

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 8 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591676

研究課題名（和文） 薬剤耐性胃癌細胞株の樹立とそのタンパクプロファイル

研究課題名（英文） Establishment of drug-resistant gastric cancer cell lines and their proteomic profile
研究代表者

西塚 哲（NISHIZUKA SATOSHI）

岩手医科大学・医学部・講師

研究者番号：50453311

研究成果の概要（和文）：癌細胞の薬剤耐性のメカニズムを解明することは癌化学療法において重要である。根治手術後の補助化学療法の進歩に伴い、手術単独の治療よりも長期無再発・長期生存例が得られるようになってきた。一方、術後補助化学療法にも関わらず30-40%の再発が見られる。本研究では癌細胞がどのようにして薬剤耐性を獲得するのかの分子生物学的機構を明らかにするために胃癌細胞株に薬剤を添加し耐性細胞株として樹立した。この耐性株をCDDP下での反応を比較するとDNA傷害に関わる経路の反応が破たんしていた。このことは耐性株では細胞がストレスに暴露された場合、アポトーシスや細胞周期の停止などの適切な状態に進むことができず増殖が停止しないことを示している。

研究成果の概要（英文）：It is important to clarify the drug-resistant mechanism of cancer cells in the context of cancer chemotherapy. Advances on adjuvant chemotherapy after oncologically curative operation have prolonged the long-term disease-free and overall survival rates. However, approximately 30-40% cases still experience recurrence despite of adjuvant chemotherapy. In the present study, we established a drug-resistant gastric cancer cell line to clarify the drug-resistant mechanism. Pathways for DNA damage response were found disrupted in the resistant cell line. These results suggest that the resistant cell is unable to control cell cycle or apoptosis, which results in continuous proliferation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：薬剤耐性、胃癌

1. 研究開始当初の背景
化学療法において薬剤耐性の獲得は克服すべき大きな課題のひとつである。従って薬剤耐性細胞を解析することは、薬剤耐性機構

の解明を通して化学療法の臨床に役立つ。シスプラチン(CDDP)は、胃癌の化学療法に最も広く用いられている薬剤である。我々は薬剤抵抗性を特徴づける重要なタンパク分子

群を検索するためにヒト胃癌細胞株 MKN45 から CDDP 耐性細胞集団を単離した。この細胞集団の分子プロファイルを行い、薬剤耐性に関連した分子・パスウェイの同定することは化学療法剤の使用法における客観的な指標を提供できる。

2. 研究の目的

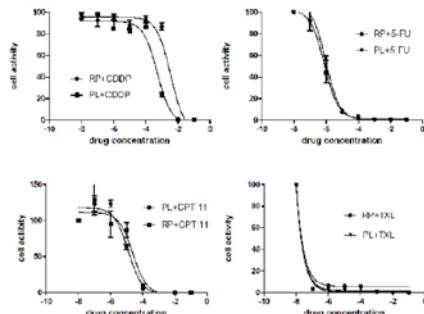
胃癌細胞株 MKN45 を用いて CDDP 薬剤耐性細胞株を確立する。さらにその耐性株を用いて CDDP に対する分子レベルでの反応性について検討する。

3. 研究の方法

はじめに MKN45 細胞に対する CDDP の 50%細胞増殖阻止濃度 (GI50) を確定する。この CDDP 濃度に調整された培養液を用いて 2-3 週間程度で形成されるコロニーからクローニングを行い培養細胞として確立する。確立された薬剤抵抗性 MKN45R (R=Resistant) を用いて他の薬剤での抵抗性を検証し CDDP 特異的な抵抗性を獲得したのかを検証する。さらに CDDP を添加したのちに時間毎に細胞ライゼートを回収しウェスタンブロットおよび逆相タンパクライゼートアレイ (RPA) を用いてパスウェイの状態を解析する。

4. 研究成果

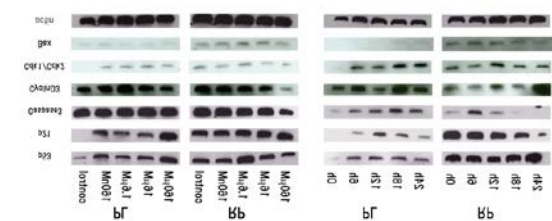
CDDP に対する MKN45 の GI50 は 1.6 μM であった。CDDP 耐性細胞集団を得るために 1.6 μM の CDDP 濃度下で細胞培養を行ったところ 25 個のコロニーが得られた。培養面積を徐々に増加させ 25 cm^2 まで拡大した時点で各種抗癌剤を用いて細胞増殖抑制試験を行った。7 つの細胞集団では CDDP に対して 1.94-26.3 倍の耐性を示した。さらに 5-FU、CPT-11、パクリタキセルの各薬剤を用いて多剤耐性細胞集団を除外するため細胞増殖試験を行った。7 つの細胞集団のうち 6 つではすべての薬剤に対して耐性が認められたが、1 つの細胞集団では CDDP のみに耐性であった (図 1、下)。



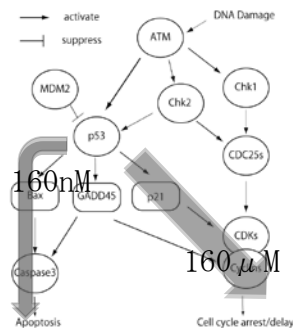
その CDDP 耐性細胞集団では、親株である MKN45 に対して約 9 倍の GI50 を示した。この細胞を MKN45R とし親株と比較するための以下の実験を行った。

MKN45 では p53 と p21 タンパクは薬剤濃度の増加に応じて発現が増加していたが、MKN45R では p53 タンパクは 1.6 μM をピークとする発現の変動があり、p21 タンパクはほとんど変化が見られなかった。Caspase-3、CyclinD3 は MKN45 では濃度に関わらず発現し、MKN45R では濃度依存性に発現が低下した。Cdk1/Cdk2、Bax は MKN45 では概ね濃度依存性に発現が増強したが、MKN45R では逆に濃度に伴って発現が低下する傾向にあった。

CDDP 添加後 6 時間ごとの p53 タンパクは MKN45 では時間依存性に発現が増強したが、MKN45R では CDDP 非存在下でも強く発現していた。p21 タンパクは MKN45 では時間依存性に発現が増加したが、MKN45R では逆に時間依存性に低下した。Caspase-3、Bax は MKN45R で時間依存性に発現が低下した。MKN45R での CyclinD3 は時間への依存性は明らかではなかったが不規則な変動が見られた (図 2、下)。



2009年2月までに発表された主な文献からアポトーシス・細胞周期に関するキーワードで抽出し得た細胞シグナル伝達経路をから MKN45R における変化を推定した。CDDP 添加により DNA 傷害が起こり、p53 を中心とした経路が活性化される。アポトーシス経路を推定するために Bax および Caspase、細胞周期調節経路を推定するため CDKs、CyclinD3、p21 の変化に注目する必要性が示唆された。ウェスタンブロットの結果をもとに添加 CDDP 濃度による反応の強さ、また時系列データから伝達の順番を推定すると 160nM では細胞周期抑制経路が、160 μM ではアポトーシス経路が predominant に活性化されていることが示唆された (図 3、下)。



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5件)

野田宏伸、西塚 哲、石田和茂、シスプラチン抵抗性胃癌細胞集団の単離とその性質の検討、岩手医誌 61 巻 3 号、151-159、2009

Ishida K, Nishizuka S, Noda H, Matsuo T, Otsuka K, Wakabayashi G. Characterization of clinically-used anticancer agents by quantitative cellular and molecular assay platforms, J Iwate Med Assoc, 62(5), 363-375, 2010

松尾鉄平、西塚 哲、石田和茂、野田宏伸、reverse-phase protein lysate microarray (RPA)による細胞内伝達経路モニタリング、岩手医誌 63 巻 5 号、299-306、2011

Nishizuka S, Reverse-phase protein lysate microarray (RPA) for the experimental validation of quantitative protein network models, Methods Mol Biol, 785, 65-77, 2011

Matsuo T, Nishizuka SS, Ishida K, Iwaya T, Ikeda M, Wakabayashi G, Analysis of the anti-tumor effect of cetuximab using protein kinetics and mouse xenograft models, BMC Res Notes, 10, 140, 2011

〔学会発表〕(計7件)

西塚 哲他 13 名、ライセートアレイによる蛋白質定量を用いた癌細胞薬剤反応の評価、第 47 回日本癌治療学会学術集会、横浜、2009 年

西塚 哲他 7 名、進行・再発胃癌症例に対する細胞増殖曲線パターンによる抗癌剤感受性判定、第 43 回制癌剤適応研究会、仙台、2010 年

Nishizuka S, 他 7 名 Protein kinetic analysis of an in vitro chemotherapy-resistant cell population in response to drug exposure, American Society of Clinical Oncology Gastrointestinal Symposium, Orlando, 2010

Nishizuka S 他 5 名 Therapeutic efficacy prediction by quantitative protein analysis in response to anti-cancer agents, American Association for Cancer Research, Washington DC, 2010

Nishizuka S, 他 9 名 Identification of chemosensitivity markers for

post-operative adjuvant chemotherapy using cellular, molecular, and immunohistochemical profiles of advanced carcinomas from gastrointestinal tract, American Society of Clinical Oncology Gastrointestinal Symposium, San Francisco, 2011

Nishizuka S, 他 9 名 An isolation strategy for biomarkers that predict cancer relapse after 5-FU based adjuvant chemotherapy, American Association for Cancer Research, Orlando, 2011

Nishizuka S 他 6 名、An isolation strategy for biomarkers that predict cancer relapse after adjuvant chemotherapy, International Surgical Week 2011, Yokohama, 2011

〔図書〕(計2件)

西塚 哲 (金子周一、堀池靖浩編)、バイオチップ実用化ハンドブック 第 3 章 検出技術 第 4 節 その他の検出技術-発色法、NTS 出版、2010

西塚 哲 (金子周一、堀池靖浩編)、バイオチップ実用化ハンドブック 第 6 章 プロテインチップ 第 4 節 ライセートアレイ、NTS 出版、2010

〔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◇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〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西塚 哲 (NISHIZUKA SATOSHI)
岩手医科大学・医学部・講師
研究者番号：

(2) 研究分担者

岩谷 岳 (IWAYA TAKESHI)
岩手医科大学・医学部・助教
研究者番号：

(3) 研究分担者

若林 剛 (WAKABAYASHI GO)
岩手医科大学・医学部・教授
研究者番号：