

平成 22 年 5 月 11 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20791147
 研究課題名（和文） 卵巣癌のパクリタキセル耐性機序に関わる候補遺伝子の同定
 研究課題名（英文）
 Detection of genes causing paclitaxel-resistance of ovarian cancer

研究代表者

奥川 馨（OKUGAWA KAORU）
 九州大学・大学病院・助教
 研究者番号：90452789

研究成果の概要（和文）：従来の *in vitro* 樹立パクリタキセル耐性株よりむしろ *in vivo* 樹立パクリタキセル耐性株の方が臨床の再発癌に認める亢進した悪性度を反映した、より適切で忠実なモデルであることが示唆された。この *in vivo* で特異的に発現する薬剤耐性機構には、腫瘍細胞自身の感受性の変化のみならず腫瘍と宿主間質組織間の相互作用が関与していると思われる。このような *in vivo* で発現する薬剤耐性機構を明らかにすることは、パクリタキセルを主剤とした化学療法後に再発する薬剤耐性を獲得した卵巣癌の予防と克服に臨床で極めて重要であろう。

研究成果の概要（英文）：These results suggest that the *in vivo* established paclitaxel-resistant cell line, rather than the conventional *in vitro* established cell line, is a suitable and faithful model for clinically recurrent tumors showing transformed aggressiveness. The *in vivo* specific drug-resistant mechanism should involve an interaction between the tumor and host stromal tissue rather than only changes in cellular drug sensitivity. The present study is probably the first report of an *in vivo* established paclitaxel-resistant human ovarian cancer cell line, and the elucidation of such an *in vivo* drug-resistance mechanism may be clinically important in preventing or overcoming acquired drug-resistant ovarian cancers recurring after paclitaxel-based chemotherapy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：婦人科腫瘍学
科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学
キーワード：癌、薬剤耐性、遺伝子

1. 研究開始当初の背景

卵巣癌化学療法の主剤であるタキサン製剤の耐性機序に関してはいまだ十分に解明されていない。このためタキサン製剤耐性機序を解明する必要があった。

2. 研究の目的

新たなパクリタキセル耐性関連分子を同定することで、化学療法耐性腫瘍に対する新たな治療戦略を開発すること。

3. 研究の方法

(1)パクリタキセル耐性株の樹立

パクリタキセル耐性株は以前に報告された方法に基づき *in vivo* で樹立した。以下概略を説明すると、 2×10^6 個の OVMG1 細胞を含んだ単一細胞浮遊液をヌードマウスの皮下に移植し、皮下腫瘍の平均直径が 10mm になった時点で 40mg/kg のパクリタキセルを尾静脈より静注した。24 時間後皮下腫瘍を摘出しミンスして別の新しいヌードマウスの皮下に継代移植した。以上の操作を 6 ヶ月以上にわたり 6 回繰り返し、*in vivo* 樹立パクリタキセル耐性株 OM1/Tvivo として樹立し、培養維持した。OVMG1 親株をパクリタキセルを含まない溶媒を用いて上記と同様にマウス内で 6 回継代して *in vivo* 樹立対照株 OM1/Cvivo を樹立した。

In vitro 樹立パクリタキセル耐性株 OM1/Tvivo は培養ディッシュ内で順次濃度を上げたパクリタキセルに暴露させる事で作成し、最終的に 20nM 濃度のパクリタキセルを含む培地中で増殖可能であった。実験で使用する前に OM1/Tvivo はパクリタキセルを含まない培養液中で少なくとも 3 回は継代して使用した。

(2)増殖能、浸潤能および転移能の評価

In vitro での細胞増殖能を評価するため、 5×10^4 個の OM1/Tvivo、OM1/Cvivo、OM1/Tvivo あるいは OVMG1 細胞を含む単一細胞浮遊液を 6 穴プレートで培養し、細胞数を連日コーンターカウンター (Coulter Electronics 社、英国) で計測した。各群 3 ウェルずつ測定し、細胞増殖曲線から倍加時間を算出した。 *In vivo* の腫瘍増殖能の評価のため、各株の細胞 2×10^6 個を含む単一細胞浮遊液を各々のマウスの右側腹部に皮下移植し、週 1 回腫瘍の長径とそれに直交する短径を測定した。腫瘍体積 (mm^3) は長径 \times 短径²/2 で算出した。腫瘍増殖曲線から腫瘍倍加時間を算出し腫瘍増

殖率を比較した。

浸潤能の比較に関しては、各株の細胞 2×10^6 個を各々のマウスに皮下移植し、腫瘍平均径が 10mm となったところで腫瘍を摘出し、ヘマトキシリン・エオジン染色して組織学的に浸潤能を評価した。

自然転移能は我々が以前報告した方法で評価し、 10^6 個の細胞を足底部に移植し、各群の足底部厚が 8mm に達した時点で担癌肢を大腿部中央で切断した。実験的転移能の評価には 10^6 個の各細胞を尾静脈より静注した。足底部移植ならびに尾静脈静注後 6 ヶ月観察し、最終的に肺および他臓器を摘出し転移の有無を確認した。

(3) *In vivo* 薬剤感受性の評価

前述した方法で各株の細胞を皮下移植し、平均腫瘍径が 6mm に達した時点で尾静脈より 40mg/kg のパクリタキセル (治療群) もしくは溶媒のみ (非治療群) を投与した。腫瘍体積は前述の通り経時的に測定し、*in vivo* 薬剤感受性は治療後の腫瘍増殖曲線と、(治療群の平均腫瘍体積) / (非治療群の平均腫瘍体積) $\times 100$ により算出される腫瘍体積パーセント比をもって比較した。

(4) WST-1 アッセイによる *in vitro* 薬剤感受性の評価

培養細胞のパクリタキセル感受性は以前報告されている様に WST-1 アッセイ (Dojindo Laboratories、熊本) を用いて測定した。 2×10^4 個の単一浮遊細胞を含むフェノールレッド不含有 RPMI1640 培養液 100 μ l を 96 穴プレートの各ウェルに入れ、37 $^{\circ}$ C、5%二酸化炭素の条件下で一晩、前培養したのち様々な濃度のパクリタキセル溶液 100 μ l を追加した。72 時間の培養後、66 μ g の WST-1 (a monosodium salt of

2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulphophenyl)-2H-tetrazolium) と 1.4 μ g の 1-methoxy-5-methylphenazinium methosulfate を含む WST-1 溶液 20 μ l を各ウェルに加えた。更に 4 時間培養した後に 450nm での吸光度をマイクロプレートリーダー (Bio-Rad Laboratories, Inc.、東京) で計測した。生細胞率 (%) は (パクリタキセルを投与したウェルの吸光度 - 細胞の入っていないウェルの吸光度) / (パクリタキセル非投与のウェルの吸光度 - 細胞の入っていないウェルの吸光度) $\times 100$ で算出した。平均生細胞率は 3 セットのウェルより算出した。50%阻害濃度 (IC_{50}) は生細胞率が 50% となるパクリタキセ

ル濃度とし、細胞生存率をプロットしたグラフより算出した。

(5)コロニーフォーミングアッセイによる in vitro 薬剤感受性の評価

まず6穴プレートに様々な濃度の細胞浮遊液を入れた(無治療対照群用に 10^3 、 5×10^2 、 10^2 および 50 個/ウェル、5nM パクリタキセル治療群用に 5×10^3 、 10^3 、 5×10^2 および 10^2 個/ウェル、50nM パクリタキセル治療群用に 10^4 、 5×10^3 、 10^3 および 5×10^2 個/ウェル、500nM パクリタキセル治療群用に 5×10^4 、 10^4 、 5×10^3 および 10^3 個/ウェルの細胞濃度でプレートした)。一晚培養後に種々の濃度(0、5、50、500nM)のパクリタキセル溶液を加え 37 で 24 時間暴露した後、パクリタキセルを除去し冷たい PBS で洗浄し、その後通常の培養液で再び培養した。10 日後プレートはカルノア固定液(エタノール:クロロホルム:氷酢酸=6:3:1)で固定し、クリスタルバイオレットで染色した。約 50 個以上の細胞からなると考えられる肉眼で確認可能なコロニー数を測定し Plating Efficiency (P.E.) を(コロニー数)/(蒔いた細胞数)で算出した。Surviving Fraction は(パクリタキセルを投与したウェルの P.E.)/(パクリタキセル非投与のウェルの P.E.)で算出した。平均値と標準誤差は3セットの測定より算出した。

(6)腫瘍組織内の薬剤濃度

OM1/Tvivo および OM1/Cvivo 細胞を前述したようにマウス皮下に移植し、平均腫瘍径が 6mm となった時点で尾静脈よりパクリタキセル 40mg/kg を静注した。静注の 3、15、24、48 時間後に腫瘍を摘出し薬剤濃度の測定時まで -80 で保存した。各々の腫瘍はホモジナイズし、固相抽出高速液体クロマトグラフィー法(SBS, Inc., 相模原)で解析した。腫瘍内パクリタキセル濃度は(パクリタキセルの総量)/(腫瘍重量)で算出した。

(7)培養細胞内の薬剤濃度

OM1/Tvivo、OM1/Cvivo および OM1/Tvivo の subconfluent 状態の培養細胞に 100nM の濃度のパクリタキセルを 2 時間暴露した。冷たい PBS で 2 回洗浄後、細胞をチューブに集め 2,700rpm で 5 分間遠心し細胞集塊を得た。前述のクロマトグラフィー法でパクリタキセルの総量を計測し、細胞 10^6 個当たりのパクリタキセル量を培養細胞内のパクリタキセル濃度とした。

4. 研究成果

培養時の細胞増殖率は同程度であった。In vivo での腫瘍増殖に関しては、OM1/Tvivo は OM1/Cvivo に比し腫瘍増殖能が亢進していたが、OM1/Tvivo は造腫瘍能を失っていた。OM1/Tvivo と OM1/Cvivo は、親株の OVMG1 と同様に浸潤病巣も転移病巣も作り得なかった。OM1/Cvivo に比べ OM1/Tvivo は腫瘍形成

時にはマウスへのパクリタキセル投与後の安定した薬剤耐性と低い腫瘍内薬剤到達性を示したが、培養時には OM1/Tvivo 細胞はその双方を消失した。一方、in vitro における異常に高い薬剤耐性能と低い細胞内薬剤到達性は OM1/Tvivo 細胞にのみ認められた。

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)

Sonoda K. Miyamoto S. Kobayashi H. Ogawa S. Okugawa K. Taniguchi S. Wake N.

The level of RCAS1 expression is inversely correlated with the number of vimentin-positive stromal cells in epithelial ovarian cancer.

International Journal of Gynecological Cancer. 査読あり 19(5):838-43, 2009.

[学会発表](計0件)

[図書](計0件)

[産業財産権]
出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等
なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

奥川 馨 (OKUGAWA KAORU)
九州大学・大学病院・助教

研究者番号：9 0 4 5 2 7 8 9

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし