

肝細胞癌由来培養細胞における薬剤耐性遺伝子の発現と,シスプラチン,インターフェロン併用療法の効果

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9445

肝細胞癌由来培養細胞における薬剤耐性遺伝子の発現と、シスプラチン、インターフェロン併用療法の効果

金沢大学医学部医学科内科学第一講座 (主任: 小林健一教授)

竹内安紀

悪性腫瘍の化学療法では抗癌剤への薬剤耐性が問題となっている。我々は進行肝細胞癌に対し、シスプラチン [cisplatin (cis-diamminedichloroplatinum), CDDP] とインターフェロン (interferon, IFN)- α の併用化学療法を行い、完全緩解、部分緩解をあわせ2年生存率が76.2%と良好な成績を得ている。このようにCDDPは化学療法の主役として用いられているにもかかわらず、その薬剤耐性の機構は明らかにされていない。そこで肝細胞癌におけるCDDP耐性の機構とIFN- α 投与の関係を明らかにするために、ヒト肝癌培養細胞HepG2, HuH7, SK-Hep-1にIFN- α , CDDP投与を行い、薬剤耐性に関係する遺伝子である多剤耐性遺伝子1 (multidrug resistance gene 1, MDR1), 多剤耐性関連蛋白遺伝子 (multidrug resistance-associated protein gene, MRP), DNAトポイソメラーゼII α 遺伝子, DNAトポイソメラーゼII β 遺伝子, グルタチオン-S-トランスフェラーゼ- π 遺伝子 (glutathione-S-transferase- π gene, GST- π) の発現変化を逆転写PCR法を用いて検討した。HepG2, HuH7, SK-Hep-1のいずれの細胞でもMDR1, MRP, DNAトポイソメラーゼII α , DNAトポイソメラーゼII β は薬剤非投与で強い発現を認めた。GST- π はHuH7, SK-Hep-1で発現を認めたがHepG2では発現は認められなかった。HepG2においてはIFN- α , CDDP同時投与ではMDR1, MRP, DNAトポイソメラーゼII α , DNAトポイソメラーゼII β の発現がCDDP単独投与に比べて抑制された。SK-Hep-1ではCDDP単独投与によりMDR1の発現が増強しIFN- α 単独投与とIFN- α , CDDP同時投与で発現が抑制され、GST- π はIFN- α , CDDP同時投与で発現が抑制された。以上よりIFN- α が肝癌培養細胞における薬剤耐性遺伝子の発現を抑制することが示唆された。

Key words hepatocellular carcinoma, cisplatin, chemotherapy, drug resistance, interferon- α

シスプラチン [cisplatin (cis-diamminedichloroplatinum), CDDP] は悪性腫瘍に対する化学療法剤の中心として用いられているが、消化器系悪性腫瘍では効果が少なく、その原因としてCDDPに対する自然耐性が示唆されている。CDDPの耐性機構については細胞内薬物蓄積量の低下、DNA傷害修復の亢進、解毒性の亢進が報告されている^{1) 2)}。一方、インターフェロン (interferon, IFN)- α には抗腫瘍効果があることが知られており、薬剤耐性の乳癌、乳癌由来細胞にIFN- α の投与を行い癌細胞の生存率の低下が見られたとの報告がある^{3) 4)}。また進行肝細胞癌に対するCDDP, 5-フルオロウラシル (5-fluorouracil), メトトレキサート (methotrexate) 併用化学療法にIFN- α を追加することにより完全緩解、部分緩解を含めて76.2%の2年生存率が得られたとの報告があり、肝細胞癌のCDDP自然耐性をIFN- α が抑制している可能性が考えられる⁵⁾。

そこで肝細胞癌におけるCDDP耐性機構と、肝細胞癌培養細胞におけるIFN- α による耐性克服機構について検討するため、薬剤耐性に関する遺伝子、多剤耐性遺伝子1 (multidrug resistance gene 1, MDR1), 多剤耐性関連蛋白遺伝子 (multidrug resistance-associated protein gene, MRP), DNAトポイソメ

ラーゼII α 遺伝子, DNAトポイソメラーゼII β 遺伝子, グルタチオン-S-トランスフェラーゼ- π 遺伝子 (glutathione-S-transferase- π gene, GST- π) の発現の変化を逆転写PCR (reverse transcription-PCR, RT-PCR) にて検討した。

対象および方法

I. 細胞培養

肝細胞癌由来細胞として、肝芽細胞腫 (hepatoblastoma) 系よりHepG2細胞、肝細胞癌 (hepatocellular carcinoma) 系よりHuH7, SK-Hep-1細胞を用いた⁶⁾。培地はダルベッコ変法イーグル培地 (Dulbecco modified Eagle's medium, DMEM, Gibco, Rockville, USA) にウシ胎児血清 (Gibco) を10%加えたものを用いた。それぞれの細胞の 2.5×10^6 個を直径60 mmプラスチックデイッシュ (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA) に播き、5%炭酸ガス通気の培養装置内で37℃で48時間培養した。

II. 薬剤及び薬剤投与方法

IFN- α , CDDPの投与量は、3-[4,5-ジメチルチアゾール-2-yl]-5-[3-カルボキシメトキシフェニル]-2-[4-スルフォフェニル]-2水

平成11年7月5日受付, 平成11年10月1日受理

Abbreviations : CDDP, cisplatin (cis-diamminedichloroplatinum); GSH, glutathione; GST- π , glutathione-S-transferase- π gene; IFN, interferon; MDR1, multidrug resistance gene 1; MRP, multidrug resistance-associated protein gene; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction

素-テトラゾリウム (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-5-[3-carboxymethoxyphenyl]-2-[4-sulphophenyl]-2H-tetrazolium, MTS) 分析⁹⁾を行い、48時間培養後細胞生存率が80%から90%になる量に設定し薬剤の直接的細胞毒性濃度に達しない量とした。培養液中のIFN- α 濃度は 1×10^5 IU/mlであり、CDDP (ブリプラチン, ブリストルマイヤースクイブ, 東京) は $1 \mu\text{g/ml}$ であった。IFNは天然型IFN- α (スミフェロン, 住友製薬, 東京) を用い使用前に力価検定を実施した。

薬剤投与方法に関しては、薬剤非投与群をコントロール群とし、IFN- α 単独投与群、CDDP単独投与群、IFN- α , CDDP同時投与群を比較検討した。

Ⅲ. 培養細胞からの総RNAの抽出及びcDNAの合成

HepG2, HuH7, SK-Hep-1細胞を、直径60 mmプラスチックディッシュ (Becton Dickinson Labware) あたり 2.5×10^6 個播種後、直ちに薬剤投与を行い、48時間培養後各培養細胞からRNAを抽出した。RNeasy Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用い、DNA シュレッター (QIAGEN) 処理後、グアニジンフェノールクロロフォルム (acid guanidinium thiocyanate phenol chloroform) 法により総RNAを抽出した。総RNA 5 μg をDNA分解酵素 (Gibco) で室温にて15分間処理した後、オリゴデオキシチミジンプライマー (oligo dT primer, Gibco) 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ を0.5 μg 追加し、70°Cで15分間アニーリングを行った後、さらにスーパースク립トII 逆転写酵素 (Gibco) 200 ユニットの追加し、42°Cで50分間反応させた後、さらに反応を終了させるために70°Cで15分間反応させcDNAを合成した。

Ⅳ. 各種薬剤耐性遺伝子のプライマー領域の設定

薬剤耐性に関する遺伝子であるMDR1, MRP, DNAトポイソメラーゼII α , DNAトポイソメラーゼII β , GST- π および内部コントロールとしての β 2-ミクログロブリン (β 2-microglobulin) の各プライマーはそれぞれのエクソン領域に設定した。各プライマーの塩基配列は、従来の報告に従い以下の通りとした¹⁰⁻¹²⁾。

MDR1 (センス鎖5'-AAGCTTAGTACCAAAGAGGCTCTG-3', アンチセンス鎖5'-GGCTAGAAAGAATAGTGAAAACAA-3'), MRP (センス鎖5'-CGTGACTCCAACGCTG-3', アンチセンス鎖5'-CTGGACCGCTGACGC-3'), DNAトポイソメラーゼII β (センス鎖5'-GGCTCGATTGTTATTTCCAC-3', アンチセンス鎖5'-ATGTTGTAGAATTAAGAATAGC-3'), DNAトポイソメラーゼII α (センス鎖5'-GCTGTGGATGACAACCTC-3', アンチセンス鎖5'-CTGTGTTTCTGTCCACTAC-3'), GST- π (センス鎖5'-CTCACTCAAAGCCTCCTG-3', アンチセンス鎖5'-CTGCCTCACAATAGTCATCC-3'), β 2-ミクログロブリン (センス鎖5'-CTGAATTCACCCCA-3', アンチセンス鎖5'-ATCTCAAACCTCCATGATG-3')。

PCRはエクソタック酵素 (Ex Taq, 宝酒造, 大津) を用い、94°Cで4分間のホットスタートの後、94°Cで45秒間、57°Cで30秒間、72°Cで90秒間の条件でPCR反応を30サイクル行った。PCR産物は4%のエチジウムブロマイドを含むアガロースゲル (宝酒造) を用い電気泳動法にて分画した。

Ⅴ. 各種薬剤耐性遺伝子の発現量の定量

1. 希釈法

各種薬剤耐性遺伝子の発現量を定量するために、最初に希釈法にてPCRを行い、次に競合的PCRを実施した。各種薬剤耐性遺伝子のPCRプライマーを用いてPCR反応を行い、PCR産

物を同定した。Ⅲで述べた方法で調製したcDNAを下に述べるように希釈し、Ⅳで述べた様に希釈なしではじめてRT-PCRによる検出可能な発現量を (+) とした。 10^2 希釈以上で初めて検出可能な発現量を (2+), 10^3 希釈以上で (3+), 10^4 希釈以上で (4+) と定義した。また希釈なしで発現が認められないものを (-) と定義した。微量のcDNA量を定量することは現実に困難であり、実験開始時の細胞数にもとづく発現量の検討を行った。さらに同じ実験を6回行い再現性を確認した。

2. 競合的PCR法

希釈法で発現量に有意の差を認めたものについては競合的PCR法にて定量を行った¹³⁾。MDR1の競合鋳型DNAは、PCR MIMIC kit (CLONETECH, Palo Alto, USA) にて作製し、競合鋳型DNAとHepG2, HuH7, SK-Hep-1より作製したcDNAを細胞数 5×10^4 個分ずつPCRに用いた。PCR反応はアンプリタックゴールド酵素 (Amplitaq Gold, PERKIN ELMER, Branchburg, USA) を用いた。PCR反応効率をエクソタック酵素を用いた反応と比較検討したところ、アンプリタックゴールド酵素の65

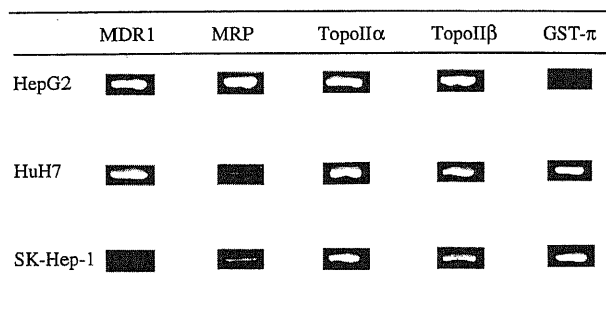


Fig. 1. Expression of MDR1, MRP, topoisomerase II α (Topo II α) and topoisomerase II β (Topo II β) in three hepatoma cell line.

Hepatoma cell line; HepG2, HuH7, SK-Hep-1. Genes expression were used RT-PCR method.

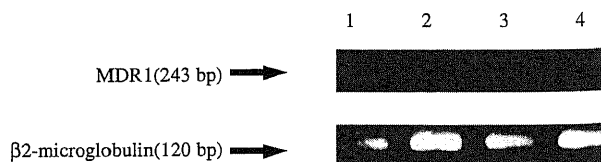


Fig. 2. Expression of MDR1 in HepG2 (2.5×10^5 cells) with or without drug treatment.

The band of 243 bp showed the MDR1 product by RT-PCR. Lane 1, without drugs; lane 2, with IFN- α (1×10^5 IU/ml); lane 3, with CDDP ($1 \mu\text{g/ml}$); lane 4, with both CDDP and IFN- α . β 2-microglobulin (120 bp) was used as the internal control.

サイクルで、エクソタック酵素の30サイクルと同等のPCR産物が得られた。したがって競合的PCRに用いたアンプリタックゴールド酵素を用いたPCR反応は94℃で45秒間、57℃で30秒間、72℃で60秒間の条件で65サイクル行った。

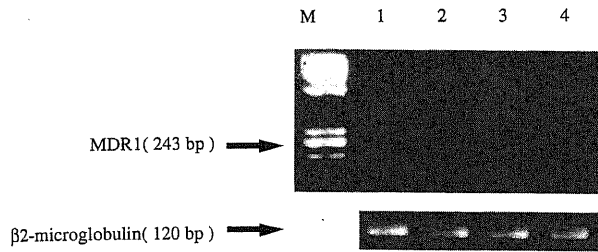


Fig. 3. Expression of MDR1 in SK-Hep-1 (2.5×10^6 cells) with or without drug treatment. The band of 243 bp showed the MDR1 product by RT-PCR. Lane 1, without drug; lane 2, with IFN- α (1×10^6 IU/ml); lane 3, with CDDP ($1 \mu\text{g/ml}$); lane 4, with both CDDP and IFN- α . M showed DNA markers ($\Phi \times 174$ DNA/Hae III). $\beta 2$ -microglobulin (120 bp) was used as the internal control.

成 績

I. RT-PCR法を用いた肝細胞癌培養細胞における薬剤耐性遺伝子 (MDR1, MRP, DNAトポイソメラーゼII α , DNAトポイソメラーゼII β , GST- π) の発現についての検討

図1はコントロールの薬剤非投与群における細胞数 2.5×10^6 個を用いた各種薬剤耐性遺伝子の発現の結果である。HepG2, HuH7, SK-Hep-1細胞の全ての肝癌培養細胞において、薬剤非投与群においてMDR1, MRP, DNAトポイソメラーゼII α , DNAトポイソメラーゼII β の発現が認められた。またGST- π の発現は細胞数 2.5×10^6 個ではHuH7, SK-Hep-1細胞で認められたがHepG2細胞では認められず、cDNA量を増加させても検出できなかった。

またSK-Hep-1細胞では薬剤非投与群でのMDR1の発現を認めるもののHepG2, HuH7細胞と比較すると発現が減弱していた。

以上よりHepG2, HuH7, SK-Hep-1の全ての肝癌培養細胞において、薬剤非投与群ですでにMDR1, MRP, DNAトポイソメラーゼII α , DNAトポイソメラーゼII β の発現が認められ、肝細胞癌の抗癌剤に対する耐性と関連があると思われた。また肝細胞癌由来細胞でも肝芽細胞腫系のHepG2ではGST- π の発現が認められず、肝細胞癌系のHuH7, SK-Hep-1ではGST- π の

Drug	Cells	Cell numbers				Expression
		2.5×10^6	2.5×10^4	2.5×10^3	2.5×10^2	
Non	HepG2	+	+	+	+	3+
	HuH 7	+	+	+	+	3+
	SK-Hep-1	+	+	+	+	+
IFN	HepG2	+	+	+	+	3+
	HuH 7	+	+	+	+	3+
	SK-Hep-1	+	+	+	+	-
CDDP	HepG2	+	+	+	+	3+
	HuH 7	+	+	+	+	3+
	SK-Hep-1	+	+	+	+	+
IFN+CDDP	HepG2	+	+	+	+	2+
	HuH 7	+	+	+	+	3+
	SK-Hep-1	+	+	+	+	+

Fig. 4. Expression of MDR1 in three hepatoma cell lines with or without drug treatment. Hepatoma cell line; HepG2, HuH7, SK-Hep-1 Non, without drugs; IFN, with IFN- α (1×10^6 IU/ml); CDDP, with CDDP ($1 \mu\text{g/ml}$); IFN + CDDP; with both CDDP and IFN- α . MDR1 gene expression were used semi-quantitative RT-PCR method. Transcription levels were scored as (+), (2+) and (3+) when cell numbers of up to 2.5×10^6 , 2.5×10^4 and above, 2.5×10^3 and above, respectively, were needed for detection of the RT-PCR product. A score of (-) was given when the RT-PCR product was not detectable even when cell numbers above 2.5×10^6 were used.

発現が認められたことより、細胞により薬剤耐性の機序が異なることも示唆された。

図2はHepG2の細胞数 2.5×10^5 個の薬剤投与によるMDR1の発現量の変化を示すが、薬剤非投与群(レーン1)に比較し、IFN- α 、CDDP同時投与群(レーン4)で減少する傾向が認められた。IFN- α 単独投与群(レーン2)、CDDP単独投与群(レーン3)では薬剤非投与群(レーン1)と比較してもMDR1の発現量に大きな変化は認められなかった。細胞数 2.5×10^5 個の内部コントロールの $\beta 2$ -ミクログロブリンは薬剤非投与群に比較して、IFN- α 単独投与群、CDDP単独投与群、IFN- α 、CDDP同時投与群で発現の変化は認められなかった。

図3はSK-Hep-1の細胞数 2.5×10^6 個での薬剤投与によるMDR1の発現量の変化を示している。薬剤非投与群(レーン1)に比較しIFN- α 単独投与群(レーン2)で発現が消失し、CDDP単独投与群(レーン3)で発現が増加し、IFN- α 、CDDP同時投与群(レーン4)で減少する傾向が認められた。細胞数 2.5×10^6 個の内部コントロールの $\beta 2$ -ミクログロブリンは薬剤非投与群に比較しIFN- α 単独投与群、CDDP単独投与群、IFN- α 、CDDP同時投与群で発現の変化は認められなかった。RT-PCRではMDR1、 $\beta 2$ -ミクログロブリン以外のバンドは認められなかった。

図4は希釈法でのHepG2、HuH7、SK-Hep-1の薬剤投与におけるMDR1の発現量の変化を細胞数あたりの変化で示したものである。HepG2では薬剤非投与群に比べて、IFN- α 単独投与群、CDDP単独投与群では発現量に変化は認められなかったがIFN- α 、CDDP同時投与群では細胞数 2.5×10^5 個で発現の抑制が認められた。HuH7ではcDNAを希釈してPCRを行っても薬剤投与によるMDR1の発現量の変化は認められなかった。またSK-Hep-1では細胞数 2.5×10^6 個で薬剤非投与群に比較して、IFN単独投与群でMDR1の発現の抑制が認められた。さらにSK-Hep-1におけるCDDP投与群では薬剤非投与群に比較して発現

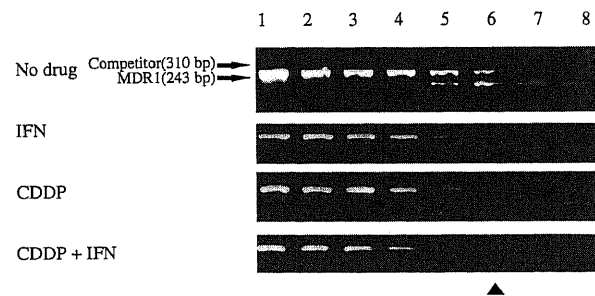


Fig. 5. Photograph of ethidium bromide-stained gel of competitive PCR product for MDR1 expression in HepG2.

The doses of MDR1 competitor DNA were as follows;

Lane 1, 2.6×10^{13} mol; Lane 2, 2.6×10^{14} mol;

Lane 3, 2.6×10^{15} mol; Lane 4, 2.6×10^{16} mol;

Lane 5, 2.6×10^{17} mol; Lane 6, 2.6×10^{18} mol;

Lane 7, 2.6×10^{19} mol; Lane 8, 2.6×10^{20} mol

No drug, without drug; IFN, with IFN- α (1×10^5 IU/ml); CDDP, with CDDP ($1 \mu\text{g/ml}$); IFN + CDDP, with both CDDP and IFN- α . For cells grown in the absence of drug, the MDR1 band (243 bp) showed a density similar to that for competitor DNA (310 bp) equivalent of 2.6×10^{18} mol (lane 6, marked with closed triangle).

は増強し、IFN、CDDP同時投与群では薬剤非投与群に比較して減弱している傾向が認められた。

またデータは示さなかったが、PCR希釈法によりHepG2では薬剤非投与群、IFN- α 単独投与群、CDDP単独投与群に比較して、IFN- α 、CDDP同時投与群ではMRPが細胞数 2.5×10^5 個で発現の抑制が認められた。同様に、HepG2では薬剤非投与群、IFN- α 単独投与群、CDDP単独投与群に比較して、IFN- α 、CDDP同時投与群ではDNAトポイソメラーゼII α とDNAトポイソメラーゼII β が細胞数 2.5×10^5 個で発現の抑制が認められた。しかしHuH7ではcDNAを希釈してPCRを行っても薬剤投与による各種薬剤耐性遺伝子の発現量の変化は認められなかった。SK-Hep-1では希釈法においては、薬剤投与によるMRP、DNAトポイソメラーゼII α 、DNAトポイソメラーゼII β の発現の変化は認められなかった。GST- π は細胞数 2.5×10^5 個で薬剤非投与群、IFN- α 単独投与群、CDDP単独投与群では発現量に変化は認められなかったが、IFN- α 、CDDP同時投与群ではGST- π の発現の抑制が認められた。

II. 競合的PCR法を用いた、肝癌培養細胞でのMDR1の発現量の定量

図5はHepG2での競合的PCRを用いたMDR1の発現量の変化を示したものである。薬剤非投与群では310 bpとなるように作製した競合DNAの 2.6×10^{18} molに相当するバンドと243 bpのMDR1の発現が同程度であり、薬剤非投与群でのMDR1の発現量は 2.6×10^{18} molであると推察された。HepG2では薬剤投与による変化は認めなかった。しかし、競合的PCRでの遺伝子の発現量を画像解析ソフトのNIH imageを用いコンピュータにて解析すると、図6に示すように薬剤非投与群に比較してIFN- α 、CDDP同時投与群では、競合型DNAの 2.6×10^{18} molの発現量に比較しMDR1の発現量の抑制が認められた。

データは示さなかったが、HuH7でも薬剤非投与群でのMDR1の発現は競合型DNAの 2.6×10^{18} molと同程度であり、MDR1の発現量は 2.6×10^{18} molであると推察されたが、薬剤投与による変化は認められなかった。

SK-Hep-1は薬剤非投与群のMDR1の発現が弱く、競合的

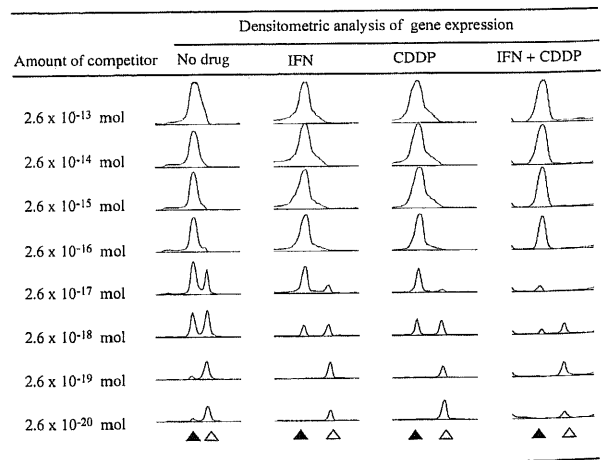


Fig. 6. Densitometric analysis of MDR1 expression in HepG2 by competitive PCR. Closed triangles, MDR1 gene; open triangles, competitor DNA.

PCRでの発現は認められなかった。またIFN- α 単独投与群、CDDP単独投与群、IFN- α 、CDDP同時投与群でも競合的PCRでのMDR1の発現は認められなかった。

考 察

CDDPの耐性機序については、細胞内薬物蓄積量の低下、DNA傷害修復の亢進、解毒性の亢進が考えられており薬剤耐性機序に関する様々な報告¹³⁻²¹がなされているがいまだ不明の点が多い。そこで今回、細胞内薬物蓄積量の低下に対し、薬剤の運搬に関する細胞膜糖蛋白P-170を発現する遺伝子であるMDR1、P糖蛋白と同様の働きをするとされる細胞膜糖蛋白P-190を発現する遺伝子MRP、2本鎖DNA傷害修復の亢進に関する酵素のDNAトポイソメラーゼII α とDNAトポイソメラーゼII β 、解毒性の亢進に関する酵素グルタチオン (glutathione, GSH) を利用し、毒性物質を中和する酵素グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (glutathione-S-transferase, GST) を発現する遺伝子であるGST- π の発現をRT-PCRにて検討した。

MDR1は正常肝での発現が高く、肝癌組織では非腫瘍部に比較して発現が亢進しているとの報告もあり¹⁴⁻¹⁶、ヒト肝癌培養細胞でもHepG2¹⁷、SK-Hep-1¹⁸での発現が報告されている。今回の結果ではHepG2、HuH7、SK-Hep-1の全てで発現が認められた。

従来の報告ではMDR1とCDDP耐性との関与は低いとされ、アドリアマイシン、ビンクリスチン耐性との関連が知られている⁴⁹。しかし慢性白血病由来細胞で、CDDP投与にてMDR1の発現が誘導され¹⁹、MDR1のプロモーター活性がCDDP投与により増強するとの報告もある²⁰。今回CDDP単独投与によりMDR1の発現が増強され、IFN- α とCDDPの同時投与によりMDR1の発現が低下したことより、肝細胞癌におけるCDDP耐性とMDR1の関連が明らかにされ、IFN- α によるCDDP耐性克服の可能性が示唆された。

MRPはドキシソルピシン、エトポシドとの関連は知られているがCDDP耐性との直接の関連性は報告されていない^{20,22}。しかし肝臓での解毒酵素であるGSH依存性のトランスポーターであり²³、HepG2でIFN- α 、CDDP同時投与によりMRPの発現が抑制されたことから、GSHを介した何らかの経路でMRPは間接的にCDDP耐性と関係している可能性が示唆された。

DNAトポイソメラーゼIIは、DNAの傷害修復が亢進している耐性細胞では、その遺伝子DNAトポイソメラーゼII α 、DNAトポイソメラーゼII β の発現は低下すると報告されている^{11,24}が、今回の結果では発現が亢進していた。Ederら²⁵はテニポシド耐性チャイニーズハムスター卵巣癌由来細胞にDNAトポイソメラーゼII遺伝子の突然変異遺伝子を遺伝子導入したところCDDP耐性が得られたと報告している。またKotohら²⁶は3種類のCDDP耐性癌細胞ではDNAトポイソメラーゼII遺伝子の発現に大きな変化は認められなかったと報告している。今回著者が用いたDNAトポイソメラーゼ遺伝子のプライマーはEderら²⁵の突然変異の領域は含んでいなかった。以上より肝癌由来培養細胞でのDNAトポイソメラーゼII遺伝子の発現量とCDDP耐性機序との関連は少なくDNAトポイソメラーゼII遺伝子の突然変異とCDDP耐性に関連があると考えられるため、DNAトポイソメラーゼ遺伝子の突然変異領域を含んだプライマーを用いたPCRでの再検討が必要であると考えられた。

GST- π はCDDP耐性に関与することが知られ、各種悪性腫

瘍で発現が亢進していると報告されており^{29,27}、ラットにおける化学物質誘発肝臓での発現の亢進も認められ肝癌発癌機序に関連していることが報告されている²⁸。肝癌由来培養細胞ではGST- π はHuH7で発現し、HepG2では発現が殆ど認められないと報告されており²⁸、今回の検討においても肝癌由来細胞でも肝芽細胞腫系のHepG2ではGST- π の発現が認められず、肝細胞癌系のHuH7、SK-Hep-1ではGST- π の発現が認められた。またSK-Hep-1ではGST- π は薬剤非投与群に比べて、CDDP単独投与群、IFN- α 単独投与群、IFN- α 、CDDP同時投与群のいずれでも発現が同じように低下していた。しかしCDDP単独投与群、IFN- α 単独投与群、IFN- α 、CDDP同時投与群の間では、発現の低下に有意の差は認められなかった。SK-Hep-1では細胞の成長はHepG2やHuH7に比べ早く、細胞増殖の程度の違いにより抗がん剤の細胞毒性の程度が違ってくるのが考えられ、その影響がこのような結果として現れたと考えられた。

IFN- α 投与にて発現の変化がみられたMDR1、GST- π はそれぞれ肝癌発癌機序に関与すると報告されており^{29,28}、MDR1のプロモーター領域は、c-raf キナーゼ、c-Ha-rasなどの前癌遺伝子やp53の発現と関与していると報告されており^{30,31}、IFN- α が肝細胞癌の発癌、進展に関与していることも示唆された。

今回使用した細胞ではそれぞれp53の表現型が異なり、HepG2とSK-Hep-1は野生株のp53遺伝子であり、HuH7ではコドン220の突然変異をもつ変異株であると報告されている⁷。今回の結果が肝癌培養細胞の種類により異なることと、p53の表現型、遺伝子異常と関連していることが示唆された。またSK-Hep-1以外の他の肝癌培養細胞では薬剤非投与でのMDR1の発現が強く認められており、MDR1のmRNA定量法による検討には限界があると考えられた。

今後MDR1の発現についてルシフェラーゼ (luciferase) やクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (chloramphenicol acetyltransferase, CAT) などの外来性発現遺伝子導入による、MDR1プロモーター活性の検討が必要と思われる。

結 論

1. HepG2, HuH7, SK-Hep-1の肝癌培養細胞において薬剤耐性に関与する遺伝子、MDR1, MRP, DNAトポイソメラーゼII α 、DNAトポイソメラーゼII β の発現が認められた。
2. GST- π の発現はSK-Hep-1, HuH7で認められたが、HepG2では認められなかった。
3. HepG2, HuH7, SK-Hep-1の肝癌培養細胞ではいずれも強い抗がん剤自然耐性を示しその耐性機序は由来細胞により異なることが示唆された。
4. IFN- α とCDDPの同時投与により、HepG2でMDR1, MRPの発現が低下し、SK-Hep-1でMDR1, GST- π の発現が低下することがRT-PCRおよび競合的PCRにて明らかにされた。

以上より進行肝臓におけるIFN- α とCDDP併用化学療法の有効性が示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御検閲を賜りました恩師小林健一教授に深く感謝の意を表します。また本研究を進めるに際し直接御指導、御助言をいただきました金沢大学第一内科金子周一助教授、金沢赤十字病院内科下田敦先生に対し厚く御礼を申し上げるとともに、本研究にご協力いただいた、金沢大学第一内科第二研究室の皆様にも深く感謝いたします。

ます。

本論文の要旨は第38回消化器病学会総会、第31回肝臓学会西部会、第33回肝臓学会総会において発表した。

文 献

- 1) Johnson SW, Shen DW, Pastan I, Gottesman MM, Hamilton TC. Cross-resistance, cisplatin accumulation, and platinum-DNA adduct formation and removal cisplatin-sensitive and -resistant human hepatoma cell line. *Exp Cell Res* 226: 133-139, 1996
- 2) Yao KS, Godwin AK, Johnson SW, Ozols RF, O'Dwyer JP, Hamilton TC. Evidence for altered regulation of γ -glutamylcysteine synthetase gene expression among cisplatin-sensitive and cisplatin-resistant human ovarian cancer cell lines. *Cancer Res* 55: 4367-4374, 1995
- 3) Kotoh S, Naito S, Yokomizo A, Khono K, Kuwano M, Kumazawa J. Enhanced expression of γ -glutamylcysteine synthetase and glutathione-S-transferase gene in cisplatin-resistant bladder cancer cells with multidrug resistance phenotype. *J Urol* 157: 1054-1058, 1997
- 4) Kang Y, Perry RR. Modulatory effects of tamoxifen and recombinant human α -interferon on doxorubicin resistance. *Cancer Res* 53: 3040-3045, 1993
- 5) Scala S, Pacelli R, Iaffaioli RV, Normanno N, Pepe S, Frasci G, Genua G, Tsuruo T, Tagliaferri P, Bianco AR. Reversal adriamycin resistance by recombinant α -interferon in multidrug-resistant human colon carcinoma LoVo-doxorubicin cells. *Cancer Res* 51: 4898-4902, 1991
- 6) Urabe T, Kaneko S, Matsushita E, Unoura M, Kobayashi K. Clinical pilot study of intrahepatic arterial chemotherapy with methotrexate, 5-fluorouracil, cisplatin and subcutaneous interferon-alpha-2b for patients with locally advanced hepatocellular carcinoma. *Oncology* 55: 39-47, 1998
- 7) Hsu IC, Tokiwa T, Bennett W. p53 gene mutation and integrated hepatitis B viral DNA sequences in human liver cancer cell lines. *Carcinogenesis* 14: 987-992, 1993
- 8) Cory AH, Owen TC, Barltrop JA, Cory JG. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assay in culture. *Cancer Commun* 3: 207-212, 1991
- 9) Abe Y, Nakamura M, Ota E, Ozeki Y, Tamai S, Inoue H, Ueyama Y, Ogata T, Tamaoki N. Expression of the multidrug resistance gene (MDR1) in non-small cell lung cancer. *Jpn J Cancer Res* 85: 536-541, 1994
- 10) Noonan KE, Beck C, Holzmayer TA, Chin JE, Wunder JS, Andrulis IL, Gazdar AF, Willman CL, Griffith B, Von Hoff DD, Roninson IB. Quantitative analysis of MDR1 (multidrug resistance) gene expression in human tumors by polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 7160-7164, 1990
- 11) Beck J, Niethammer D, Gekeler V. High MDR1- and MRP-, but low topoisomerase II α -gene expression in B-cell chronic lymphocytic leukemias. *Cancer Lett* 86: 135-142, 1994
- 12) Marie JP, Simonin G, Legrand O, Delmer A, Faussat AM, Lewis AD, Sikic BI, Zittoun R. Glutathione-S-transferase π , α , μ and MDR1 mRNA expression in normal lymphocytes and chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 9: 1742-1747, 1995
- 13) Paul DS, James WL. Competitive PCR. *Nature* 359: 557-558, 1992
- 14) Huang C, Wu M, Xu G, Li D, Cheng H, Tu Z, Jiang H, Gu J. Overexpression of the MDR1 gene and P-glycoprotein in human hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 84: 262-264, 1992
- 15) Chenivresse X, Franco D, Brechot C. MDR1 (multidrug resistance) gene expression in human primary liver cancer and cirrhosis. *J Hepatol* 18: 168-172, 1993
- 16) Itsubo M, Ishikawa T, Toda G, Tanaka M. Immunohistochemical study of expression and cellular localization of the multidrug resistance gene product P-glycoprotein in primary liver carcinoma. *Cancer* 73: 298-303, 1994
- 17) Gant TW, Silverman JA, Thorgeirsson SS. Regulation of P-glycoprotein gene expression in hepatocyte cultures and liver cell lines by a trans-acting transcriptional repressor. *Nucleic Acids Res* 20: 2841-2846, 1992
- 18) Kim-JH, Chung-JB, Park-IS. Combined use of tamoxifen, cyclosporin A, and verapamil for modulating multidrug resistance in human hepatocellular carcinoma cell lines. *Yonsei Med J* 34: 35-44, 1993
- 19) Chaudhary PM, Roninson IB. Induction of multidrug resistance in human cells by transient exposure to different chemotherapeutic drugs. *J Natl Cancer Inst* 85: 632-639, 1993
- 20) 内海 健, 桑野信彦, 河野公俊, 谷村秀行. 多剤耐性のメカニズムとその臨床応用, MDR1プロモーターとストレス応答. *Mol Med* 30: 696-702, 1993
- 21) Grant CE, Valdimarsson G, Hipfner DR, Almquist KC, Cole SPC, Deeley RG. Overexpression of multidrug resistance-associated protein (MRP) increase resistance to natural product drugs. *Cancer Res* 54: 357-361, 1994
- 22) 阿部竜也, 森照明, 堀重昭, 小池浩次, 桑野信彦. P糖蛋白質以外の抗癌薬耐性関連因子, 多剤耐性関連蛋白 (MRP). *日本臨床* 55: 1077-1082, 1997
- 23) Loe DW, Almquist KC, Deeley RG, Cole SS. Multidrug resistance protein (MRP) -mediated transport of leukotrien C, and chemotherapeutic agents in membrane vesicles: demonstration of glutathione-dependent vincristine transport. *J Biol Chem* 271: 9675-9682, 1996
- 24) Hasegawa S, Abe T, Naito S, Kotoh S, Kumazawa J, Hipfner DR, Deeley RG, Cole SPC, Kuwano M. Expression of multidrug resistance - associated protein (MRP), MDR1 and DNA topoisomerase II in human multidrug - resistance bladder cancer cell lines. *Br J Cancer* 71: 907-913, 1995
- 25) Eder JPJ, Chan VT-W, Niemierko E. Conditional expression of wild -type topoisomerase II complements a mutant enzyme in mammalian cells. *J Biol Chem* 268: 13844-13849, 1993
- 26) Kotoh S, Naito S, Yokomizo A. Increased expression of DNA topoisomerase II gene and collateral sensitivity to camptothecin in human cisplatin - resistant bladder cancer cells. *Cancer Res* 54: 3248-3252, 1994
- 27) 高山哲治, 高橋康雄, 新津洋司郎. GST- π . *臨床検査* 39: 450-453, 1995

- 28) Kitahara A, Satoh K, Nishimura K, Ishikawa T, Ruike K, Sato K, Tsuda H, Ito N. Changes in molecular forms of rat hepatic glutathione-S-transferase during chemical hepatocarcinogenesis. *Cancer Res* 44: 2698-2703, 1984
- 29) Grace B, Radhakant S, Srinivasan R. P-glycoprotein expression during tumor progression in the rat liver. *Cancer Res* 52: 5154-5161, 1992
- 30) Chin KV, Ueda K, Pastan I, Gottesman MM. Modulation of activity of the promoter of the human MDR1 gene by ras and p53. *Science* 255: 459-462, 1992
- 31) Cornwell MM, Smith DE. A signal transduction pathway for activation of the MDR1 promoter involves the proto-oncogene c-raf kinase. *J Biol Chem* 268: 15347-15350, 1993

The Expression of Drug Resistance-Related Genes in Three Human Hepatoma Cell Lines and Modulation of the Resistance to Cisplatin by Combined Treatment with CDDP and IFN- α Aki Takeuchi, First Department of Internal Medicine, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — *J. Juzen Med Soc.*, **108**, 547 — 553 (1999)

Key words hepatocellular carcinoma, cisplatin, chemotherapy, drug resistance, interferon- α

Abstract

Cisplatin (CDDP) is a key compound in the chemotherapy of liver cancers. The molecular mechanism of multiple drug resistance to CDDP in the chemotherapy of hepatoma, however, is not yet well defined. Our previous studies showed that two years survival rates were higher in patients with a combined CDDP and interferon- α treatment than in those treated with CDDP alone. Including both complete and partial remission a two years survival rate of 76.2% was observed for the combined treatment, indicating that interferon- α may have anti-drug resistance action in hepatoma. To elucidate further insights into the mechanism of CDDP resistance we examined the gene expression of the multidrug resistance gene 1 (MDR1), multidrug resistance-associated protein gene (MRP), DNA topoisomerase II α , II β , and glutathione-S-transferase π gene (GST- π) in human hepatoma. Both semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and competitive PCR were used to examine the levels of these gene transcripts in human hepatoma cell lines including HepG2, HuH7, and SK-Hep-1. The results demonstrated that MDR1, MRP, topoisomerase II α , II β genes were strongly expressed in these cells without any drug treatment. There were also some variations found in the level of gene expression between the different cell lines. The gene expression of GST- π was detected in HuH7 and SK-Hep-1, but not in HepG2. Addition of CDDP alone increased the expression of MDR1, and addition of IFN- α alone suppressed the expression of MDR1 in SK-Hep-1. Combined treatment with CDDP and IFN- α suppressed the expression of MDR1 and MRP in HepG2 cells, and the expression of MDR1 in SK-Hep-1 cells. In short, these results indicate that IFN- α treatment may decrease the expression of drug resistance related genes in human hepatoma cell lines.