

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

松木 孝和

ヒトセミノーマ細胞株を cis-diamminedichloroplatinum (II) (以下 CDDP と省略) で処理して、その細胞死の様子を観察した。CDDP 処理により細胞は濃度依存性に速やかに数の低下が認められ、CDDP のセミノーマ細胞に対する強い抗腫瘍作用が確認された。形態的には腫瘍細胞核の断片化が高濃度群により強く認められた。また CDDP 処理時の細胞周期の解析では細胞は S 期、続いて G₂/M 期に集積した後に約 12 時間後から hypoploid の部分が増えており、この部分がアポトーシスに陥った細胞であろうと考えられた。最終的に電気泳動で経時的に発現する DNA の断片化が証明されたため、セミノーマ細胞は CDDP 投与によりアポトーシスが誘導されて死んでいくことが証明された。

(平成 9 年 5 月 24 日受理)

Induction of Cell Death by Cis-diamminedichloroplatinum (II) in a Human Testicular Seminoma Cell Line (JKT-1)

Takakazu MATSUKI

A human testicular seminoma cell line was treated with cis-diamminedichloroplatinum (II) (CDDP). Treatment with CDDP resulted in rapid and concentration-dependent cell death or decrease in cell numbers, confirming that CDDP has a strong anticancer activity against seminoma cells. The tumor cell nuclei showed fragmentation that was more pronounced at a high CDDP concentration. Cell cycle analysis after CDDP treatment showed that cells accumulated in the S and G₂/M phases, and that there was an increase in the number of hypoploid cells after approximately 12 hours. The hypoploid cells were thought to have undergone apoptosis. Demonstration of DNA fragmentation by electrophoresis confirmed that CDDP caused the death of seminoma cells by inducing apoptosis. (Accepted on May 24, 1997) *Kawasaki Igakkaishi* 23(1): 35-43, 1997

Key Words ① Seminoma ② Apoptosis
③ CDDP

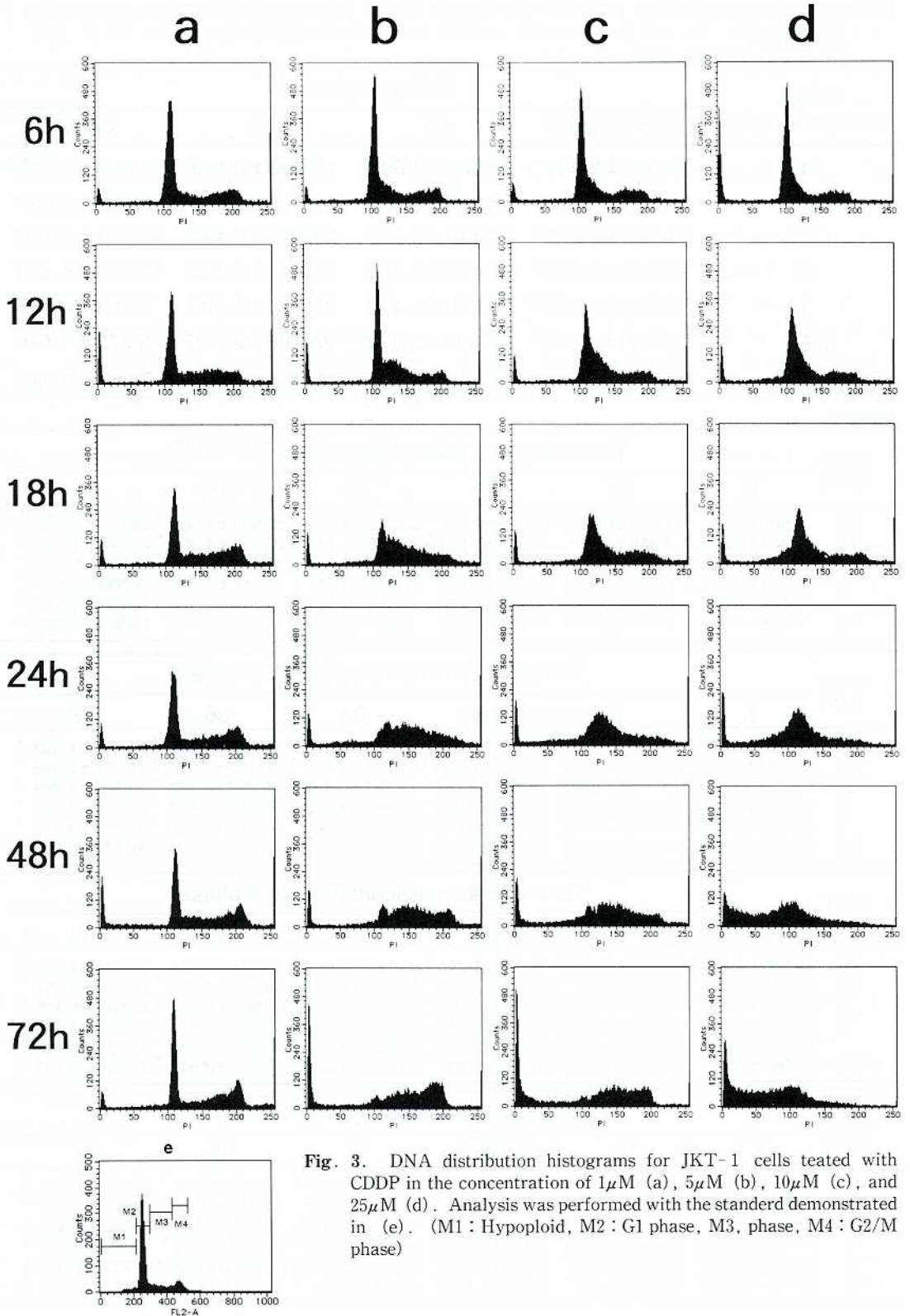


Fig. 3. DNA distribution histograms for JKT-1 cells treated with CDDP in the concentration of $1\mu\text{M}$ (a), $5\mu\text{M}$ (b), $10\mu\text{M}$ (c), and $25\mu\text{M}$ (d). Analysis was performed with the standard demonstrated in (e). (M1 : Hypoploid, M2 : G1 phase, M3, phase, M4 : G2/M phase)

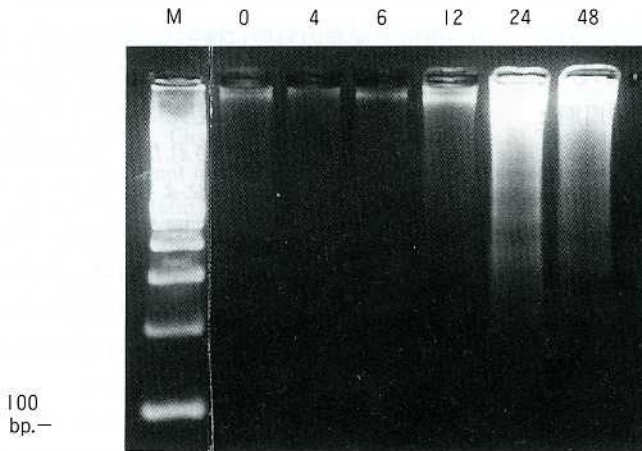


Fig. 4. Agarose gel electrophoresis of DNA extracted from JKT-1 cells following CDDP treatment. Low molecular DNA was prepared at the times indicated (h) after CDDP treatment. M: DNA weight marker. (CDDP: $10\mu\text{m}$)

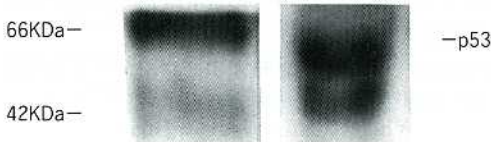


Fig. 5. Western blot analysis of p53 obtained from 6 h. (CDDP: $10\mu\text{m}$)

いては劇的な効果を示すものもある。しかし、そのほとんどは造血系腫瘍が中心で、セミノーマのように抗癌剤に対して高い感受性を示す固形腫瘍は稀である。今回の実験では我々が樹立したセミノーマ細胞株を用いて、CDDPの細胞レベルにおける作用機序の解析を試みた。すなわち最近、種々の癌細胞において治療によりアポトーシスが惹起されることがわかっている⁵⁾⁻⁹⁾が全ての癌細胞において観察あるいは証明されているわけではなく、精巣腫瘍においては細胞株が樹立されている胎児性癌や奇形腫などの細胞株においてその現象が観察されているのみであった^{10), 11)}。臨床的に最も抗癌剤感受性の高いセミノーマにおいては、純粋な細胞株の樹立が極めて困難であったため⁹⁾今日までその抗癌剤による細胞死の様子は *in vitro* においては全く観察されていなかった。

現在までの他の悪性腫瘍細胞株の抗癌剤処理によるアポトーシス誘導の報告から、セミノーマが抗癌剤に対して感受性の高い理由のひとつにアポトーシスが関与しているためではないかと想定した。今回の実験で、CDDP処理によりセミノーマ細胞がDNAの断片化を起していることが、蛍光色素染色による核の形態変化の様子と、電気泳動法によるDNA ladderの検出で確認された。DNA ladder構造の形成は現在、アポトーシスの定義として広く受け入れられており¹²⁾⁻¹⁴⁾、この確認によりセミノーマ細胞はCDDP処理に

より速やかにアポトーシスが誘導されることが証明された。

FACSによる抗癌剤処理時の細胞周期の解析では、高濃度処理群とそれ以外の処理群に若干の違いが認められた。25 μM 処理群を除くいずれの処理群でも処理後S期の細胞は増加しており、それに伴い順次G2/M期の細胞が増加する様子が観察された。しかし、最も高濃度である25 μM においてはG2/M期の細胞増加は認められず、むしろ未処理細胞より低い数であった。CDDP処理後早期においてS期の細胞は同様に増加していることや、10 μM 処理時にもややG2/M期細胞数が低いことなどから、高濃度処理においてはG2/M期に細胞が集積したのち、より速やかに細胞死に至っているためであろうと推察された。

CDDPはDNAに共有結合し、DNAに傷害を与えるとされる¹⁵⁾。しかしこのDNAとの結合のみでは細胞死を引き起こすのに充分と言えず、ひとつの重要なステップであるのみと考えられている¹⁶⁾。最近の研究でDNA修復能を持った細胞ではCDDP曝露により細胞はG2/M期に集積するもののそれは一過性であり、さらにDNA修復能の欠如した細胞ではG2/M期に停止後最終

的に細胞は生き残るとの報告があり¹⁷⁾, これらのことから G2/M 期における他の本質的な要因が細胞死に関与していることが示唆されている¹⁷⁾. 今回の結果も CDDP 処理濃度により細胞周期と細胞死の間に相違が認められ, これらの報告に一致する.

精巣腫瘍は p53 遺伝子の変異の頻度が少ないことが報告されている¹⁸⁾⁻²⁰⁾. セミノーマ以外の精巣腫瘍における最近の報告によると, 変異が認められない理由は p53 遺伝子が休止期にあるため, 化学療法剤の投与による DNA 損傷に対して休止していた p53 遺伝子が目覚めて p53 蛋白が産生される様子が観察されている. このことも精巣腫瘍が他の固形癌に比して抗癌剤や放射線療法に感受性が高い理由の一つではないかと推定されている²¹⁾. また heat shock protein 27 (HSP27) の発現低値が抗癌剤感受性の高い理由であるとも報告されている²²⁾. さらに bcl-2 とそのファミリー遺伝子である bax の比が, エトポシドによって引き起こされる精巣腫瘍のアポトーシスに関与していることを指摘する論文もあり²³⁾, これらの報告からも精巣腫瘍が極めて良く治療に反応する理由には多数の要因が関与

していると考えられる. 今回の細胞株において p53 遺伝子変異の有無は検索していないが, p53 蛋白の発現は CDDP 処理によって強く認められており, セミノーマの細胞死に対してこれが関与している可能性も示唆された. 今回の実験でセミノーマは CDDP 投与によりアポトーシスを起こして死に至ることが証明されたが, 今後さらに細胞死に関するこれらの蛋白質, あるいは遺伝子を解析し, 抗癌剤投与によるセミノーマの細胞死誘導についてさらに詳しい検討が必要と思われる.

稿を終えるにあたり, ご指導とご校閲を賜りました川崎医科大学衛生学教室 植木 絢子 教授に深甚なる謝意を捧げます. また細胞株を樹立, 今回の実験に御提供くださった現川崎医科大学泌尿器科学教室 絹川 敬吾 講師ならびに御協力いただいた組織培養センターの方々へ感謝致します.

なお, 本論文の要旨は第55回日本癌学会(平成8年10月, 横浜)において発表した.

本研究の一部は川崎医科大学プロジェクト研究費 (No.8-508) 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* in preparation
- 2) Sandberg AA, Meloni AM, Suijkerbuijk RF: Reviews of chromosome studies in urological tumors. III. Cytogenesis and genes in testicular tumors. *J Urol* 155: 1531-1556, 1996
- 3) 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) Olie RA, Boersma AWM, Dekker MC, Nooter K, Looijenga LHJ, Oosterhuis JW: Apoptosis of human seminoma cells upon disruption of their microenvironment. *Br J Cancer* 73: 1031-1036, 1996
- 5) Eric S, Richard B, Kurt WK, Yves P: Differential induction of apoptosis undifferentiated and differentiated HL-60 cells by topoisomerase I and II inhibitors. *Blood* 81: 1359-1368, 1993
- 6) Daniel RC, Bernad WS: Etoposid-induced cytotoxicity in two human T-cell leukemic lines: Delayed loss of membrane permeability rather than DNA fragmentation as an indicator of programmed cell death. *Cancer Res* 53: 4287-4296, 1993
- 7) Wojciech G, Jianping G, Barbara A, Frank T, Zbigniew D: The cell cycle related differences in susceptibility of HL-60 cell to apoptosis induced by various antitumor agents. *Cancer Res* 53: 3186-

3192, 1993

- 8) Bertrand R, Sarang M, Jenken J, Kerrigan D, Pommier Y : Differential induction of secondary DNA fragmentation by topoisomerase II inhibitors in human tumor cell lines with amplified *c-myc* expression. *Cancer Res* 51 : 6280–6285, 1991
- 9) Markus MB, Charles EM, Oliver S, Yoshitatsu S, Toshiyuki T, Jane BT, Erasmus S : Drug-induced apoptosis is not necessary dependent on macromolecular synthesis or proliferation in the p53-negative human prostatic cancer cell line PC-3. *Cancer Res* 55 : 2122–2128, 1995
- 10) Yamada T, Suzuki N, Hiraoka N, Matsuoka K, Fukushima S, Hashiguchi A, Hata J : Apoptosis of human embryonal carcinoma cells with in vitro differentiation. *Cell Struct Funct* 21 : 53–61, 1996
- 11) Huddat RA, Titley J, Robertson D, Williams GT, Horwich A, Cooper CS : Programmed cell death in response to chemotherapeutic agents in human germ cell tumour lines. *Eur J Cancer* 31A : 739–746, 1995
- 12) Wyllie AH : Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activity. *Nature* 284 : 555–556, 1980
- 13) Cohen JJ, Duke RC : Glucocorticoid activity of a calcium-dependent endonuclease in thymocyte nuclei leads to cell death. *J Immunol* 132 : 38–42, 1984
- 14) Tepper CG, Studzinski GP : Teniposide induces nuclear but not mitochondrial DNA degradation. *Cancer Res* 52 : 3384–3390, 1992
- 15) Zweeling LA, Kohn KW : Mechanism of action of cis-diamminedichloroplatinum (II). *Cancer Treat Rep* 63 : 1439–1444, 1979
- 16) Eastman A : Activation of programmed cell death by anticancer agents : Cisplatin as a model system. *Cancer Cells* 2 : 275–280, 1990
- 17) Sorensen CM, Eastman A : Influence of cis-diamminedichloroplatinum (II) on DNA synthesis and cell cycle progression in excision repair proficient and deficient chinese hamster ovary cells. *Cancer Res* 48 : 6703–6707, 1988
- 18) Bartkova J, Bartek J, Lucas J, Vojtesek B, Staskova Z, Rejthar A, Kovaric J, Midgley CA, Lane DP : p53 protein alternations in human testicular cancer including pre-invasive intratubular germ-cell neoplasia. *Int J Cancer* 49 : 196–202, 1991
- 19) Riou G, Barrois M, Prost S, Terrior MJ, Theodore C, Levine AJ : The p53 and mdm-2 genes in human testicular germ-cell tumors. *Mol Carcinog* 12 : 124–131, 1995
- 20) Schenkman NS, Sesterhenn IA, Washington L, Tong YA, Weghorst CM, Buzard GS, Strvastava S, Moul JW : Increased p53 protein does not correlate to p53 gene mutation in microdissected human testicular germ cell tumors. *J Urol* 154 : 617–621, 1995
- 21) Stuart GL, Arnold JL : A functionally inactive p53 protein in teratocarcinoma cells is activated by either DNA damage or cellular differentiation. *Nat Med* 2 : 804–810, 1996
- 22) Elaine HR, Eileen H, Lee W, John RWM : Effect of overexpression of the small heat shock protein HSP27 on the heat and drug sensitivities of human testis tumor cells. *Cancer Res* 56 : 2446–2451, 1996
- 23) Chresta CM, Masters JR, Hickman JA : Hypersensitivity of human testicular tumors to etoposide-induced apoptosis is associated with functional p53 and a high Bax : Bcl-2 ratio. *Cancer Res* 56 : 1834–1841, 1996