

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 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：32666

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22791305

研究課題名（和文） 消化器癌のミトコンドリア DNA 変異と抗癌剤耐性との関連を分子生物学的に解明する。

研究課題名（英文） Molecular biological study for association mitochondrial DNA somatic mutation with acquired anti-cancer drug resistance in digestive system cancer

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) を作成して実験系を完成した。

5FU, CDDP, CPT-11, Gemcitabine をこれら細胞群に作用させ薬剤に対する耐性を比較検討した。in vitro、in vivo の両実験において変異型ミトコンドリア DNA を有する Cybrid 細胞が高い抗癌剤耐性を示した。また当初、変異ミトコンドリア DNA は膵臓癌由来のみを使用していたが、胃癌、大腸癌由来の変異ミトコンドリア DNA 由来の Cybrid 細胞も作製し、同様の結果を得た。

研究成果の概要（英文）：

We showed that mutations in mitochondrial DNA (mtDNA: derived from pancreatic cancer, gastric cancer and colorectal cancer cell lines) are responsible for anticancer drug tolerance (5FU, CDDP, CPT-11, Gemcitabine) in vitro and in vivo with *trans*-mitochondrial hybrids (cybrids) technique.

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, gastric cancer and colorectal cancer cell lines harboring mtDNA mutations. We constructed several cybrids with mutations derived from the cancer cells as well as those with wild mtDNA derived healthy individuals, and transplanted mutant and wild type cybrids into nude mice to generate tumors. We compared tumor growth and massive apoptosis of mutant cybrid tumors to wild cybrid tumors administrated of 5FU, CDDP, CPT-11, Gemcitabine. All experiments were performed in accordance with the guidelines of the Animal Use Ethics Committee of Nippon Medical School.

Result:

Tumors derived from mutant cybrids were more resistant than those from wild-type cybrids in suppressing tumor growth and inducing massive apoptosis when the all of anti-cancer drugs were administered.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	500,000	150,000	650,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	1,500,000	450,000	1,950,000

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

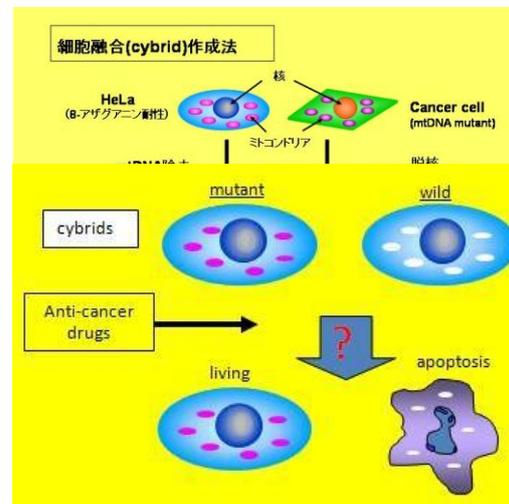
キーワード：ミトコンドリア DNA、体細胞変異、消化器癌、抗癌剤耐性、転移・浸潤

1. 研究開始当初の背景

癌細胞ではミトコンドリア DNA 体細胞変異が高率に起こっていることは周知の事実であった。しかし、その意義・それが原因により起こる事象については明らかにされていなかった。

我々の 2009 年度までの実験において、癌細胞の核は HeLa 細胞を使用。またミトコンドリア DNA として野生型は成人の血小板、線維芽細胞を使用、変異型は膵臓癌 cell line (CFPAC1, CAPAN2 ほか) を使用して実験モデル (Cybrid) を作成して変異型ミトコンドリア DNA を持つ癌細胞が野生型のそれを持つ癌細胞よりも抗癌剤耐性 (STS, 5FU, CDDP) を示す事を In vitro にて証明した。更に、その機序は anti-apoptosis の機構である事も解明した。

今回、In vivo に実験を広げることと、膵臓癌以外の癌腫や、その他の抗癌剤においても同様の結果が得られるか検討した。



2. 研究の目的

ミトコンドリア DNA 体細胞変異が抗癌剤耐性の一因になっていることを

- ① □ In vivo でも証明できるか。
- ② 変異型ミトコンドリア DNA を膵臓癌以外の癌腫でも In vitro で証明できるか。
- ③ 細胞障害経路の違う複数の薬剤でも同様の結果になるか。

以上、3 点を大きな柱として実験を進めた。

3. 研究の方法

- ① □ In vivo における抗癌剤耐性の検討

1. Bulb ノ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。

3. 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。

4. 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変異型ミトコンドリア DNA を胃癌・大腸癌からも用いて Cybrid 細胞を作製する。

合計 6 種類の胃・大腸癌培養細胞 (NMS2、MKN-45、Colo シリーズ) と HeLa 細胞由来の ρ0 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。

樹立した Cybrid 細胞の Back ground を計測して細胞周期、核酸量、細胞呼吸など計測してコントロール (野生型) と差がないかを確認する。

③他の抗癌剤刺激による反応の検討

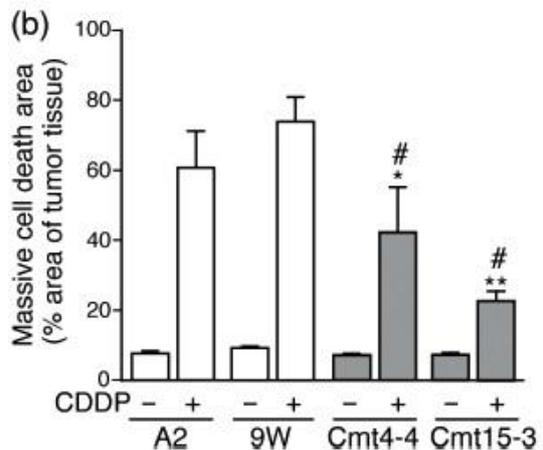
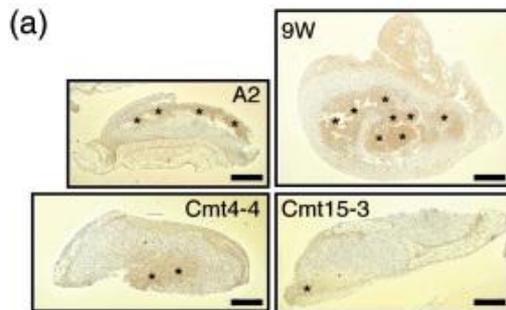
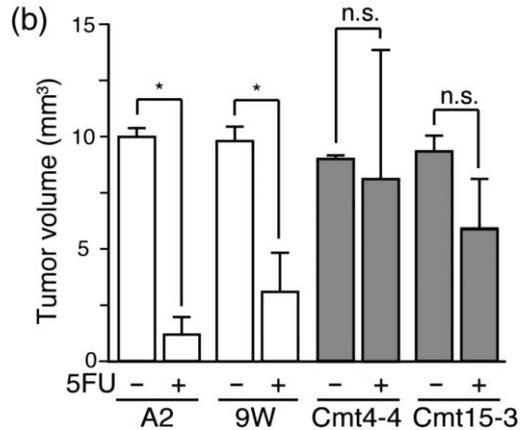
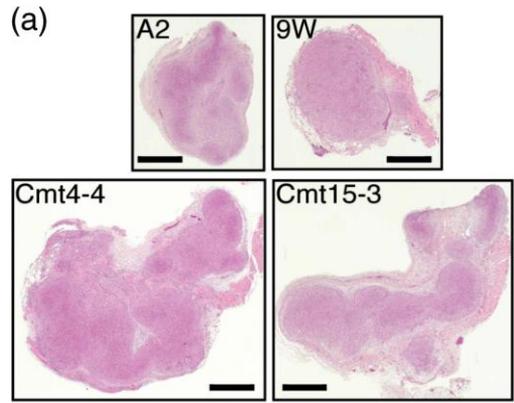
5FU、CDDP、以外にも CPT-11、Gemcitabine を抗癌剤として採用し In vitro に用いた。希釈の Dose は Publish された References に準じた。

4. 研究成果

①In vivo においても変異型ミトコンドリア DNA を持つ Cybrid 細胞がより大きな抗癌剤耐性 (5FU、CDDP、CPT-11) を示した。

②各種細胞由来の Cybrid 細胞クローンを複数樹立できた。Back ground 計測し、コントロールと同等の性質を持たないものは除外した。

③In vitro において CPT-11 と GEM は 5FU、CDDP と同様に変異型ミトコンドリア DNA Cybrid 細胞において高い抗癌剤耐性を示した。(wild:A2, 9W, mutant:Cmt4-4, Cmt15-3)



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 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

① 膵臓癌におけるミトコンドリア DNA 変異は抗癌剤耐性を獲得する。

第 110 回日本外科学会。2010. 04. 名古屋

② Mutations in the mitochondrial genome of pancreatic cancer effect resistance against anti-cancer drugs. 42nd.
European Pancreatic Club. Stockholm.
2010. 06

③ In Vivo Resistance of Mutant Mitochondrial DNA Pancreatic Cancer Cybrids to Anticancer Drugs
43rd European Pancreatic Club.
Magdeburg. 2011. 06

[図書] (計 0 件)

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