

主論文の要旨

**Establishment of New Intraperitoneal Paclitaxel-Resistant
Gastric Cancer Cell Lines and
Comprehensive Gene Expression Analysis**

〔 腹腔内投与 paclitaxel 抵抗性胃癌細胞株の新規樹立と
網羅的遺伝子発現解析 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 機能構築医学専攻
病態外科学講座 消化器外科学分野

(指導：小寺 泰弘 教授)

村上 弘城

【緒言】

診断、治療法の発達により胃癌患者の生存率は向上したが胃癌はいまだ主要な死亡原因の一つとなっている。腹膜播種は根治的手術を施行された胃癌患者における再発様式の 40-60%を占める最も重要な予後因子であるが、化学療法などの治療法は進歩したにも関わらず標準的治療法は確立されていない。paclitaxel は微小管脱重合を阻害することで卵巣癌、胃癌などの上皮性腫瘍に対して抗腫瘍効果を示し、その薬理学的特性により腹腔内投与された際に長時間にわたり腹腔内で高濃度を保つことができ前臨床研究において優れた抗腫瘍効果を認めた。paclitaxel 腹腔内投与が安全で有効な治療法であることはこれまでに卵巣癌腹膜播種臨床例において報告されており、胃癌腹膜播種症例に対する paclitaxel 腹腔内投与についてのいくつかの臨床試験においても効果の期待できる治療法であることが示されてきた。臨床的に重要な問題はこれらの腹膜播種症例がしばしば paclitaxel に対して抵抗性を示すことであり、paclitaxel 抵抗性のメカニズムとしてこれまでに ABC トランスポーターの過剰発現などの関与が報告されている。しかし、従来の paclitaxel 抵抗性に関する研究は *in vitro* で樹立された paclitaxel 抵抗性卵巣癌細胞株を使用したものであり、胃癌腹膜播種症例における *in vivo* での paclitaxel 抵抗性関連因子に関する報告はなされていない。そこで今回の研究では胃癌腹膜播種症例における腹腔内投与 paclitaxel 抵抗性関連因子探索を目的として *in vivo* selection method により新たに 3 種類の paclitaxel 抵抗性胃癌細胞株を樹立し、さらにこれらの細胞株を用いて網羅的遺伝子発現解析を行った。

【方法と結果】

***in vivo* selection method による paclitaxel 抵抗性胃癌細胞株の樹立**

1) 3 種類のヒト胃癌由来培養細胞(GCIY、GPM1、MKN28)を各々 5×10^6 個ずつ調整し 6 週齢のマウスの腹腔内に注入して腹膜播種モデルを作成し、これらに対して paclitaxel 腹腔内投与(25mg/ kg/ 週)を週 1 回、計 6 回施行した。最終の paclitaxel 投与後にマウスを解剖し腹膜播種巣を摘出して播種巣の細胞を培養した。この作業を 2-3 回繰り返すことで各 cell line における腹腔内投与 paclitaxel 抵抗性胃癌細胞株を樹立した(*in vivo* selection method)。MKN28 は他の 2 種類の cell line と比較し paclitaxel に対する感受性が高く、同様の paclitaxel 投与を行うと腫瘍が消失してしまうため治療回数を減じて施行した。 2) 樹立した 3 種類の腹腔内投与 paclitaxel 抵抗性胃癌細胞株とその親株の細胞を 96well プレートに 1well あたり 1×10^4 個ずつ培養した。細胞を播種した 24 時間後から 3 日間にわたり細胞数を計測し細胞増殖能の比較を行い、さらに paclitaxel 抵抗性株とその親株の細胞形態の比較を行った。GCIY-PTXR3、GPM1-PTXR2 についてはそれぞれの親株と比較し *in vitro* における細胞増殖能は有意に増強し、その形態もより凝集の少ない円形様に変っていたが、MKN28-PTXR3 では他 2 種と比較して親株との相違が目立たなかった。 3) 96well プレートに 1well あたり 1×10^4 個/ 0.2ml の細胞を各濃度の paclitaxel とともに培養し 72 時間後の細胞数を計測して paclitaxel の細胞増殖抑制効果を比較した。

GCIY-PTXR3 と GPM1-PTXR2 ではその親株と比較して paclitaxel 低濃度から paclitaxel 抵抗性の増強を確認できたが、MKN28-PTXR3 では paclitaxel 抵抗性増強を確認できたのは一部の濃度のみであった。4) 前出の 6 種の細胞株を 5×10^6 個/0.3ml ずつ調整しそれぞれをマウスの腹腔内に注入し in vivo 腹膜播種モデルを作成した。これらを paclitaxel 腹腔内投与治療群と未治療群に分け治療群では細胞を注入した 2 日後から 1 週間毎に計 5 回の paclitaxel 腹腔内投与治療を行った。各細胞株において Kaplan-Meier 生存分析を行い治療群と未治療群の生存期間の比較を行ったところ、いずれの cell line においても親株では paclitaxel 治療群で生存期間の延長を認めた。各 paclitaxel 抵抗性株においてはその親株と比較して paclitaxel 治療による生存期間延長は軽度であり、特に GCIY-PTXR3 では paclitaxel 治療群と未治療群の間で生存期間にほとんど差を認めなかった。こうした in vitro、in vivo での検討より paclitaxel 抵抗性増強の相対強度は GCIY-PTXR3 > GPM1-PTXR2 > MKN28-PTXR3 となっていると考えられた。

paclitaxel 抵抗性関連遺伝子の探索

paclitaxel 抵抗性関連遺伝子の探索を目的とし、約 25,000 個の遺伝子を搭載した oligo DNA chip “3D Gene”を用いた microarray により各細胞株における遺伝子発現を解析した。はじめに、各 cell line で paclitaxel 抵抗性株がその親株の約 2 倍の発現増強を示す遺伝子を選別した。更に少なくとも 2 種類の cell line で共通して paclitaxel 抵抗性株における発現増強を認める遺伝子を選別を行ったところ 78 個の遺伝子が抽出された。また先の実験より 3 種類の cell line の間で paclitaxel 抵抗性増強に差があると考えられ(GCIY>GPM1>MKN28)、各 cell line の paclitaxel 抵抗性株とその親株の遺伝子発現差について Cluster 2.0 software と TreeView program を使用して階層別クラスター解析を行った。各 cell line における paclitaxel 抵抗性株と親株との発現差が cell line 間の paclitaxel 抵抗性増強の差と同様の傾向を示すクラスターに含まれる遺伝子を抽出した。これらの解析から選別された遺伝子について qRT-PCR にて遺伝子発現を検証し paclitaxel 抵抗性関連遺伝子の候補を絞り込んだ。さらに paclitaxel による治療歴を有する胃癌症例 37 例から time to treatment failure(TTF) にて paclitaxel 感受性(long TTF)群として 7 例、paclitaxel 抵抗性(short TTF)群として 5 例を選別し、両群の臨床検体において paclitaxel 抵抗性関連候補遺伝子の qRT-PCR による発現定量を行った。この結果、ERBB2IP、KIF23、ATAD2、PHF19 の 4 個の遺伝子は臨床検体の paclitaxel 抵抗性群において有意に発現が増強しており、最終的に paclitaxel 抵抗性関連候補遺伝子として選別した。

【考察】

今回の研究において、これまでに報告のない in vivo での 3 種類の paclitaxel 抵抗性胃癌細胞株を新たに樹立したが、これらは今後の paclitaxel に対する抵抗性獲得のメカニズムを理解する上で役立つことが期待できる。またこれまでに報告されている

in vitro で樹立した paclitaxel 抵抗性卵巣癌細胞株を用いた研究では paclitaxel 抵抗性への ABC トランスポーター関連遺伝子などの関与が報告されてきたが、今回の研究ではそれらの遺伝子の発現に有意な変化は認めなかった。これは胃癌と卵巣癌の癌腫の違い、あるいは in vivo と in vitro での paclitaxel に対する抵抗性獲得のメカニズムに違いがあるのかもしれない。

今回樹立した paclitaxel 抵抗性胃癌細胞株とその親株を用いて microarray による発現差解析、階層別クラスター解析を行い paclitaxel 抵抗性関連遺伝子の候補として 4 個の遺伝子 (KIF23、ERBB2IP、ATAD2、PHF19) を選別した。これらは 2 つのグループに分類でき、1 つ目のグループは KIF23 と ERBB2IP を含み、特徴として細胞周期依存性に発現し紡錘体形成に関与することが挙げられる。KIF23 は細胞骨格形成に関与することが知られており、G₂/M 期を推進するために paclitaxel 抵抗性株での発現が増強しているものと考えられる。ERBB2IP は上皮成長因子受容体に関係しているが paclitaxel 抵抗性株における発現増強は紡錘体形成を正常化するために起こっていることが推測される。2 つ目のグループは ATAD2 と PHF19 で、これらはエピジェネティックな遺伝子発現制御に関与することが最近明らかとなった遺伝子である。ATAD2 は H3K14ac のようなヒストンのアセチル化を特異的に認識しアンドロゲンやエストロゲン受容体発現の正常化に働き、PHF19 は抑制的なクロマチン修飾因子として H3 Lys36 に結合するポリコーム蛋白の 1 つであると報告されている。しかし、これまでのところこれら 2 つの遺伝子と paclitaxel 抵抗性との関係はよくわかっておらず更なる研究が必要である。

【結語】

3 種類の腹腔内投与 paclitaxel 抵抗性胃癌細胞株を in vivo selection method にて新規に樹立し、これらを用いた遺伝子発現解析より 4 個の paclitaxel 抵抗性関連候補遺伝子を選別した。これらの細胞株は今後、paclitaxel 抵抗性のメカニズムを理解し新しい治療法を研究するための有用な前臨床モデルとなることが期待される。また 4 個の候補遺伝子については paclitaxel 抵抗性における詳細な役割は不明であり、その解明には今後更なる研究が必要であるが paclitaxel 抵抗性予測因子となり得るものだと考える。