

P1-208 分裂期チェックポイント機能と抗がん剤感受性

兵庫県立成人病センター研究部¹, 愛媛大², 兵庫県立成人病センター³
 須藤 保¹, 小島淳美¹, 山口 聡³, 草薙康城², 伊藤昌春², 西村隆一郎¹

【目的】細胞は分裂期前中期において1) 染色体が赤道上に並んでいるか, 2) 染色体に損傷がないかを見極めた上で, 娘細胞へと均等に分配させる. この監視機構を分裂期チェックポイント (以下 SAC) と呼ぶ. がん細胞にとってみれば分裂のたびに遺伝子不安定性を高めることができるだけに, 多くのがんにおいてこの SAC 機能が低下していることが考えられる. SAC がタキサン系薬剤の効果に必須であることが報告されているが, 我々は他の作用機序を有する抗がん剤においても, SAC 機能が重要かどうかを検討した. 【方法】HeLa 細胞を用いて SAC の構成因子 Mad2 を siRNA によってノックダウンし, SAC 機能低下のモデルとした. 白金製剤 (CDDP, CBDCA), DNA 合成阻害剤 (SN-38, doxorubicin) 投与を行い, MTT 法による IC50 の値で感受性評価をおこなった. 【成績】SAC 低下細胞はコントロール細胞と比し, 白金製剤投与では有意な差は認めなかったが (低下細胞 vs コントロール細胞: 0.39 vs 0.29 μ g/ml (CDDP), 7.7 vs 6.0 μ g/ml (CBDCA)), DNA 合成阻害剤投与では抵抗性を示した (0.13 vs 0.06 μ g/ml (doxorubicin), 3.3 vs 1.7ng/ml (SN-38)). 【結論】SAC 低下によりタキサン系薬剤に対して著しい抵抗性を示すことが既に報告されているが, DNA 合成阻害剤感受性においても SAC が重要であることがわかった. 一方, 白金製剤感受性では SAC は関係しなかった. 今後, SAC の機能を評価することにより薬剤選択が可能になることが考えられた.

P1-209 抗癌剤 Vincristine (VCR) 投与後の Weanling (W) マウスと Adult (A) マウスの毒性の違い—薬剤耐性遺伝子ノックアウトマウスを用いた in vivo の検討—

東海大¹, 東海大大磯病院²
 村松俊成¹, 飯田哲士¹, 平澤 猛¹, 村上 優², 和泉俊一郎¹

【目的】薬剤耐性遺伝子によって作られる ATP-binding cassette transporter は抗癌剤を細胞外に排出させる重要な役割を担っている. われわれは薬剤耐性遺伝子ノックアウトマウスを用い, 年齢の異なるマウスに抗癌剤を投与しそれぞれの毒性の違いと, 野生マウス (WT) およびノックアウトマウスの各臓器内の VCR 濃度についても比較した. 【方法】C57BL/6 野生 (WT) マウスと multidrug resistance associated protein1 (Mrp1) および P-glycoprotein (Mdr1a/1b) 遺伝子をそれぞれノックアウトした Mrp1 (KO), Mdr1a/1b (DKO), Mrp1, mdr1a/1b (TKO) マウスの Weanling (W): 生後3週マウスと Adult (A): 生後8-12週マウス3-4匹に, VCR を WT: 4.0 と 6.0mg/kg, KO: 2.0 と 4.0mg/kg, DKO: 0.5 と 1.0mg/kg, TKO: 0.0625 と 0.125mg/kg を腹腔内投与し生存率と生存期間を調べた. また, [³H] VCR 投与後, 2時間, 4時間, 8時間後の WT マウスと TKO マウスの各臓器内の VCR 濃度をそれぞれ比較した. 【成績】異なる遺伝子マウスで, W マウスは A マウスより高い死亡率と短期生存を認めた. 特に TKO マウスは微量の VCR 投与で W マウスが高い死亡率だった. 各臓器内の VCR 濃度は, WT マウスでは8時間後の W マウスの肺, 脾臓に, TKO マウスでは4時間後の W マウスの心臓, 腎臓に高濃度を示した. 【結論】同じ投与量の VCR に対して W マウスが A マウスより高い死亡率 (毒性) を示し, 主要臓器内に高濃度の VCR が確認された. これはヒトの小児と成人においても, たとえ抗癌剤の投与量 (mg/kg) が同じでも小児の方が強い薬物毒性を示すことが考えられた.

P1-210 新しい CDDP 耐性化機序とその克服法の発見: CDDP 耐性癌細胞における death-associated protein kinase (DAPK) mRNA 翻訳障害の意義

和歌山県立医大
 田中哲二, 宇都宮智子, 梅咲直彦

【目的】CDDP 耐性克服法の開発. 【方法】ヒト子宮頸部扁平上皮癌株から, CDDP 長期暴露法と限界希釈法で単細胞由来耐性株を6株樹立. CDDP 感受性試験と DNA 断片化アッセイで耐性化確認. 脱メチル化剤 5AZ-CdR 処理及びヒストン脱アセチル化阻害剤 TSA 処理時の CDDP 感受性変化解析と DAPK 蛋白発現を western blot 解析. 定量 RT-PCR 法で DNA methyltransferase (DNMT1, DNMT3A, DNMT3B) 及び DAPK mRNA 発現を比較. DAPK promotor メチル化を DAPK 特異的メチル化アッセイで検出. 【成績】5AZ-CdR と CDDP の同時処理は耐性株と親株の CDDP 感受性を回復させ, 24時間 5AZ-CdR 処理後の CDDP 暴露は, 耐性株全6株で CDDP 感受性回復を認めず, 3耐性株で DNMT3B 発現著増し, 5AZ-CdR 処理による CDDP 感受性回復が軽度の3株に一致. 4耐性株に親株同様の DAPK promotor メチル化を認め, 2耐性株にはメチル化を検出せず. 親株は 5AZ-CdR 単独処理で DAPK 蛋白発現亢進, 5AZ-CdR と TSA との併用処理は相乗的に DAPK 蛋白発現を促進した. 耐性6株全てが 5AZ-CdR 処理にも TSA との同時処理にも DAPK 蛋白発現誘導を認めず, 3耐性株は著明な DAPK mRNA 発現亢進, 全6耐性株で親株より DAPK mRNA 発現が高かった. 【結論】5AZ-CdR 処理は CDDP 耐性を一過性に回復させ, 耐性株で効果が持続しないのは DNMT 発現亢進に一因する. 可逆的に長時間脱メチル化を維持できる薬剤は臨床的 CDDP 耐性癌に治療応用が可能である. 耐性癌細胞は CDDP 耐性獲得過程で DAPK 翻訳障害を獲得し, 5AZ-CdR と TSA の同時処理にも応答を呈し, この翻訳障害獲得は新しい CDDP 耐性化機序に関与し, 耐性獲得の一分子マーカーになる. 定説を覆し, DAPK 蛋白発現は mRNA 翻訳レベルでの調節が大きいことを実証した.