癌細胞株である Caki-2 に対して、抗癌剤としてトポイソメラーゼ II 阻害薬 (DOX) と腎臓癌部まで到達でき、細胞毒性を有する物質 (15d-PGJ2) を用い、ヒト腎臓癌細胞の抗癌剤に対する抵抗性と 2 種の併用による相乗効果をインビトロで検証した。

### 3. 方法

#### 3.1 実験手順

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 (FBS) 入り) に移し、CO<sub>2</sub> インキュベーター (CO<sub>2</sub> 濃度 5%、37°C) 内で培養した。

1 週間後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、 $1.0 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> の密度で 24well 培養プレートに播種した。24h 培養した後に、各 well の培養液を抗癌剤 (DOX のみ、DOX + 15d-PGJ2) 入りの培地に置換して、1 日、2 日培養後に抗癌活性と相乗効果を評価した。

#### 3.2 抗癌剤について

今回の実験で用いた抗癌剤は以下の 3 種類である。これらはすべて一般的な癌治療に広く用いられている抗癌剤である。

●15-デオキシ- $\Delta$ 12, 14-プロスタグランジン (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。PPAR $\gamma$  の内因性リガンドである。

●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、トポイソメラーゼ II 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。

●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。

またこれらの抗癌剤は以下で述べるような溶媒に溶かして用いた。

PBS・・・DOX、VP16 の溶媒に用いるリン酸塩緩衝液。  
酢酸メチル・・・15d-PGJ2 の溶媒。

#### 3.3 抗癌活性の測定法

抗癌活性は、細胞の顕微鏡観察、MTT アッセイ、クロマチン凝集、PI 染色および caspase 活性を指標とした。

##### 3.3.1 形態観察について

プレートの Well 内で培養した無処理のヒト腎臓癌細胞を倒立顕微鏡をもちいて、抗癌剤による細胞の形態変化を観察・撮影した。通常 Caki-2 の生細胞は、プレートの底に接着しながら増殖し、細長い形態となっているが、変性細胞は接着が弱く底から剥がれてくるので丸い形態となる (図 1)。

この基準に基づき、それぞれの細胞数をカウントして変性細胞率 (%) を求めた。

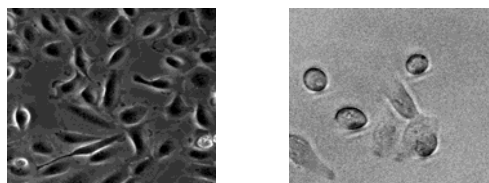


図 1 (左) 生細胞 (Caki-2)、(右) 変性細胞 (Caki-2)

##### 3.3.2 MTT アッセイについて

MTT アッセイは比色法の一つであり、吸光度によって細胞の生存率を調べる方法である。

水溶性の発色試薬である MTT (C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>BrN<sub>5</sub>S、4,5-di-Methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl Tetrazolium

bromide, yellow Tetrazole)は細胞内に取り込まれると、細胞内のミトコンドリア中にある脱水素酵素の働きにより、水に不溶のホルマザンという物質に変化する。これをDMSO(有機溶媒)などで溶解させ、よく混ぜると均一の赤紫色の溶液となる。細胞活動が活発な場合はミトコンドリアの酵素活性が高いのでこの変化が進むが、細胞が弱っている場合はあまり起こらず、細胞が死んでいる場合はほとんど起こらない。つまり、生細胞が多いほど赤紫色が濃いことになる。視覚的にも、図2のプレートでは左側の色が薄く、右にいくにつれて濃くなっているため、左側の細胞の方が死んでいるということがわかるが、プレートリーダーを用いて各wellの吸光度の値を測定する。

様々な濃度の抗癌剤を適用してMTTアッセイをかけることにより、抗癌剤が濃度依存的に細胞毒性を示すことを確認することができる。

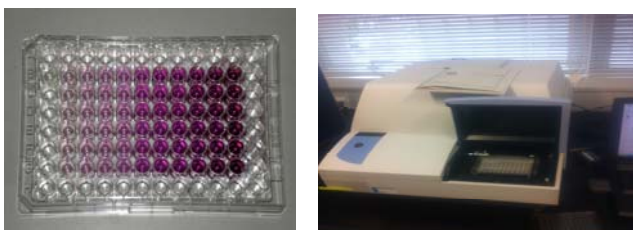


図2 (左) 処理後のプレート、(右) プレートリーダー

### 3.3.3 クロマチン凝集について

抗癌剤により誘導される細胞死に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。Hoechst (ヘキスト) 33342 という核酸染色色素で、UVを当てると蛍光を発する物質を用いて、ヒト腎癌細胞を染色してから蛍光顕微鏡下で観察・撮影し、クロマチン凝集している細胞(核が蛍光を強く発している細胞)の割合を出した。図4より変性細胞の生細胞よりも強く光っているのがクロマチン凝集である。



図3 蛍光顕微鏡を用いたクロマチン凝集の観察

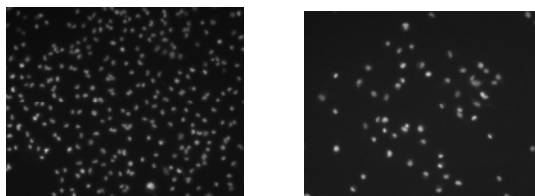


図4 生細胞(左)と変性細胞(右)の写真の比較

### 3.3.4 PI (Propidium iodide) 染色について

蛍光核酸染色色素で、死細胞にのみDNAの二重らせん構造に介入し赤色蛍光を発するため、UVを照射したとき蛍光を示す細胞が死細胞と判断する。

### 3.3.5 Caspase活性について

Caspaseは基質となる分子のアスパラギン酸からN末端側3つ目までの4アミノ酸配列を認識してアスパラギン酸のC末側で切断するという性質を用いて、Caspaseの活性を調べる。

## 4. 実験1 DOXを用いた実験

### 4.1 条件設定

各抗癌剤の濃度設定は、参考文献や論文検索の結果に基づき、以下のように設定した。

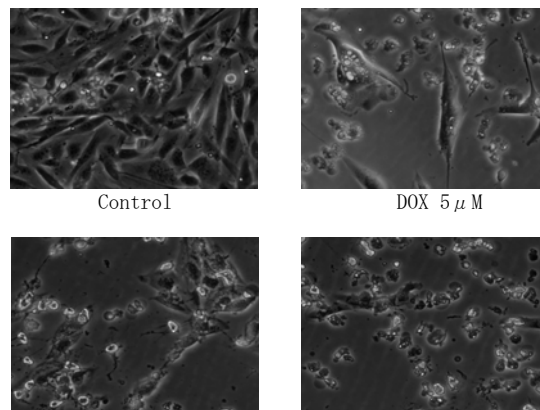
- DOX 単独適用・・・0.5, 1, 2, 3, 4, 5  $\mu$ M
- DOX+15d-PGJ2 併用・・・<DOX>0.5, 1, 2, 3, 4, 5  $\mu$ M+<15d-PGJ2>20  $\mu$ M

濃度依存性および併用時の相乗効果について評価した。抗癌活性の測定は抗癌剤適用後1日目および2日目のデータをとることとした。

結果を示すにあたり、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(形態観察、MTTアッセイ)または死細胞率(クロマチン凝集、PI染色)の相対値である。(mean $\pm$ SEM、\*は対照群と有意差ありp<0.05)

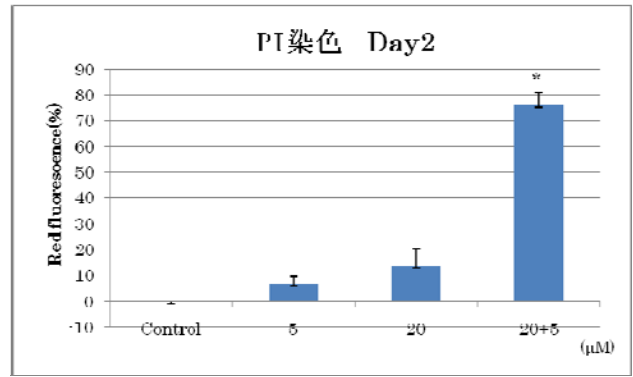
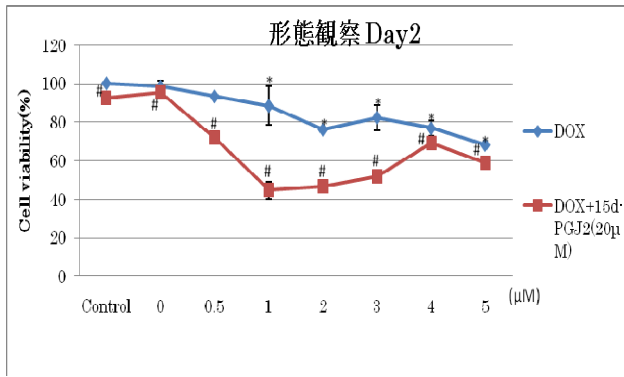
### 4.2.1 結果(形態観察)

単独適用、併用のどちらにおいても形態変化が観察された。特に併用のDOX1  $\mu$ Mのときcontrolに比べて、細胞数が減少するとともに、変性細胞が大半を占めているのが観察された(図5)。また単独・併用ともにグラフがほぼ右肩下がりなので濃度依存性がみられる。



15d-PGJ2 20  $\mu$ M      15d-PGJ2 20  $\mu$ M+DOX 5  $\mu$ M

図5 形態観察結果 (2日目)



#### 4.2.2 結果 (MTT アッセイ)

特に併用の 1 μM において強い相乗効果がみられる。また、単独・併用ともにグラフが右肩下がりとなっているので濃度依存性がみられる (図 6)。

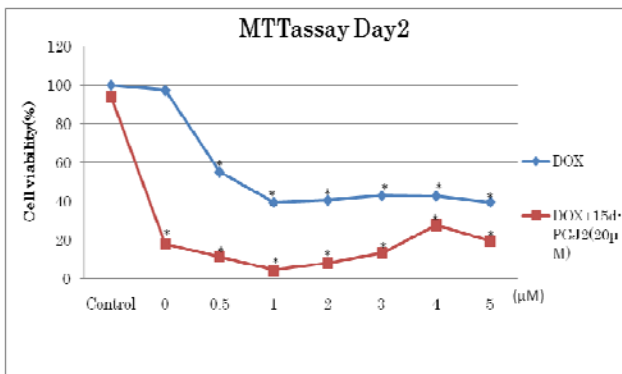


図 6

#### 4.2.3 結果 (クロマチン凝集)

2 日目の結果より相乗効果は強く認められた。また単独・併用ともにグラフは右肩上がりなので濃度依存性がみられる (図 7)。

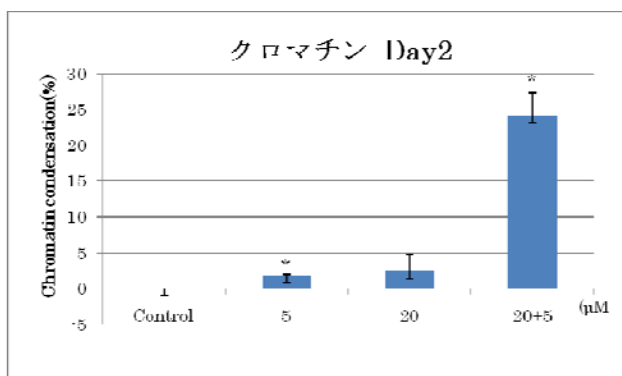


図 7

#### 4.2.4 結果 (PI 染色)

2 日目の結果より相乗効果は強く認められた。また単独・併用ともにグラフは右肩上がりなので濃度依存性がみられる (図 8)。

#### 4.3 考察

実験 1 で得られた形態観察、MTT アッセイ、クロマチン凝集、PI 染色の 4 つの指標の結果をまとめると、DOX 単独での効果を 15d-PGJ2 併用での効果が上回ったため、相乗効果が確認できた。相乗効果が生じた理由として、DOX と 15d-PGJ2 の作用機序に相違点があり、より多くの癌細胞に作用することができたためと考えられる。また、単独・併用ともに濃度依存性が確認できた。

クロマチン凝集と PI 染色で 1 日目のデータが異なっていた理由として、写真で蛍光細胞とその他の細胞の区別が難しく、測定誤差が生じたためと考えられる。

#### 5. 実験 2 VP-16を用いた実験

##### 5.1 条件設定

DOX の代わりに、新たに VP-16 (エトポシド) を用いて単独適用での効果と 15d-PGJ2 との併用効果を調べた。濃度設定は以下のように設定した。

- VP-16 単独適用…0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 μM
- 15d-PGJ2 単独適用…20 μM
- VP-16 + 15d-PGJ2 併用…

<VP-16>0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 + <15d-PGJ2>20 μM

また、PPAR γ 阻害剤である GW9662 を併用し、15d-PGJ2 の作用機序に PPAR γ が関係しているかを調べた。濃度設定は以下のとおりである。

- VP-16 + 15d-PGJ2 + GW9662 併用…<VP-16>50 μM + <15d-PGJ2>20 μM + <GW9662>0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50 μM

この実験で抗癌活性の測定は、抗癌剤適用後 1 日目のデータをとった。

##### 5.2.1 結果 (MTT アッセイ)

青線は VP-16 単独適用、赤線は 15d-PGJ2 との併用である。単独適用時には、濃度依存性は見られない。併用時は、グラフの形から濃度依存性が見られる。また、2 つのグラフに大きな差があることから相乗効果が見られる (図 9)。

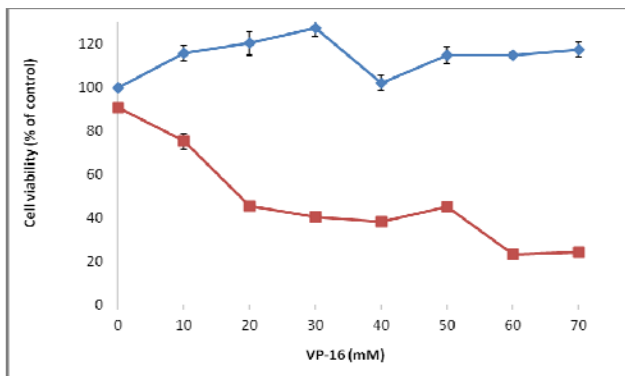


図 9

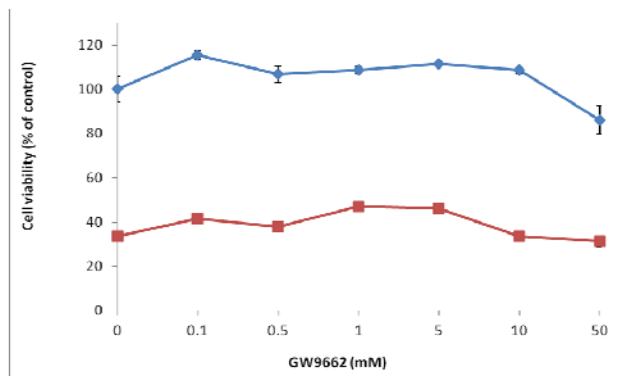


図 1 2

### 5. 2. 2 結果 (カスパーゼ活性)

VP-16, 15d-PGJ2 単独適用より、VP-16+15d-PGJ2 の併用時の方が Caspase-3 の働きが高くなっていることから相乗効果が見られる (図 1 0)。

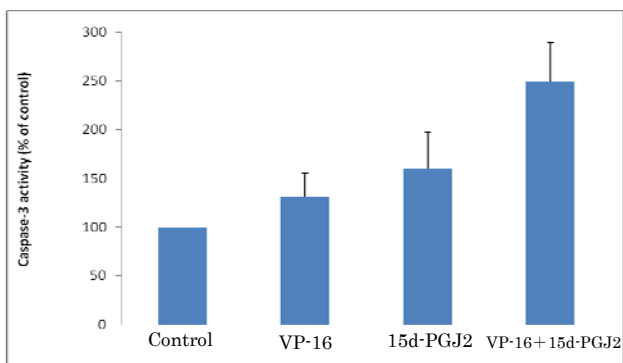


図 1 0

### 5. 2. 3 結果 (クロマチン凝集)

VP-16, 15d-PGJ2 の単独適用より併用時の方がクロマチン凝集を起こす割合が高くなっていることから相乗効果が見られる (図 1 1)。

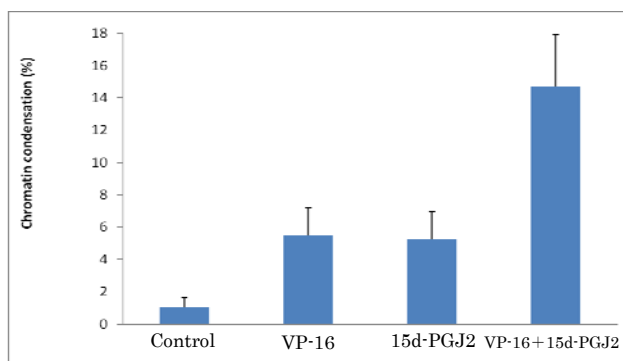


図 1 1

### 5. 2. 4 結果 (GW9662 との併用)

青線は GW9662 単独適用、赤線は VP-16+15d-PGJ2 +GW9662 の併用である。GW9662 は抗癌剤ではないので細胞生存率はほぼ 100%で横ばいである。VP-16 と 15d-PGJ2 を併用し、GW9662 の濃度を変化させても細胞生存率にはほぼ変化がない。(図)

### 実験結果からの考察

#### ①併用効果について

今回併用した DOX と VP-16 はトポイソメラーゼ阻害薬であることが知られている。この 2 種類とは違った作用機序で 15d-PGJ2 が細胞のアポトーシスを誘導したため、より多くの細胞に作用することが出来たのではないかと考えられる。よって、15d-PGJ2 とトポイソメラーゼ阻害薬に相乗作用が見られることがわかった。

#### ②PPAR $\gamma$ について

15d-PGJ2 と DOX, VP-16 の相乗作用に PPAR $\gamma$  が関係していると仮定し、PPAR $\gamma$  阻害剤である GW9662 を 15d-PGJ2 と併用したが、上記の結果から適用しても細胞生存率に差がほとんど見られなかったため、15d-PGJ2 と DOX, VP-16 の相乗作用に PPAR $\gamma$  が非依存的と考えられる。

### まとめ

実験 2 の変性細胞率や MTT アッセイの結果から、高濃度で、もしくは長期間に作用させれば、CPT、5-FU もヒト腎癌細胞に対して抗癌活性の効果を示すことが示された。

上記の 2 回の実験の結果から VP16、CPT、5-FU のすべての抗癌剤においてヒト腎癌細胞 Caki-2 に対して、濃度依存的な抗癌活性を検出することに成功した。このことから「化学療法に耐性を示すヒト腎癌細胞はインビトロで抗癌剤に抵抗性を示さない」ということが証明された。

### 7. 今後の実験方針

- ①Catalase, VAS2870, DPI, Apocynin の使用
- ②MDR (多剤耐性) 阻害剤の使用
- ③15d-PGJ2 のターゲットを特定

### 謝辞

今回の研究を進めるにあたり、私たちの実験に協力していただ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心より感謝申し上げます。

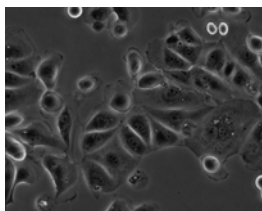
最後になりましたが、指導教官である楠本先生から様々なご指導をいただきました。心より感謝申し上げます。

### 参考文献

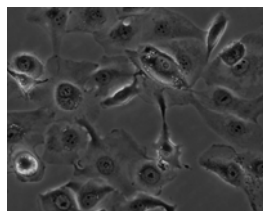
•Yamamoto et al., 15-Deoxy- $\Delta$ 12,14 prostaglandin J<sub>2</sub> enhanced the anti-tumor activity of camptothecin against renal cell carcinoma independently of topoisomerase- II and PPAR  $\gamma$  pathways, Biochem Biophys Res Commun 2011;410(3):563-567

• 今日の治療薬 2012 解説と便覧 (南江堂)

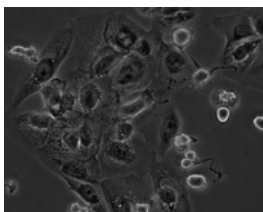
• 腎癌のすべて (メジカルビュー社)



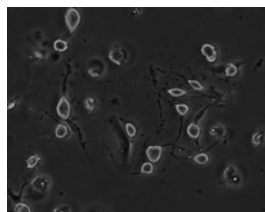
Control



VP-16



15d-PGJ2



15d-PGJ2+VP-16

図6 形態観察結果 (VP-16と15d-PGJ2の場合)