

Overcoming cisplatin resistance through p53 gene using caffeine in osteosarcoma

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2018-06-14 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: Tsuchiya, Hiroyuki メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24517/00051059

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.



KAKEN
2000
13

金沢大学

カフェイン^による p53 遺伝子を介在した
骨肉腫のシスプラチン耐性克服

(課題番号：11671426)

平成 11 年度～平成 12 年度科学研究費補助金 (基盤研究 (C) (2))

研 究 成 果 報 告 書

平成 13 年 3 月

研究代表者 土 屋 弘 行

金沢大学附属図書館

(金沢大学医学部助教授)



8000-96440-6

1477
73

カフェインによる p53 遺伝子を介在した
骨肉腫のシスプラチン耐性克服

(課題番号 : 11671426)

平成 11 年度～平成 12 年度科学研究費補助金 (基盤研究(C)(2)) 研究成果報告書

平成 13 年 3 月

研究代表者 土 屋 弘 行
(金沢大学医学部助教授)

研究組織

研究代表者：土 屋 弘 行（金沢大学医学部助教授）

研究経費

平成 11 年度	1,900 千円
平成 12 年度	1,700 千円
計	3,600 千円

平成 11 年度

1) シスプラチン耐性骨肉腫における p53 遺伝子の変異の解析

2 種類の p53 ポリクローナル抗体 (CM1, RSP53) を用いて streptavidin-biotin 法にて免疫染色法を施行した。10%以上の腫瘍細胞数に染色された場合、p53 蛋白の発現を陽性とした。一方、p53 遺伝子の点突然変異が高頻度に報告されている Exon 5 から 8 までを PCR-SSCP 法を用いて解析した。免疫染色法では、両細胞株において全く p53 蛋白の過剰発現を認めなかった。PCR-SSCP 法では、p53 遺伝子の Exon 5 から 8 までに点突然変異を認めなかった。従って、両腫瘍細胞ともに野生型 p53 蛋白を発現していると考えられた。

2) シスプラチン耐性骨肉腫における p53 遺伝子の欠失の解析

p53 遺伝子および p53 蛋白の点突然変異について免疫染色法、PCR-SSCP 法および ELISA 法を用いて調べた。また、p53 遺伝子の欠失について Fluorescence in situ hybridization (FISH) 法を用いて調べた。また、両腫瘍細胞より細胞内の蛋白質を抽出して p53 蛋白質を ELISA 法にて定量した。FISH 法は、p53 遺伝子に特異的なプローブ (17p13.1) と p53 の位置する 17 番染色体のアルファセントロメアに特異的なプローブ (D17Z1) を同時に用いて各腫瘍細胞 100 個以上についてそのシグナルを計測した。両腫瘍株が正常範囲内の p53 蛋白を発現している所見が ELISA 法にても得られた。この結果は、両腫瘍細胞が野生型 p53 蛋白を発現していることを支持している。しかし、OST/R 細胞の p53 蛋白量は OST 細胞に比較して約 40%に減少していることが明らかとなった。FISH では、17 番染色体と p53 遺伝子のシグナルの組み合わせで腫瘍細胞を分類しその分布を調べた。親株の OST 細胞において 17 番染色体がもともと 3 倍体であり、OST 細胞と OST/R 細胞ともに 17 番染色体のシグナルが 3 個で p53 遺伝子のシグナルが 2 個の細胞群が最多の割合であった (46%と 36%)。しかし、OST 細胞の p53 遺伝子の欠失率が 65%であるのに比較して OST/R 細胞では 86%と有意に増加していた。更に、OST 細胞は 3 つの細胞群からなるのに対して OST/R 細胞は 10 群からなり、シスプラチン暴露による遺伝子の不安定性は有意に変化していた。具体的には、OST/R 細胞では OST 細胞に比較し

て、17 番染色体のシグナルが 3 個で p53 遺伝子のシグナルが 2 個ないし 3 個の細胞群が減少し、17 番染色体のシグナルが 4 個ないし 5 個に増幅された細胞群が新たに出現していた。p53 遺伝子あるいは 17 番染色体のシグナルのみに着目すると、OST/R 細胞と OST 細胞の p53 遺伝子のシグナルの分布を比較すると、シグナル 2 個から 1 個へ有意に減っていた。一方、OST/R 細胞と OST 細胞の 17 番染色体のシグナルの分布を比較すると、シグナル 3 個が有意に減少し相対的にシグナル数が有意に増えていた。以上の研究結果から、シスプラチン耐性骨肉腫において p53 遺伝子の新たな欠失が有意に増加していることを示した。p53 遺伝子の欠失に呼応して野生型 p53 蛋白量も減少しており、シスプラチン耐性骨肉腫においては p53 遺伝子の機能的な役割が抑制され、17 番染色体遺伝子の不安定性を増大していると推察した。従来報告されてきた p53 遺伝子の点突然変異が認められなくても、その機能異常として p53 遺伝子および p53 蛋白の欠失が骨肉腫におけるシスプラチン獲得耐性の有用な指標となることが明らかとなった。

3) p53 発現制御による細胞増殖の抑制

両腫瘍細胞株共に殺細胞効果のないカフェインの最大濃度は 0.5mM であり、これをカフェインの使用濃度として、殺細胞増強効果について検討した。WST-1 assay を用いて細胞生存曲線を作成した。高水溶性のホルマザンを生じるテトラゾリウム塩である WST-1 を用いるこの測定法は、生細胞の脱水素酵素活性を測定しその活性量から生細胞数を数えることができ、細胞の生存数によって薬剤の毒性を評価するものである。両腫瘍細胞株に各濃度のシスプラチンを 1 時間接触したのちカフェインを添加して 3 日間培養した。シスプラチン接触後のカフェイン添加による殺細胞増強効果は OST 株では認められたが、OST/R 株では認められなかった。シスプラチンが高濃度の領域においても全くカフェインの相乗効果を認めなかった。

p53 蛋白発現について Western Blot 法にて検討した。カフェインのみ添加した培養液を加えた細胞群と薬剤を加えない培養液を加えた細胞(対照群)より蛋白を抽出して電気泳動をおこなった。Western Blot 法の結果は、OST 細胞においてカフェイン投与だけでは p53 蛋白の発現は対照群と同じであった。同様に、OST/R 細胞においても p53 蛋白の発現に変化が認められなかった。DNA 合成能についてカフェイン接触 1, 6, 12, 18, 24 時間後に BrdU を取り込ませて ELISA 法にて対照群と比較した。BrdU は増殖細胞の DNA の中へ

チミヂンの代わりに取り込まれる。従って、取り込まれた BrdU を測定する ELISA 法は、DNA 合成量を定量化するものである。両腫瘍細胞株ともカフェイン添加のみでは DNA 合成能に低下を認めなかった。従って、以上の結果からシスプラチン耐性骨肉腫に対してカフェインは耐性を克服することができないことが明らかとなった。

平成 12 年度

4) 化学療法による p53 遺伝子の発現の変化の解析

カフェイン添加のみの場合を検討したところ p53 蛋白に変動を認めなかったため、次にシスプラチンとの組み合わせによる p53 蛋白の相互作用に関して検討した。

Western Blot 法では 10 μ g/ml のシスプラチンを 1 時間接触後に洗浄し培養液を加えた腫瘍細胞群、シスプラチンを 1 時間接触後に洗浄しカフェインを添加した培養液を加えた細胞群より蛋白を抽出して電気泳動をおこなった。OST 細胞では p53 蛋白の発現量がシスプラチン処理で増加し、それがカフェイン添加で抑制された。この所見は 4 時間後に顕著に認められた。OST / R 細胞ではいずれも p53 蛋白の変化を認めなかった。同様の所見は ELISA 法にも得られた。10 μ g/ml のシスプラチンを 1 時間だけ腫瘍細胞に接触させた際の p53 発現の変化として、OST 細胞では DNA 修復のために p53 蛋白の一過性の上昇を 6 時間後に認められたが (1.31 倍)、OST/R 細胞においては p53 蛋白の発現に変化はなかった (0.95 倍)。

DNA 合成能についてシスプラチン接触後 1, 6, 12, 18, 24 時間後に BrdU を取り込ませて ELISA 法にてカフェイン添加の有無による DNA 合成能の変化について検討した。OST 細胞の DNA 合成能は、シスプラチン接触後 6 時間後より 12 時間後にかけて約 50% まで低下するが、カフェイン処理により低下が起きなかった。それぞれ、早期の p53 増加とカフェインによる p53 増加の抑制に対応していると考えられた。一方、OST / R の DNA 合成能はシスプラチン接触後カフェイン添加の有無にかかわらず 6 時間後でも 80% に留まり、p53 の変化のない結果を裏付けた。まとめるとシスプラチンに高

感受性の OST 細胞 ではシスプラチンの殺細胞効果がカフェインにより増強された。その際、p53 蛋白はシスプラチン処理により増加し DNA 合成能は抑制されたが、カフェイン添加により p53 蛋白は抑制され DNA 合成能の抑制は解除された。一方、シスプラチン耐性の OST/R 細胞ではシスプラチンの殺細胞効果はカフェインにて増強されず、p53 蛋白量と DNA 合成能のいずれも変化がなかった。

今後の展望

カフェイン併用化学療法の臨床成績を本末に貼付する(論文 3 篇)。

- 1) Caffeine-assisted chemotherapy and minimized tumor excision for nonmetastatic osteosarcoma. *Anticancer Research* 18: 657-666, 1998.
- 2) Caffeine-potentiated chemotherapy and conservative surgery for high-grade soft-tissue sarcoma. *Anticancer Research* 18: 3651-3656, 1998.
- 3) Caffeine-potentiated radiochemotherapy and function-saving surgery for high-grade soft tissue sarcoma. *Anticancer Research* 20: 2137-2144, 2000.

骨肉腫では、5 年生存率が約 90%にまで上昇し、局所効果も極めて有効であるが、初診時に転移の無い約 10%の症例、初診時に転移を有する約 95%の症例が化学療法に抵抗性である。また、軟部肉腫の 5 年生存率は約 80%であり、局所有効性は約 75%であった。今後、化学療法抵抗性の腫瘍に対して、p53 遺伝子による感受性予測や抗癌剤の効果増強を目的とした遺伝子療法を検討していきたいと考えている。

研究発表

- 1) 毛利良彦：野生型 p53 遺伝子導入とカフェイン併用によるヒト骨肉腫細胞の抗癌剤感受性の増強. 金沢大学十全医学会雑誌 107(6): 493-503, 1998.
- 2) Asada N, Tsuchiya H, Tomita K: *De Novo* Deletions of p53 Gene and Wild-Type p53 Correlate with Acquired Cisplatin-Resistance in Human Osteosarcoma OST Cell Line. *Anticancer Res* 19: 5131-5138, 1999.
- 3) Tsuchiya H, Mori Y, Ueda Y, Okada G, Tomita K: Sensitization and Caffeine Potentiation of Cisplatin Cytotoxicity Resulting from Introduction of Wild-Type p53 Gene in Human Osteosarcoma. *Anticancer Res* 20: 235-242, 2000.