

平成 22 年 5 月 27 日現在

研究種目：若手研究 (B)
研究期間：2007～2009
課題番号：19790960
研究課題名 (和文) 膵癌ミトコンドリア DNA 体細胞変異は抗癌剤耐性を示す
(オーダーメイド医療への道)
研究課題名 (英文) Mutations in the mitochondrial genome confer resistance of cancer
cells to anticancer drugs
研究代表者
水谷 聡 (MIZUTANI SATOSHI)
日本医科大学・医学部・助教
研究者番号 80398867

研究成果の概要 (和文)：

近年、癌細胞の抗癌剤に対する耐性の獲得に関して mtDNA の変異も関与していることが分かってきた。我々は、変異 mtDNA の意義を明らかにするために、癌細胞において mtDNA の変異が抗癌剤耐性に関与するかを、同一の細胞核をもち mtDNA のみが異なる癌細胞 (cybrid cell) を作成して検討した。staurosporine (STS) と 5FU, CDDP を作用させ薬剤に対する耐性を比較検討した。in vitro では STS 5 時間、5FU 48 時間、CDDP 24 時間作用させ、蛍光染色にて細胞死を計測した。in vivo でもヌードマウスに 5FU、CDDP を腹腔内投与し、移植腫瘍の増殖阻止率や massive cell death の領域の大きさを比較検討した。野生型 mtDNA 癌細胞と比較して有意に変異 mtDNA 癌細胞の抗癌剤耐性が確認できた。さらにその機序を分子生物学的に検討した。はじめにフローサイトメトリーにおいても薬剤による細胞死が Apoptosis であることを確認した。さらにミトコンドリアからのチトクロム c の放出を比較検討した。カスパーゼ活性について pro caspase3、PARP など検討し、変異型 mtDNA 癌細胞の anti-Apoptosis を証明した。

研究成果の概要 (英文)：

It has been established that the majority of cancer cells harbor homoplasmic somatic mutations in the mitochondrial genome(mtDNA).We show that somatic mutations in mtDNA are involved in anticancer drug-tolerance.We used trans-mitochondrial hybrid cells (cybrids) to reveal the role of mutations in mtDNA in the pancreatic cancer by excluding any effects of the nuclear background.

Cybrids were constructed by repopulating HeLa devoid of mtDNA with mtDNA derived from enucleated the pancreatic cancer cells(CFPAC-1,CAPAN-2)harboring mtDNA mutations. We constructed several cybrids with mutations derived from the cancer cells as well as those with wild mtDNA derived healthy individuals. We compared the mutant and wild cybrids in resistance against staurosporine(STS), 5FU, CDDP in vitro.

The experiment revealed mutant cybrids were more resistant against the drugs than wild

cybrids except hyperthermia. Next, Sub-G1 populations were examined to estimate nuclear DNA fragmentation during apoptosis. STS treatment increased Sub-G1 populations more greatly in wild cybrids than in mutant cybrids. Notably, an inhibitor of cytochrome c oxidase prevented the increase in Sub-G1 population of wild cybrids with STS, suggesting respiratory chain activity is involved in STS-induced apoptosis. Furthermore, we investigated cytochrome c release from mitochondria by immunostaining. Most cells of wild cybrid lost membrane potential and were stained with anti-cytochrome c antibody, indicating cytochrome c release to the cytosol. In contrast, mutant cybrids maintained mitochondrial membrane potential and co-localization of cytochrome c. These results indicate that mtDNA mutations of the pancreatic cancer inhibit cytochrome c-dependent apoptosis.

Our results demonstrate that mtDNA mutations can confer chemoresistance on cancer cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	500,000	0	500,000
2008年度	500,000	150,000	650,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	1,500,000	300,000	1,800,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：ミトコンドリア DNA、癌、抗癌剤耐性

1. 研究開始当初の背景

各種癌においてミトコンドリア DNA(mtDNA)の変異が高頻度に認められている。臨床においても血液癌、固形癌にかかわらず抗癌剤耐性癌の mtDNA には感受性癌のそれと比較して変異が多数存在することが確認されている。さらに、(1) mtDNA を消失させた ρ0 細胞はアポトーシスに耐性になること、(2) 抗癌剤の種類によらず抗癌剤による細胞死の殆どがアポトーシス経路を通ること、(3) アポトーシスの遂行にミトコンドリアが重要な役割を果たしていることは周知のこととなっている。これらより抗癌剤耐性獲得の原因の1つに mtDNA の変異が関与していると考えた。mtDNA はわずか 13 種類の呼吸鎖蛋白質とそれに関連した RNA のみをコードしており、その役割が明確で

ある。また核 DNA と違い約 165000 塩基対とその長さから圧倒的に解析が容易であり、多数の mtDNA の変異分布に関する解析は臨床応用に大きく貢献すると考えられる。これらより本研究の構想として mtDNA の変異が癌細胞の抗癌剤感受性に及ぼす影響を細胞生物学的、分子生物学的に検討することとした。

2. 研究の目的

本課題の目的は mtDNA の変異によって癌細胞の抗癌剤感受性が変わること(耐性を持つ)を明らかにすることである。そのため mtDNA が全てシーケンスされている癌細胞において 遺伝子変異の有無で2つに分ける。次にこれら を由来として核

は同じでミトコンドリアのみが異なるcybrid細胞を多数作製する(右図参照)。これらに各種抗癌剤を作用させて、その感受性を調べる。アポトーシスを指標として形態学的観察、フローサイトメーター、チトクロムC局在、各カスパーゼ活性を検討する。更に耐性を持つ細胞群のmtDNAの変異の特徴(コードしている蛋白質やRNAの種類)を検討し、感受性に関与しているmtDNAの変異を特定する。次に特定した領域に変異を持つ癌細胞を集め(部分的なシーケンスを行うだけで可能)cybrid細胞を作製し、コントロール細胞と抗癌剤感受性を比較する。

3. 研究の方法

1. cybrid細胞のback groundの細胞生物学的検討と抗癌剤耐性に関する分子生物学的検討。

全mtDNAが解明され、変異(位置)が分かっている6種類の膵臓癌培養細胞(CFPAC1、CAPAN1、CAPAN2、BxPc3、AsPc1、Panc1)とHeLa細胞由来の $\rho 0$ 細胞とを細胞融合(cybrid)させクローニングし、cybrid細胞株を樹立した。コントロール細胞として、mtDNAが解明され変異を認めない線維芽細胞および血小板、計3種類と前述の $\rho 0$ 細胞とのcybrid細胞株を用いた。(各々2株、計18株:変異型mtDNA 12株、野生型mtDNA 6株)。またミスマッチPCR法によりcybridの成功を確認した。これらの細胞の細胞においてミトコンドリア以外の核や各種小器官、細胞生物学的な特徴に違いがないことを各種検査で検討する。

A) Cybrid細胞のBack Groundの検討

①呼吸活性 ②ミトコンドリア膜電位 ③細胞周期 FACSにて検討する。

④増殖速度 検鏡、ミスマッチPCR法で比較する。

→上記のcybrid細胞のうち数種類は検討完了しており、サンプル数(n)を増やしてでの検討に入る。

B) In vitroでの抗癌剤耐性の検討

スタウロスポリン(STS)、5-fluorouracil(5FU)、cisplatin(CDDP)を各々の細胞に作用させる。

① 蛍光顕微鏡によるapoptosis、細胞死

の算出(PI・Hoechst33342染色)

② FACSを用いたapoptosis細胞の算出(apoG1、PIなど)

③ Con-focal 蛍光顕微鏡を用いたチトクロムCの細胞質放出

④ カスパーゼ3活性の測定

2. In vivoにおける抗癌剤耐性の検討

(1) Bulbヌードマウスに各々のcybrid細胞を同数移植する。

(2) 癌由来cybrid細胞と健常組織由来cybrid細胞を同数ずつ混和し移植する。

① 腫瘍細胞移植と同時に5FU、CDDPを腹腔内投与開始し、定着した腫瘍を比較検討する。

② 移植後定着した腫瘍塊に5FU、CDDPを腹腔内投与し検討する。

検討項目

1) 体積 2) H-E染色像 3) TUNEL染色像による抗腫瘍効果(抗癌剤耐性)

4) ミスマッチPCR法による変異型、野生型mtDNA細胞の比率変化

2. 抗癌剤耐性を示すmtDNAの領域を特定する。

これまでの実験で抗癌剤耐性を示したmtDNAの変異を特定し(複数もしくは組み合わせなど)、その変異にて対して積極的にアプローチする。(トランスフェクションやsiRNAなどにより変異解消させ抗癌剤耐性を見る。

4. 研究成果

1) 予想通り、in vitro、in vivoの両方において、変異型mtDNA細胞は野生型mtDNA細胞より有意に抗癌剤耐性を示した。

2) 抗癌剤耐性機序はcytochrome c経路のアポトーシス耐性機序であることをつきとめた。

3) 酸化的リン酸化機構の破綻がアポトーシス耐性に起因することが判明した。

4) 以上の成果を論文、学会発表で報告できた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1件)

① Satoshi Mizutani, Yasuyuki Miyato, Yujiro Shidara, Sadamitsu Asoh, Akira

Tokunaga, Takashi Tajiri and Shigeo
Ohta. Mutations in the mitochondrial
genome confer resistance of cancer cells to
anti-cancer drugs. Cancer Science
100(9):1680-7. 2009 .

〔学会発表〕（計 5 件）

- ① 水谷 聡ほか.抗癌剤耐性とミトコンドリア DNA 体細胞変異の関連における分子生物学的検討.108 回日本外科学会 2008.5. 長崎
- ② 水谷 聡ほか.膵臓癌細胞の抗癌剤耐性とミトコンドリア DNA 体細胞変異の関連 63 回日本消化器外科学会 2008.07. 札幌
- ③ 水谷 聡ほか.膵臓癌ミトコンドリア DNA 体細胞変異による抗癌剤耐性獲得の分子生物学的検討。第 68 回日本癌学会。2009.10. 横浜
- ④ 水谷 聡ほか.膵臓癌由来のミトコンドリア DNA 変異は抗癌剤耐性を示す。第 20 回日本消化器癌発生学会。2009.11. 広島
- ⑤ 水谷 聡ほか.膵臓癌ミトコンドリア DNA 体細胞変異による抗癌剤耐性獲得の分子生物学的検討.第 71 回日本臨床外科学会。2009.11.京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水谷 聡 (MIZUTANI SATOSHI)
日本医科大学・医学部・助教
研究者番号：80398867

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし