

Title	Early reduction of glucose uptake after cisplatin treatment is a marker of cisplatin sensitivity in ovarian cancer
Author(s)	高田, 友美
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/58110
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

[29]

氏名	高田友美
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 24250 号
学位授与年月日	平成22年10月27日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科外科系臨床医学専攻
学位論文名	Early reduction of glucose uptake after cisplatin treatment is a marker of cisplatin sensitivity in ovarian cancer (蛍光標識グルコース2-NBDGを用いた卵巣癌に対するシスプラチン感受性評価)
論文審査委員	(主査) 教授 木村 正 (副査) 教授 畑澤 順 教授 野口眞三郎

論文内容の要旨

[目 的]

卵巣癌の標準的な化学療法はシスプラチンやカルボプラチンといったプラチナ製剤とタキサン系製剤の組み合わせであるが、その奏効率は初回で70~80%、再発症例で30~60%とされている。現在、抗癌剤感受性は、数コース化学療法を施行した後に、CTやMRIで判定されている。化学療法施行前に抗癌剤感受性を判定することができれば、効果のない化学療法を避けることが可能であると考えられる。

癌細胞では糖の取り込みが亢進していることがよく知られている。また、*in vitro*の実験で、種々の抗癌剤が細胞のグルコース取り込みを低下させるとの報告がされている。

今回、卵巣癌細胞株および卵巣癌手術検体に対する抗癌剤感受性試験とし

て、蛍光標識グルコース、2-NBDG (2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-dioxol-4-yl)amino]-2-deoxyglucose)を用いたグルコース取り込み測定が、シスプラチン感受性の指標となり得るか否かを検討することを目的とした。

[方法ならびに成績]

卵巣癌細胞株SKOV-3、OVCAR-3を用いて、シスプラチン5~40 μ g/mlを投与した。3時間後と24時間後の細胞死の状態を、従来からの評価方法である細胞数測定、MTSアッセイ、アネキシンV染色及びCaspase-3, PARPのウェスタンブロッティングで評価した。また同様に、シスプラチン投与3時間後と24時間後に、蛍光標識グルコース2-NBDGを投与し、フローサイトメーターを用いて、その取り込みを解析した。この際、死細胞はPropidium Iodideを用いて、解析から除去した。結果、従来の方法では、3時間後には変化を認めなかったが、グルコースの取り込み低下は3時間後から認められた。シスプラチン投与3時間後のGLUT1(Glucose transporter 1)、PFK(Phosphofructokinase)、PGK(Phosphoglycerate kinase)のmRNA発現についてリアルタイムRT-PCRで検討したところ、SKOV-3では、PGKのみ有意な発現低下を認め、OVCAR-3では3つ全ての遺伝子のmRNAの発現低下が認められた。またウェスタンブロッティングを用いて、シスプラチン投与3時間後のGLUT1の発現量を検討したが、両細胞株共に、シスプラチン投与なしの群に対して、蛋白量に変化を認めなかった。免疫染色を用いて、GLUT1を染色したところ、シスプラチン投与3時間後に細胞膜上のGLUT1発現の減少が認められた。続いて、シスプラチン投与後の酸素消費量の計測、及びミトトラッカーを用いて、ミトコンドリアの膜電位をフローサイトメーターにより検討した。シスプラチン投与後、酸素消費量は減少したが、ミトコンドリアの膜電位の変化は認めなかった。またシスプラチン耐性子宮体癌細胞株Sawano及びSKOV-3より樹立したシスプラチン耐性株CisR/SKOV-3を用いて、シスプラチン投与3時間後のグルコース取り込みを同様の方法で検討したところ、耐性株ではグルコース取り込みの低下を認めなかった。さらに、卵巣癌手術検体4例を用いて、初代培養を行い、シスプラチン投与後のグルコース取り込みを検討した。シスプラチン投与3時間後にグルコース取り込みの低下を認めた2例では、5日以内に細胞が死滅した。一方、シスプラチン投与3時間後にグルコース取り込みの低下を認めなかった2例では、10日以上癌細胞の生存を認めた。

[総 括]

従来の方法では、シスプラチン投与3時間後では、卵巣癌細胞株のシスプラチン感受性を評価できなかった。一方、蛍光標識グルコース2-NBDGを用いて、フローサイトメーターでグルコースの取り込みを計測する事により、シスプラチン投与3時間後で、シスプラチン感受性のある細胞株では、グルコースの取り込み減少

を認めた。同様の方法で、シスプラチン抵抗性の細胞株では、グルコース取り込みの低下を認めなかった。

シスプラチンが短時間でグルコース取り込みを低下させるメカニズムについては、完全には明らかにされなかったが、細胞膜上のGLUT1の発現が減少する事が関与していると考えられた。

手術検体を用いて、同様にシスプラチン投与後の2-NBDGの取り込みを検討したところ、シスプラチン感受性のあると考えられる症例では、グルコース取り込み低下を認め、シスプラチン抵抗性と考えられる症例では、グルコース取り込みの低下を認めなかった。このことから、この方法が、シスプラチン感受性試験となり得ると考えられた。

論文審査の結果の要旨

蛍光標識グルコース 2-NBDG を用いて、卵巣癌細胞のグルコース取り込みを測定し、シスプラチン感受性を予測し得るかを検討する事を目的とした。

卵巣癌細胞株にシスプラチンを投与し、3、24時間後に既存の方法で細胞死を判定したところ、24時間後には細胞死が認められたが、3時間後には細胞死を予測する事ができなかった。一方、同様にシスプラチン投与後、2-NBDG の取り込みをフローサイトメーターで計測したところ、3時間後、すでに取り込みの低下を認めた。機序を調べるために、シスプラチン投与後に、解糖系遺伝子のリアルタイム RT-PCR、GLUT1の蛋白量及び細胞免疫染色、細胞の酸素消費量測定、ミトコンドリア膜電位の評価を行った。その結果、GLUT1 の膜局在の消失が原因と考えられた。

次に、シスプラチン耐性細胞株で 2-NBDG の取り込みを計測したが、取り込み低下は認められなかった。卵巣癌手術検体を培養し、同様にシスプラチンを投与したところ、感受性例では、2-NBDG の取り込み低下が認められ、抵抗性例では取り込みの低下が認められなかった。

以上より、2-NBDG を用いてグルコース取り込みを計測することが、卵巣癌細胞において、シスプラチン感受性の予測に有用であると考えられた。

本研究は学位の授与に値すると思われる。