

## cis-diamminedichloroplatinum (Ⅱ) 耐性ヒト精巣セミノーマ株 (JKT/DDP) の樹立と Real Time PCR による CDDP 代謝に関連する抗癌剤耐性関連遺伝子の検討

小林 達也

ヒト精巣セミノーマ由来の樹立株である高転移株 (JKT-HM) を用い、長期、少量、間歇的に cis-diamminedichloroplatinum (Ⅱ) (CDDP) を投与することによって CDDP 耐性株 (JKT/DDP) の作成を試みた。その後、original 細胞であるヒト精巣セミノーマ株 (JKT-1)、その高転移株である JKT-HM と成長曲線、CDDP 感受性、CDDP 細胞内濃度について *in vitro* で比較検討した。その結果、JKT/DDP は通常の CDDP 無添加の培養においては JKT-1、JKT-HM と比較して、成長曲線に差は認めなかった。しかし、CDDP 添加による培養では、明らかに成長曲線に差を認めた。また、CDDP 存在下で細胞形態を観察すると、JKT-1、JKT-HM では細胞質が分葉化し、クロマチンの凝集を認めたが、JKT/DDP では紡錘形の細胞が数石状の増殖を示していた。CDDP に対する感受性について、 $IC_{50}$ 、Collagen gel drop embedded drug sensitivity test (CD-DST) 法で検討した結果、JKT/DDP は他の2つの細胞株と比較して、有意に CDDP 耐性を示した。よって、CDDP 耐性細胞を樹立したと考えられた。次に、JKT-1、JKT-HM および、JKT/DDP における CDDP 細胞内濃度、CDDP 細胞質内代謝に関連する抗癌剤耐性関連遺伝子 (Multidrug resistance 1, MDR1; Multidrug resistance associated protein, MRP; Lung resistance-related protein, LRP; Glutathione-S-transferase  $\pi$ , GST- $\pi$ ) の発現について検討した。CDDP 細胞内濃度は JKT/DDP で他の2種類の細胞よりも低下しており、また、MDR1, MRP, LRP, GST- $\pi$  の mRNA の発現について Real Time PCR で検討したところ、JKT/DDP は、JKT-1、JKT-HM に比べて MDR1, MRP, GST- $\pi$  遺伝子が有意に発現の亢進が認められた。よって、JKT/DDP は JKT-1、JKT-HM に比較して、CDDP に対して耐性を示しているとともに、CDDP に対する耐性の機序のひとつに CDDP の細胞外への能動的な排出の亢進が関与していることが示唆された。

(平成14年8月29日受理)

### Establishment of cis-diamminedichloroplatinum (Ⅱ) - resistant Human Testicular Seminoma Cell Line JKT/DDP and Analysis of the Expression of the Genes Related to Anticancer Drug-resistance associated with Cytoplasmic CDDP Metabolism

Tatsuya KOBAYASHI

Using a highly metastatic human testicular seminoma cell line, JKT-HM, a CDDP-resistant cell line, JKT/DDP, was established by long-term intermittent administration of a low dose of cis-diamminedichloroplatinium(II) (CDDP). CDDP-resistance was investigated in vitro by comparison of the growth curves, CDDP-sensitivity, and intracellular CDDP concentrations of the established cell line, JKT/DDP, the original human seminoma cell line, JKT-1, and its highly metastatic derivative, JKT-HM. The growth curve and doubling time of JKT/DDP were not significantly different from those of JKT-1 or JKT-HM in culture without CDDP. However, in the presence of CDDP in culture, there was a significant difference in the growth curve. Morphological observations revealed segmentation of the cytoplasm and aggregation of chromatin in JKT-1 and JKT-HM. In contrast, in JKT/DDP, spindle-shaped cells showed cobblestone growth. In addition, the  $IC_{50}$  values of CDDP determined by the collagen gel drop embedded drug sensitivity test (CD-DST) showed JKT/DDP to be significantly more resistant to CDDP than the other two cell lines. Therefore, a CDDP-resistant cell line was established. Next, we investigated the expression of the genes (Multidrug resistance 1, MDR1; Multidrug resistance associated protein, MRP; Lung resistance-related protein, LRP; Glutathione-S-transferase  $\pi$ , GST- $\pi$ ) related to anticancer drug-resistance associated with the intracellular CDDP concentration and cytoplasmic CDDP metabolism in JKT-1, JKT-HM, and JKT/DDP. The intracellular CDDP concentration was lower in JKT/DDP than in the other two cell lines. mRNA expression of MDR1, MRP, LRP, and GST- $\pi$  was investigated by a real-time PCR. The expression levels of MDR1, MRP, and GST- $\pi$  were significantly higher in JKT/DDP than in JKT-1 and JKT-HM. It was suggested that JKT/DDP acquired CDDP-resistance, and that an increased active exudation of cytoplasmic CDDP was involved in the acquisition of this CDDP-resistance. (Accepted on August 29, 2002) *Kawasaki Igakkaishi* 28(3): 175-183, 2002

**Key Words** ① CDDP-resistant cell line  
 ② Active exudation of cytoplasmic CDDP  
 ③ MDR1, MRP, LRP, GST- $\pi$

## はじめに

我々は、いままでに世界初のヌードマウス移植可能なヒト精巣腫瘍由来セミノーマ株 (JKT-1) の樹立に成功し<sup>1)</sup>, さらに, その高転移株 (JKT-HM) を Boyden chamber 法により作成, 樹立した<sup>2)</sup>. また, これらの細胞株はすでに 300 継代以上を経ても安定増殖し, なおかつ, 他の胚細胞腫瘍への分化も認められていない. 精巣腫瘍は若年男性において発生頻度が高く, 中でもセミノーマは最も高頻度である<sup>3)</sup>. 臨床的には, セミノーマは抗癌剤感受性が極めて高い固形腫瘍と知られており<sup>4)</sup>, 現在, シスプラ

チン (CDDP) を中心とした抗癌化学療法によって, その予後は著しく改善されている. 一方, Stage III 以上の転移病巣を有する症例では抗癌剤抵抗性の症例も存在しており, 新規抗癌剤の投与をはじめとして, 末梢血幹細胞移植下大量抗癌化学療法などの新しい治療が試みられているのが現状である<sup>5)</sup>. 最近では, 神経芽細胞腫, 胃癌, 卵巣癌などからの CDDP 耐性細胞株の報告がなされており, その分子生物学的変化について検討されつつある<sup>6)~8)</sup>. しかし, その耐性の characterization には個々の細胞株によって若干の違いが認められている<sup>6)~8)</sup>. 従って, ヒト精巣セミノーマにおいて CDDP 耐性の細胞株を樹立し, その解析をすることは意義深いこ

とと考えられる。今回の実験では *in vitro* で CDDP 耐性株を作成し、さらに、CDDP 細胞質内代謝について解析したので報告する。

## 材料と方法

### 細胞株と培養

細胞株は我々が樹立したヒト精巣腫瘍由来セミノーマ株 (JKT-1) および、その高転移株 (JKT-HM) を用いた<sup>1), 2)</sup>。この細胞を10%非動化 FCS と 2mM グルタミン、60  $\mu\text{g}/\text{ml}$  カナマイシンを含む MEM 培地で 37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で培養した。なお、両株ともに300継代以上、*in vitro* で安定増殖しており、他の胚細胞腫瘍への分化を認めていない。

### シスプラチン (CDDP) 耐性株の作成法

ヒト精巣セミノーマ高転移株 (JKT-HM) を用い、Cillo C. らの報告<sup>9)</sup>に基づき、細胞を25 ml フラスコに  $1 \times 10^6$  ずつまき込み、無血清培地に最終濃度が 1  $\mu\text{M}$ 、3  $\mu\text{M}$ 、5  $\mu\text{M}$ 、10  $\mu\text{M}$ 、20  $\mu\text{M}$ 、30  $\mu\text{M}$  となるように CDDP (日本化薬、東京) を添加、遮光下で再び 37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で 2 時間培養した。2 時間後、CDDP を PBS にて洗い流した後、もとの10%非動化 FCS を含む MEM 培地に培地交換を行った。なお、各々の CDDP 最終濃度を上げる間隔は 2 週間隔で行っている。その後、生存した細胞のみを抽出し、継代培養を行った。CDDP 暴露の維持量として同様の方法で CDDP 10  $\mu\text{M}$  を 2 週間隔、2 時間添加を12ヶ月行った (Fig. 1)。その後、CDDP の添加を行わず、30継代まで培養を行ったが、CDDP withdrawal は起していなかった。

### 形態観察

前述のごとく、無血清培地に CDDP 10  $\mu\text{M}$  添加、遮光下で再び 37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で 2 時間培養を行い、その後、10%非動化 FCS を含む CDDP 無添加、MEM 培地に培地交換を行い、37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で 4 日間

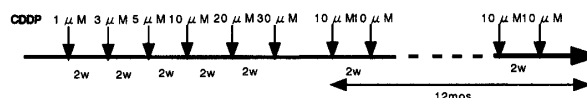


Fig. 1. JKT/DDP was established from JKT-HM by cultivation with stepwise dose escalation of CDDP

培養し倒立顕微鏡で観察した。

Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System による各細胞株成長曲線および、細胞毒性の評価

96穴マイクロタイタープレートに JKT-1, JKT-HM, JKT/DDP を各穴  $1 \times 10^4$  個ずつまき込み、無血清培地を用いて10日間培養を行った。1, 3, 5, 7, 10日目にテトラゾリウム塩 (WST-1) (Takara, 日本) を各穴に10  $\mu\text{l}$  を添加し、4 時間培養後、波長 450nm/655nm, 450nm/630nm で Enzyme linked immunoabsorbent assay (ELISA) で測定し、成長曲線を解析した。次に CDDP の細胞毒性についても同様に96穴マイクロタイタープレートに JKT-1, JKT-HM, JKT/DDP を各穴  $1 \times 10^4$  個ずつまき込み、無血清培地を用いて 2 日間培養を行った後、培地交換を行い、control, 1  $\mu\text{M}$ 、5  $\mu\text{M}$ 、10  $\mu\text{M}$ 、30  $\mu\text{M}$ 、50  $\mu\text{M}$  になるように CDDP を添加し、遮光下で 3 日間培養した。3 日目に前述と同様に ELISA で計測した。その結果より各々の control と比較して、その増殖率を解析し、IC<sub>50</sub> を算出した。

Collagen gel droplet embedded drug sensitivity test (CD-DST) 法による抗癌剤感受性試験<sup>10)</sup>

本試験法は、専用システムキット・Primaser<sup>®</sup> (新田ゼラチン、大阪) を用いて行った。JKT-1, JKT-HM, JKT/DDP の各細胞を control, CDDP 1  $\mu\text{M}$ 、10  $\mu\text{M}$  群に分け、各群の細胞数を  $1 \times 10^6$  個としコラーゲン・ゲル・コートフラスコ内で予備培養を行う。細胞接着因子であるコラーゲン・ゲルに生着した生細胞をコラゲナーゼ消化により回収する。次に、コラーゲン・ゲル培養キット中の A 液 (Cellmatrix<sup>®</sup> TypeCD), B 液 (10倍濃度 F-12培地), C 液 (再構成用緩

衝液)を各々8:1:1の容量で混合する。このコラーゲン溶液と細胞懸濁液とを混合し、6穴マルチプレートに30  $\mu$ l ずつ1穴当たり3ヶ滴下する。37°C, 5% CO<sub>2</sub>で1時間ゲル化させ10% FBS添加DF培地を各穴に重層し、三次元培養を行う。その後、無血清培地PCM-2培地にCDDP 1  $\mu$ M, CDDP 10  $\mu$ Mを各々の穴に添加し、7日間培養する。7日間の培養後、各穴にニュートラルレッドを添加し2時間インキュベートし、10%ホルマリン溶液に置換し40分固定する。その後、プレートを水洗し風乾する。抗腫瘍効果の評価は、画像解析装置を用いて癌細胞と繊維芽細胞の増殖形態とニュートラルレッド染色度の差異を利用して癌細胞コロニーのみの補完体積値を算出し、control群/抗癌剤処理群との相対増殖率の値(%)を求め、50%以下を感受性ありとした。

#### 細胞内 CDDP 濃度測定<sup>11)</sup>

JKT-1, JKT-HM, JKT/DDPの各細胞を90 mm dishに2  $\times$  10<sup>6</sup>個ずつまき込み、無血清培地、MEN培地を用いて、CDDPの最終濃度が10  $\mu$ Mになるように処理、遮光下で4時間、37°C, 5% CO<sub>2</sub>の条件下で培養した。培養後、PBSで3回洗浄後、Trypsinで細胞をdishより剥離する。さらに、剥離した細胞をPBSで3回洗浄する。最後に細胞重量および、細胞数を数え、生細胞率を計算した。次に、これらの細胞に濃硝酸3 mlを加え、80°Cで5時間分解する。冷却後、液層のみを回収し40% NaOH 3.5 mlを加え、さらに25% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2.5 mlを加える。次にジエチルジチオカルバミン酸ナトリウム300 mgを加え、80°Cで1時間加温する。反応後、液を20 mlの分液ロートに移し、蒸留水3 mlでもとの試験管を洗い、洗浄液を分液ロートに入れる。次にクロロホルムを3 ml加え、5分間振盪した後、クロロホルム層を集める。この操作を3回繰り返す。クロロホルム層を回収後、rotary evaporator

で濃縮乾固する。残渣を0.5 mlのメタノールに溶かし、これを日立偏光ゼーマン原子吸光度計Z-800形を用いて波長265.9 nmで計測した。

#### RNAの抽出とcDNAの合成

JKT-1, JKT-HM, JKT/DDPを各々7日間、培養し、細胞を集めTRIzol (GIBCO BRL Life Technologies Gaithersburg, MD, USA)を用いて最終濃度が200 ng/ $\mu$ lになるようにRNAを抽出した。次にcDNA合成を以下の手順で行った。全RNA 5  $\mu$ l, diethyl pirocarbonate (DEPC)処理蒸留水 63.5  $\mu$ l, 10  $\times$  TaqMan RT Buffer 10  $\mu$ l, MgCl<sub>2</sub> 12  $\mu$ l, dNTP mix 10  $\mu$ l, ランダムヘキサマー 5  $\mu$ l, RNase inhibitor 2  $\mu$ l, 逆転写酵素 2.5  $\mu$ lを混合した。次に、25°C, 10分間, 48°C, 30分間, 95°C, 5分間の条件下で反応させ、1  $\mu$ lの0.5 M EDTAを加え、氷冷し、サンプルcDNAとした。

#### Real Time PCR 解析

サンプルcDNA濃度を50 ng/ $\mu$ lになるように調節し、2  $\times$  TaqMan Universal PCR Master Mix 25  $\mu$ l, DEPC処理水24  $\mu$ l, サンプルcDNA 1  $\mu$ lを混合する。次に、TaqMan Endogenous Control Plateの各穴に50  $\mu$ l ずつ加え、ABI PRISM 7700 Sequence Detection Systemを用いて、以下の条件でPCRを行う。50°C, 2分間, 95°C, 10分間で反応させ、95°C, 15秒間, 60°C, 1分間を40サイクル行う。内部標準の反応系ごとにPCR産物の増殖曲線を確認し、C<sub>T</sub>の変動が最も小さい反応系を特定する。今回の解析では $\beta$ アクチンが最適であることが確認されたので、

**Table 1.** The primers sequences and real-time PCR conditions used in this study

Gene	Primer Type	Sequence
MDR1	sense primer	GGAAGCCAATGCCTATGACTTTA
	antisense primer	CAACTGGCCCTCTCTCTC
	TaqMan Probe	FAM-TGAAACTGCCTCATAAATTTGACACCCCTGG-TAMRA
MRP	sense primer	ACCTCCGCTTCAAGTACCA
	antisense primer	TTCTTCATCCGAGTACTGGCTGA
	TaqMan Probe	FAM-TTGTTTTTCGGTTCCCTCCGAATGAA-TAMRA
LRP	sense primer	GGGCTGAGATGCAGGTA AAC
	antisense primer	CCAAAGGCTGTGTTGAAGAGGT
	TaqMan Probe	FAM-AACCTCATCACCAGTGGCTCCACT-TAMRA
GST $\pi$	sense primer	TCTATGGGAAGGACCGAGGA
	antisense primer	CTCATAGTTGGTGTAGATGAGGAGATG
	TaqMan Probe	FAM-CAGCCCTGGTGGACATGGTGAATGA-TAMRA

#### PCR condition

95.0°C	10:00	40 cycle
95.0°C	0:15	
60.0°C	1:00	

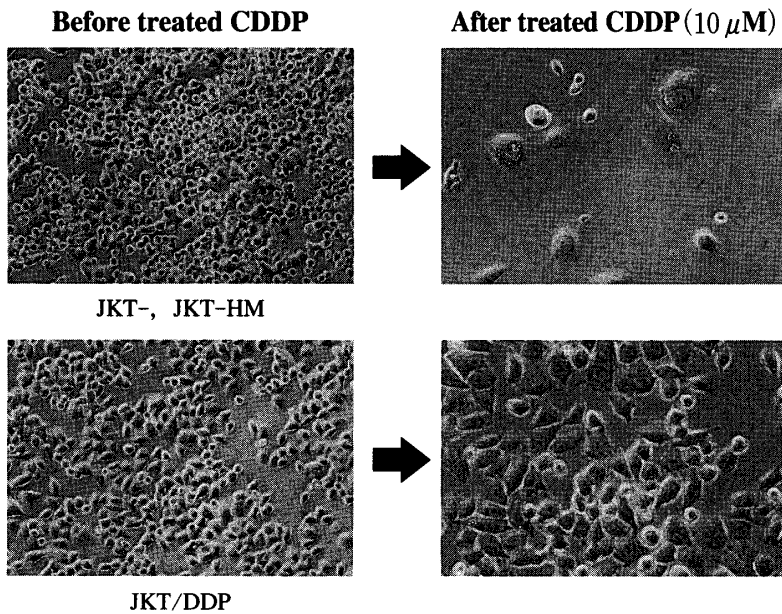


Fig. 2. Inverse microscopic morphologies of JKT-1 and JKT-HM cells without CDDP and with CDDP (original magnification ; ×200)

β アクチンと MDR1, MRP, LRP, GST-π (Table 1) の各々とを相対定量した。

次に mRNA は, サンプル cDNA 濃度を 10ng/μl になるように調節し, 2 × TaqMan Universal PCR Master Mix 25 μl, DEPC 処理水 21 μl, 5 μM TaqMan プローブ 1 μl, 10 μM forward プライマー 1 μl, 10 μM reverse プライマー 1 μl, サンプル cDNA 1 μl を 混合し, MicroAmp Optical 96-well reaction Plate の各穴に 50 μl ずつ加える. ABI PRISM 7700 Sequence Detection System を用いて, 上記と同様の条件で PCR を行い, PCR 産物の増殖曲線をリアルタイムで検出し, Sequence Detection ソフトウェアを用いて解析する。

結 果

形態観察

CDDP 添加 MEN 培地での JKT-1, JKT-HM, JKT/DDP を倒立顕微鏡で観察すると, いずれの細胞も敷石状の細胞配列をし, 卵円形の細胞と紡錘形の細胞の 2 種類の細胞で構成されている. しかし, JKT/DDP では, よりクロマチンの濃い紡錘形の細胞が多く増殖していた. CDDP

10 μM 4 日間, 無血清培地 MEN 培地で培養を行ったあとの細胞形態を観察してみると, 明らかに JKT-1, JKT-HM で細胞数は減少し, その個々の細胞は細胞膜が保たれているにもかかわらず, 細胞核の凝集化や細胞の分葉化を呈していた. 一方, JKT/DDP では細胞は増殖し, 個々の細胞についても著明な変化は認められなかった (Fig. 2).

成長曲線および, 細胞毒性の評価  
通常の CDDP 無添加の培養では成長曲線・倍加速度に差は認めなかった (Fig. 3). しかし, CDDP

添加による培養において JKT-1 では CDDP 1 μM, JKT-HM では 5 μM から control に比べ, 増殖率が低下している. 一方, JKT/DDP では 20 μM の時点でも control と同様な増殖率を示していた. また, これらの成長曲線から算出された IC<sub>50</sub> は JKT-1 2.85 μM, JKT-HM 4.73 μM であり, JKT/DDP は 24.2 μM と高値を示し, JKT-1 の約 10 倍, JKT-HM の約 5 倍であった (Fig. 4).

CD-DST 法による CDDP 感受性試験

CD-DST 法による抗癌剤感受性試験では CDDP 1 μM, CDDP 10 μM で各々の細胞株を培

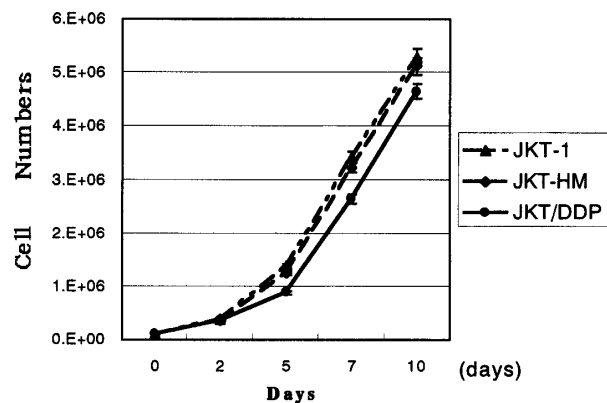


Fig. 3. Growth curves of JKT-1, JKT-HM and JKT/DDP cells cultured without CDDP

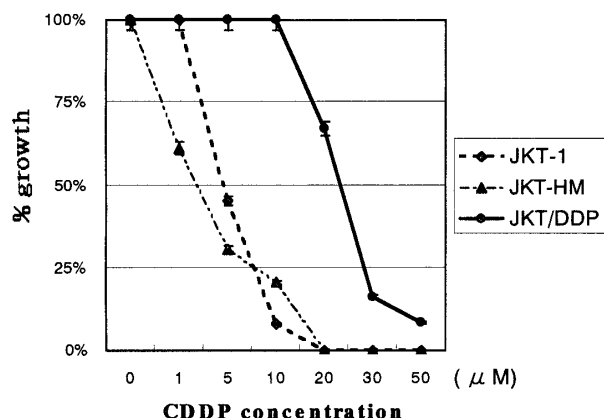


Fig. 4. The  $IC_{50}$  values of CDDP showed that JKT/DDP is significantly more resistant to CDDP than the other two cell lines

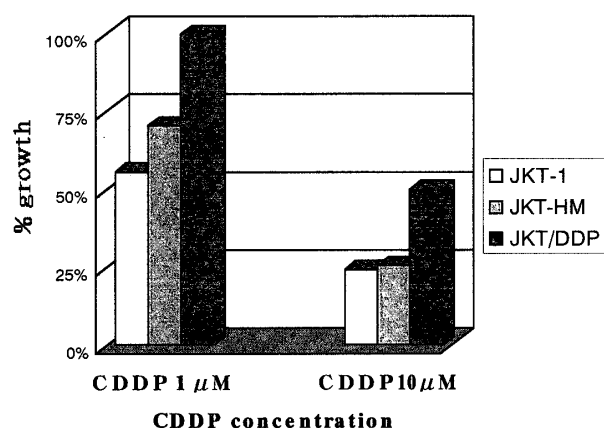


Fig. 5. CD-DST showed that JKT/DDP is significantly more resistant to CDDP than the other two cell lines

養した結果, CDDP  $1 \mu\text{M}$  においては生存率が JKT-1 が 55.6%, JKT-HM では 70.5%, JKT/DDP では 100% の生存率であった. CDDP  $10 \mu\text{M}$  においては生存率が JKT-1 が 13.3%, JKT-HM, では 25.6%, JKT/DDP では 53.9% と明らかに JKT/DDP と他の 2 種類の細胞株には感受性の差が認められた (Fig. 5).

#### CDDP 細胞内濃度

CDDP  $10 \mu\text{M}$  添加での培養条件で各々の CDDP の細胞内濃度を計測したところ, 細胞 1 個あたりの細胞内 CDDP 濃度は JKT-1  $1.7 \mu\text{g}/\text{cell}$ , JKT-HM  $1.5 \mu\text{g}/\text{cell}$ , JKT/DDP  $1.1 \mu\text{g}/\text{cell}$  と JKT/DDP の方が細胞 1 個あたりの CDDP 濃度は低下していた (Fig. 6).

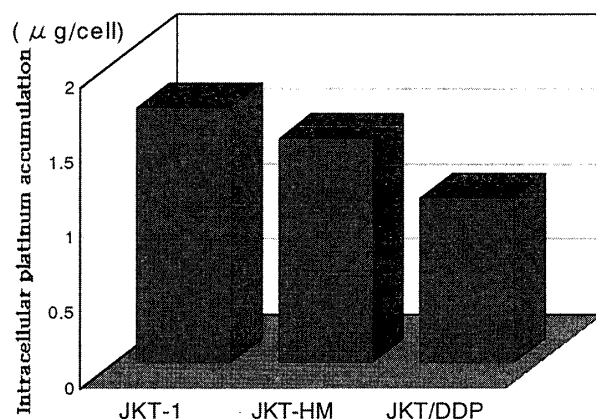


Fig. 6. Intracellular platinum accumulation: When treated with CDDP at a concentration of  $10 \mu\text{M}$ , JKT/DDP cells showed a lower platinum concentration than the other two cell lines

#### 抗癌剤耐性関連遺伝子の解析

今回, 耐性関連遺伝子として MDR1, MRP, LRP, GST- $\pi$  の mRNA レベルについて検討した. その結果は, JKT-1 では MDR1  $13.7 \times 10^{-7}$  未満, MRP  $2.1 \times 10^{-3}$ , LRP  $0.7 \times 10^{-3}$ , GST- $\pi$   $0.037 \times 10^{-5}$  未満, JKT-HM では MDR1  $4.1 \times 10^{-7}$  未満, MRP  $2.9 \times 10^{-3}$ , LRP  $1.3 \times 10^{-3}$ , GST- $\pi$   $0.051 \times 10^{-5}$  未満, JKT/DDP では MDR1  $12.0 \times 10^{-7}$ , MRP  $4.2 \times 10^{-3}$ , LRP  $1.5 \times 10^{-3}$ , GST- $\pi$   $160 \times 10^{-5}$  であった. 以上より, JKT/DDP と JKT-1, JKT-HM と比較すると LRP 以外の CDDP の細胞外への排出機構に関連する抗癌剤耐性関連遺伝子 (MDR1, MRP, GST- $\pi$ ) において発現が強く認められた (Table 2).

#### 考 察

現在, 遠隔転移を有する精巣腫瘍に対して CDDP を中心とした多剤併用療法が施行されるようになり, その予後は改善してきている<sup>4), 5)</sup>. しかし, その有効率は 80% 程度であり, 抗癌剤耐性の症例も存在している. このような症例に対しては, 造血幹細胞移植下超大量抗癌剤投与や CPT-11 などの新規抗癌剤投与などが試みられている.

一方, 基礎的研究においては精巣腫瘍における CDDP の耐性機序に関する報告は極めて少

**Table 2.** The mRNA expression of MDR1, MRP, LRP, and GST- $\pi$  was investigated by a real-time PCR. The expression levels of MDR1, MRP, and GST- $\pi$  were higher in JKT/DDP than in JKT-1 and JKT-HM

	MDR-1	MRP	LRP	GST $\pi$
JKT-1	$< 3.7 \times 10^{-7}$	$2.1 \times 10^{-3}$	$0.7 \times 10^{-3}$	$< 0.037 \times 10^{-5}$
JKT-HM	$< 4.1 \times 10^{-7}$	$2.9 \times 10^{-3}$	$1.3 \times 10^{-3}$	$< 0.051 \times 10^{-5}$
JKT/DDP	$12.0 \times 10^{-7}$	$4.2 \times 10^{-3}$	$1.5 \times 10^{-3}$	$160.0 \times 10^{-5}$

target gene expression/ $\beta$ -actin expression

ない。また、臨床的に最も抗癌剤感受性の高い精巣セミノーマについては報告はない。今回の実験で、われわれの教室で樹立したヒト精巣セミノーマ細胞株を用いて、CDDP 耐性株を作成するとともに、その CDDP の細胞外への排出機構に関連する抗癌剤耐性関連遺伝子について解析を試みた。

第一に CDDP 耐性株作成にあたり、original である JKT-1 では CDDP 感受性が極めて高く、耐性株の作成は困難であった。そこで、臨床的にも遠隔転移巣に対して、CDDP を中心とした多剤併用抗癌化学療法が施行されることより、高転移株である JKT-HM を用いて耐性株を作成した。

現在までに報告されている各種の CDDP 耐性悪性腫瘍株の報告から以下の CDDP に対する耐性獲得機構が報告されている。1) 細胞内への有効な取り込みの減少<sup>12)</sup>、2) 細胞質内代謝の亢進<sup>13), 14)</sup>、3) DNA 修復機序の亢進である<sup>15), 16)</sup>。その中において、細胞質内の代謝の変化は各々、共通して報告されており、耐性化に大きな役割を担っていると考えられている (Fig. 7)。その代謝機構として、MDR 遺伝子にコードされる P-glycoprotein pump<sup>17)</sup>、MRP pump<sup>18)</sup>、LRP 抱合体<sup>19), 20)</sup>、glutathione 抱合と関連している GSH pump の存在が報告

されている<sup>21)</sup>。中でも、GST- $\pi$  遺伝子にコードされる GSH pump が最も CDDP 細胞質内代謝に関連しているとされている。今回、JKT-HM を用いて CDDP を長期、間欠的に投与することで抗癌剤感受性試験より、耐性株の樹立は成功したと考えられる。さらに、細胞内 CDDP 濃度の計測により細胞質内の CDDP の細胞外への排出機構の亢進が伺えた。

CDDP 細胞質内代謝に関与する抗癌剤耐性遺伝子 (MDR 1, MRP, LRP, GST- $\pi$  遺伝子) を Real Time PCR で定量的に解析したところ、JKT/DDP において LRP 以外の抗癌剤耐性遺伝子の mRNA の発現が強く認められた。その中においても GST- $\pi$  の発現が強く認められ、諸家らの報告と一致するものであった。このことより、精巣セミノーマの CDDP 耐性化に細胞質内 CDDP 代謝が関与、特に、GST- $\pi$  遺伝子からコードされている GSH pump の関与が考えられた。さらに、今後、蛋白質レベルの検討も必要と思われる。また、今回の観察において形態学的にアポトーシスを思わす変化も認めた (Fig. 2)。このことについては、松木らが、JKT-1 が CDDP によりアポトーシスが誘導されると報告している<sup>22)</sup>。さらに近年、アポトーシスと抗癌剤耐性の関連として、bax の発現低下

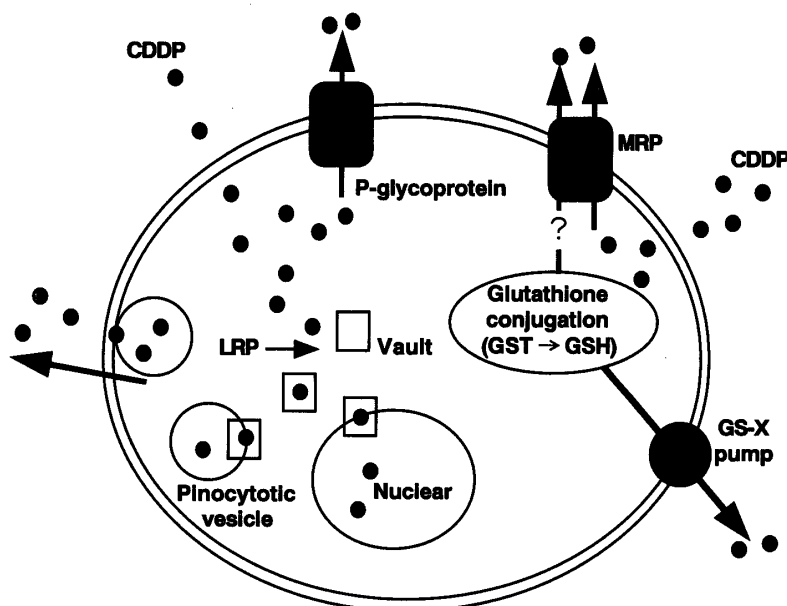


Fig. 7. Possible mechanism of cytoplasmic CDDP metabolism

や bcl-2 の発現増強が抗癌剤耐性と相関するという報告<sup>23)</sup>, また, p53 の変異<sup>24)</sup> などのアポトーシス関連遺伝子についての報告もあり, これらの検討も必要と思われる。

MDR1, MRP, GST- $\pi$  の発現が強くと認められ, 特に, GST- $\pi$  の発現が強かった。

以上より, CDDP 耐性化において細胞質内 CDDP 代謝の関与が示唆された。

## 結 語 謝 辞

当教室で樹立したヒト精巣セミノーマ細胞株から樹立した高転移株 (JKT-HM) を用いて, CDDP 耐性株 (JKT/DDP) を作成をし, 細胞質内 CDDP の細胞外への排出機構に関連する抗癌剤耐性関連遺伝子について検討した。

1) IC<sub>50</sub>, CD-DST における抗癌剤感受性試験において JKT/DDP は JKT-1, JKT-HM に比較して耐性を示した。

2) JKT/DDP における細胞質内 CDDP 濃度は JKT-1, JKT-HM と比較して低下していた。

3) 細胞質内 CDDP 代謝に関連する抗癌剤耐性関連遺伝子の発現の変化を検討したところ,

稿を終えるにあたり, ご指導を賜りました川崎医科大学泌尿器科学教室 田中啓幹名誉教授, 森岡政明助教授, 実験について細胞株を樹立, 御提供くださった現松田病院泌尿器科部長 絹川敬吾先生, 直接ご助言, ご指導を頂いた川崎医科大学泌尿器科学教室 常義政講師に謝意を表します。また, 本研究の遂行に御協力頂いた泌尿器科学教室員各位, 泌尿器科研究補助員 山下典子女史, ならびに組織培養免疫センターの皆様にも厚くお礼申し上げます。なお, 本研究の一部は大学院重点特別経費 (平成12年度) および川崎医科大学プロジェクト研究費 (No.12-107, No.13-117, No.14-111) の援助により行われた。

## 文 献

- 1) Kinugawa K, Hyodo F, Matsuki T, Jo Y, Furukawa Y, Ueki A, Tanaka H : Establishment and characterization of a new human testicular seminoma cell line (JKT-1). *Int J Urol* 5 : 284 - 289, 1998
- 2) Jo Y, Kinugawa K, Matsuki T, Morioka M, Tanaka H : Analysis of the Biological Properties and Use of Comparative Genomic Hybridization to Locate Chromosomal Aberrations in the Human Testicular Seminoma Cell Line (JKT-1) and its Highly Metastatic Cell Line (JKT-HM). *BJU International* 83 : 469 - 475, 1999
- 3) Sandberg AA, Meloni AM, Suijkerbuijk RF : Review of chromosome studies in urological tumors, III Cytogenesis and genes in testicular tumors. *J Urol* 155 : 1531 - 1556, 1996
- 4) Kantoff PW, Kalish LA, McDowell BP, Canellos GP, Gibbs R, Richie JP, Garnick MB : Long-term follow up of 150 patients with testicular cancer treated at a single institution. *J Urol* 147 : 82 - 88, 1992
- 4) Fossa SD, Oliver RT, Stenning SP, Horwich A, Wilkinson P, Read G, Mead GM, Roberts JT, Rustin G, Gullen MH, Kaye SB, Harland SJ, Cook P : Prognostic factors for patients with advanced seminoma treated with platinum-based chemotherapy. *Eur J Cancer* 33 : 1347 - 50, 1997
- 6) Yasuo T, Matsumura T, Shikata T, Inazawa J, Sakabe T, Tsuchida S, Takahata T, Miyari S, Naganuma A, Sawada T : Establishment and Characterization of a Cisplatin-Resistant Human Neuroblastoma Cell Line. *Anticancer Res* 19 : 4049 - 4958, 1999
- 7) Nitta A, Chung YS, Nakata B, Yashiro M, Onoda N, Maeda K, Sawada T, Sowa M : Establishment of a cisplatin-resistant gastric carcinoma cell line OCUM-2M/DDP : *Cancer Chemother. Pharmacol* 40 : 94 - 97, 1997
- 8) Jundson PL, Watson JM, Gehrig PA, Fowler WC, Haskill JS : Cisplatin inhibits paclitaxel-induced apoptosis in cisplatin-resistant ovarian cancer cell lines : possible explanation for failure of combination therapy. *Cancer Res* 59 : 2425 - 2432, 1999
- 9) Cillo C, Ling V, Hill RP : Drug resistance to KHT fibrosarcoma cell lines with different metastatic ability. *Int J Cancer*



- 43 : 107 - 111, 1989
- 10) Koezuka T, Imamura T, Ichihashi H : Drug sensitivity test for primary culture of human cancer cells using collagen embedded culture and image analysis. *Int J Oncol* 2 : 953 - 959, 1993
  - 11) Pera MF Jr, Harder HC : Analysis for platinum in biological material by flameless atomic absorption spectrometry. *Clin Chem* 23 : 1245 - 1249, 1977
  - 12) Kikuchi Y, Iwano I, Miyauchi M, Kita T, Sugita M, Tenjin Y, Ngata I : Possible mechanism of resistance to cis-diamminedichloroplatinum (II) of human ovarian cancer cells. *Jpn J Cancer Res* 81 : 701 - 706, 1990
  - 13) Mistry P, Kelland LR, Sidkar S, Harrap KR : The relationships between glutathione, glutathione-S-transferase and cytotoxicity of platinum drugs and melphalan in eight human ovarian cell lines. *Br J Cancer* 64 : 215 - 219, 1991
  - 14) Meijer C, Mulder NH, Timmeer-Bosscha H, Sluiter WJ, Meersma GJ De Vries : Relationship of cellular glutathione to the cytotoxicity and resistance of seven platinum compounds. *Cancer Res* 52 : 6885 - 6889, 1992
  - 15) Chu G : Cellular response to cisplatin. *J Biol Chem* 269 : 787 - 790, 1994
  - 16) Johnson SW, Perez RP, Godwin AK, Yeung AT, Hndel LM, Ozols RF : Role of platinum-DNA adduct formation and removal in cisplatin resistance in human ovarian cancer cell lines. *Biochem Pharmacol* 47 : 689 - 697, 1994
  - 17) Shapiro AB, Ling V : Reconstitution of drug transport by purified P-glycoprotein. *J Biol Chem* 270 : 16167 - 16175, 1995
  - 18) Loe DW, Deeley RG, Cole SPC : Biology of the multidrug resistance-associated protein, MRP. *Eur J Cancer* 32 A : 945 - 957, 1996
  - 19) Izquierdo MA, Scheffer GL, Flens MJ, Schroeijers AB, van der Valk P, Scheffer RJ : Major vault protein LRP-related multidrug resistance. *Eur J Cancer* 32 A : 979 - 984, 1996
  - 20) Izquierdo MA, van der Zee AGJ, Vermuken JB, van der Valk P, Belien JA, Giaccone G, Scheffer GL, Flens MJ, Pinedo HM, Kenemans P : Drug resistant-associated marker Lrp for prediction of response to chemotherapy and prognoses in advanced ovarian carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 87 : 1230 - 1237, 1995
  - 21) Tew KD : Glutathione-associated enzymes in anticancer drug resistance. *Cancer Res* 54 : 4313 - 4320, 1994
  - 22) 松木孝和 : ヒト精巣腫瘍由来セミノーマ細胞株 (JKT-1) の cis-diamminedichloroplatinum (II) による細胞死誘導について. *川崎医学会誌* 23 : 35 - 43, 1997
  - 23) Krajewski S, Blomqvist C, Franssila K, Krajewska M, Wasenius VM, Niskanen E, Nordling S, Reed JC : Reduced expression of proapoptotic gene BAX is associated with poor response rates to combination chemotherapy and shorter survival in women with metastatic breast adenocarcinoma. *Cancer Res* 55 : 4471 - 4478, 1995
  - 24) Harris CC : Structure and function of the p 53 tumor suppressor gene : Clues for rational cancer therapeutic strategies. *J Natl Cancer Inst* 88 : 1442 - 1455, 1996