

シスプラチン抵抗性ヒト膀胱癌細胞株の樹立と RNA-seqによる網羅的遺伝子発現解析

鉛本剛之介・亀山俊樹¹・日下守・前田明¹
白木良一

(藤田医科大学医学部・腎泌尿器外科学教室)

(¹藤田医科大学・総合医科学研究所遺伝子発現機構学研究部門)

1. 緒 言

膀胱癌は、膀胱の尿路上皮（移行上皮）粘膜より発生する悪性腫瘍で、病理組織学的には約90%以上が尿路上皮癌である。世界における膀胱癌発生数は、毎年1,200万例を超え、9番目に多い癌であると推定されている。膀胱癌の主なリスク因子は、喫煙や芳香族アミンに暴露する職業、膀胱内の慢性炎症、特定の抗癌剤や放射線治療に伴う二次発癌等の医学的要因が挙げられている。膀胱癌は臨床的に筋層非浸潤性膀胱癌と筋層浸潤性膀胱癌に分類される。基本的な初期治療としては、まず経尿道的膀胱腫瘍切除術（内視鏡手術）により診断と治療が行われる。約70%の初発膀胱癌は筋層非浸潤性膀胱癌であり、内視鏡的切除により根治手術を行う事が主流である。一方、筋層非浸潤性膀胱癌は、50~80%の割合で再発を繰り返し、筋層非浸潤性膀胱癌のうち筋層浸潤性膀胱癌に進展する確率は約20~30%といわれている。壁深達度や腫瘍数等により術後補助療法として、抗癌剤やBCGによる膀胱内注入療法が行われている。一方、筋層浸潤性膀胱癌は、浸潤・転移能が高く、転移のない筋層浸潤性膀胱癌は膀胱全摘除術を念頭に治療を行い、尿路変更が必要となる。術後も再発・転移の確率が50%以上と高率である³。再発・転移が認められると、現在の標準治療はシスプラチン（CDDP）を中心としたMVACやGC療法などのプラチナ製剤ベースの化学療法⁴と、近年ではベムプロリズマブ等の免疫チェックポイント阻害薬⁵が新規導入されつつあるが、5年生存率は10%未満と予後不良で、治療効果も一時的な事から、治療経過中に薬剤抵抗性を獲得すると推測されている^{6,7}。CDDPを中心とする白金製剤は、膀胱癌を含めた尿路上皮癌に対する化学療法に広く用いられている。CDDPの抗腫瘍作用は、細胞分裂の際にDNAを構成する塩基のグアニンとアデニンの結合を強固にし、細胞分裂を抑制す

る事によりがん細胞の分裂増殖を抑制する。一方治療後生存期間は15ヶ月前後と十分とは言えず、CDDP抵抗例に対する治療法の開発が求められている⁸。CDDP抵抗性獲得のメカニズムとして、細胞外への薬剤の流出、薬の無効化、アポトーシスの抑圧、DNA修復の補助等がある⁹。CDDP耐性の機序解明および耐性克服は、化学療法の成績を改善向上させるうえで最重要課題の一つである。

本研究では、CDDP耐性機序解明を目的としてヒト膀胱癌細胞株である、T24とRT4をCDDP添加培地で培養することによりCDDP耐性ヒト膀胱癌細胞株T24CRとRT4CRを樹立することに成功した。さらにCDDP耐性誘導したT24に関してはRNA-seqによる網羅的遺伝子解析を行ったので報告する。

2. 実験方法（耐性細胞樹立）

材料

ヒト膀胱癌から樹立された細胞株のうち、グレードII（G2）の膀胱移行上皮癌に由来するp53変異型のT24細胞¹⁰、グレードI（G1）の乳頭状膀胱癌に由来するp53野生型のRT4細胞をそれぞれAmerican Type Culture Collection（ATCC）から入手し使用した。CDDPはSigmaより入手したものを使用した。培養液には10%牛胎児血清（FBS）およびペニシリンストレプトマイシン含有するDMEM（Dulbecco's Modified Eagle's Medium）を用いた。培養Dishは、3002 tissue culture dish（Falcon Co. USA）を用いた¹²。37℃、5% CO₂下で培養、semi confluentで継代し、維持した。

CDDP耐性細胞の確認

T24, T24CR, RT4, RT4CR各々1×10⁵/mlずつplateに散布し、CDDPを濃度調整し添加した。T24は1μg/ml, 5μg/mlを添加し、添加していないものと

比較した。同様に RT4 については CDDP を $1\mu\text{g}/\text{ml}$, $2\mu\text{g}/\text{ml}$ 添加した。3 日後に細胞を観察し, PBS で 2 回洗浄吸引の後, Accumax[®] を用いて接着細胞を剥離した。37°C, 5% CO₂ 下で T24 は 5 分, RT4 は 10 分静置培養した。DMEM で細胞を分散し 25°C, 1,000rpm, 5 分で遠心した後, 上澄みを除去し新たに DMEM で細胞懸濁液を作成し, 1.5ml のコニカルチューブに $10\mu\text{l}$ の細胞懸濁液と, 同量のトリパンブルーを加え, $10\mu\text{l}$ を細胞計算盤で細胞数を測定した。T24, T24CR, RT4, RT4CR 各々を CDDP 投与後生き残った細胞 (耐性細胞) の割合を算出した。

RNA-seq 解析

T24, T24CDDP 1 日処理, T24CR から精製した全 RNA $1\mu\text{g}$ を Bioanalyzer 2100 Eukaryote Total RNA nano kit (Agilent) を用いて品質解析を行った後, NEBNext Poly (A) Magnetic Isolation Module および NEBNext Ultra RNA Library Prep Kit (New England Biolab) を用いて mRNA-seq ライブラリーを調整した。調整したライブラリーのシーケンス解析は HiSeq1500 を用いて行った。3,000–4,000 万リードのシーケンスを CLC Genomics Workbench を用いてヒトゲノム (hg19) にマッピング, 発現解析を行った。得られた遺伝子群をさらに DAVID (<https://david.ncicrf.gov/>) により GO 解析及びパスウェイ解析を行った。

統計

結果は平均値 ± 標準誤差 (SEM) で表記した。各群の比較には Student t-test を用いた。p < 0.05 を統計学的有意とした。

3. 実験結果

T24 に対しては, 初期濃度として CDDP $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ を 2 ヶ月, 続いて CDDP $1\mu\text{g}/\text{ml}$ を 2 ヶ月, 計 4 ヶ月間段階的に順次暴露濃度を変更し, T24 CDDP $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 耐性細胞株 (T24CR) を樹立した (図 1)。耐性細胞であるか確認するため, T24, T24CR に CDDP 無添加, CDDP $1\mu\text{g}/\text{ml}$, $5\mu\text{g}/\text{ml}$ で培養し, 3 日後に細胞生存率を算出した。T24 は, CDDP $1\mu\text{g}/\text{ml}$ で, 細胞生存率は 10% 以下。一方 T24CR は CDDP $1\mu\text{g}/\text{ml}$ で細胞生存率は 50% 以上であった (p < 0.01)。さらに T24 は CDDP $5\mu\text{g}/\text{ml}$ で, 細胞生存率は 3% 以下。T24CR は CDDP $5\mu\text{g}/\text{ml}$ で 10% 以上の細胞生存率を認めた (p < 0.05) (図 2)。

一方 RT4 は, 初期濃度として CDDP $0.1\mu\text{g}/\text{ml}$ を 2 ヶ月, $0.3\mu\text{g}/\text{ml}$ を 2 ヶ月, $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ を 2 ヶ月, $0.75\mu\text{g}/\text{ml}$ を 2 ヶ月, $1\mu\text{g}/\text{ml}$ を 1 ヶ月, 計 9 ヶ月間かけて段

階的に緩徐に暴露濃度を変更し, RT4 CDDP $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 耐性細胞株 (RT4CR) を樹立した (図 3)。耐性細胞の確認は, RT4, RT4CR に CDDP 無添加, CDDP $1\mu\text{g}/\text{ml}$, $2\mu\text{g}/\text{ml}$ で培養し, 3 日後に細胞生存率を算出。RT4 は, CDDP $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 処理で, 細胞生存率は 30% 以下。一方 RT4CR は CDDP $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 処理で細胞生存率は 60% 以上であった (p < 0.01)。さらに RT4 は CDDP $2\mu\text{g}/\text{ml}$ で, 細胞生存率は 10% 以下。RT4CR は CDDP $2\mu\text{g}/\text{ml}$ 存在下で 50% 以上の細胞生存率を認めた (p < 0.01) (図 4)。

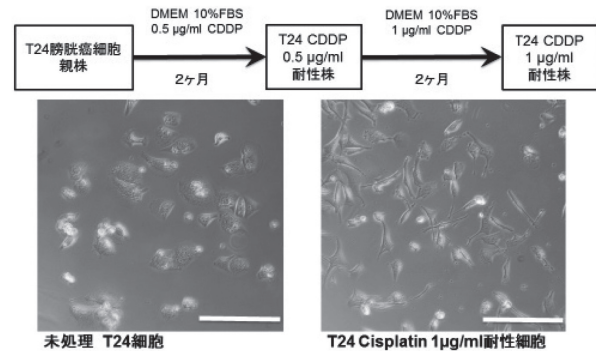


図 1 T24CDDP 耐性細胞樹立

T24 は 4 ヶ月間, 段階的に暴露濃度を変更し, T24 CDDP ($1\mu\text{g}/\text{ml}$) 耐性細胞株 (T24CR) を樹立。

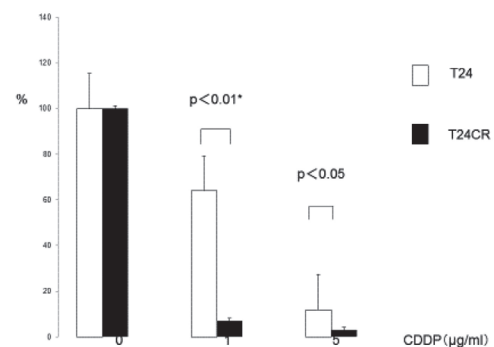


図 2 T24 における CDDP 耐性細胞の確認

T24, T24CR に CDDP 無添加, CDDP $1\mu\text{g}/\text{ml}$, $5\mu\text{g}/\text{ml}$ の状況下で培養し, 3 日後に細胞生存率を算出。T24 は, CDDP $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 処理で, 細胞生存率は 10% 以下。一方 T24CR は CDDP $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 処理で細胞生存率は 50% 以上。さらに T24CR は CDDP $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 存在下で 10% 以上の細胞生存率を認めた。

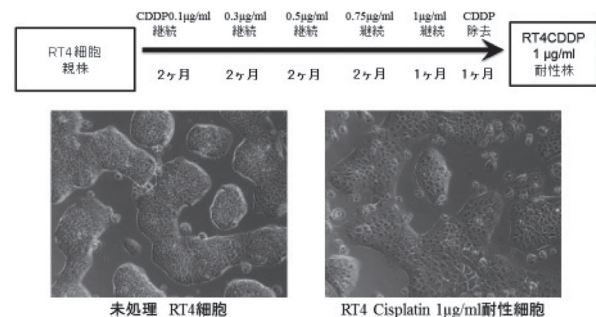


図 3 RT4CDDP 耐性細胞樹立

RT4 は 9 ヶ月間, 段階的に緩徐に暴露濃度を変更し, RT4 CDDP ($1\mu\text{g}/\text{ml}$) 耐性細胞株 (RT4CR) を樹立。

膀胱癌での詳細な遺伝子の発現解析と機能解析を行うことにより、治療の標的と有効なバイオマーカーの確立を目指して RNA-seq による網羅的遺伝子解析を行った。無処理の T24 と比較した CDDP 1 μ g/ml 処理 1 日より発現変動 (亢進) した遺伝子は 499、と CDDP 耐性細胞により発現変動 (亢進) した遺伝子数は 1,738、両方で発現変動 (亢進) した遺伝子は 417 であった (発現亢進は発現が 2 倍以上 (Fold Change < 2) かつ false discovery rate (FDR) p-value < 0.05 を満たすものとした) (図 5)。CDDP 1 日処理で発現変動 (亢進) した 499 遺伝子に対しパスウェイ解析を行ったところ、アポトーシス、p53 ならびに細胞周期に関わる遺伝子が含まれていることが判明した (図 6 a)。一方 CDDP 耐性細胞により発現変動 (亢進) した 1,738 遺伝子数に対するパスウェイ解析では細胞接着や増殖因子ならびに細胞の形態・分化・運動性に関わる遺伝子が含まれていることが判明した (図 6 b)。

4. 考 察

今回の実験に用いた細胞株は、いずれも代表的なヒトの膀胱癌細胞株である。グレード II (G2) の膀胱移行上皮癌に由来する p53 変異型の T24、グレード I (G1) の乳頭状膀胱癌に由来する p53 野生型の RT4 各々に対する CDDP 耐性細胞を樹立したことにより、T24 は筋層浸潤性膀胱癌の CDDP 耐性細胞、RT4 は筋層非浸潤性膀胱癌の CDDP 耐性細胞を想定し、今後解析を進める研究基盤を樹立した。

本研究では、まず膀胱癌培養細胞株 T24 に CDDP を段階的に順次暴露濃度を上昇させ、計 4 ヶ月かけ CDDP 耐性細胞株 T24CR を樹立した。Tanaka らの報告⁶では、暴露濃度を 0.1 μ M から段階的に 3 μ M まで増量し、CDDP 総暴露期間 6 ヶ月間を経て T24CR を樹立しており、我々の報告では耐性細胞樹立までの期間短縮が可能となった。一方 RT4 に関しては、これまでに RT4 を用いた CDDP 耐性細胞株の樹立に関する報告は Mani らの報告のみである。当初、T24 と同濃度の CDDP を初期濃度に設定し耐性細胞樹立を目指したが、早期から細胞死を認め、結果を再現することができなかった。この結果を踏まえて、Tanaka らの方法を参考に CDDP の初期濃度を T24 耐性細胞作成より低濃度で設定し、培地の継代も短縮して処置を継続する事により、本論文の如く約 9 ヶ月間の長期間を経て CDDP 耐性細胞株 RT4CR を樹立した。グレード I (G1) の乳頭状膀胱癌に由来する RT4 は CDDP により、容易に細胞死に至る性質のため、CDDP 耐性誘導が困難であり、RT4 耐性株においても CDDP 耐性細胞確認実験の際にも、T24 と同濃度 (1 μ g/ml) ならびに高濃度耐性実験はやや低い濃度 (2 μ g/ml) で検証

した。

RNA-seq 解析から、T24 では、一過性の CDDP 処理ではアポトーシス、細胞周期関連遺伝子の発現変動がみられ、耐性細胞では、上皮間葉転換 (EMT) に関連する遺伝子群をはじめ、細胞分化や細胞形態、運動性に関わる遺伝子群に発現変動するものが濃縮されており Tanaka らのマイクロアレイを用いた T24 に対す

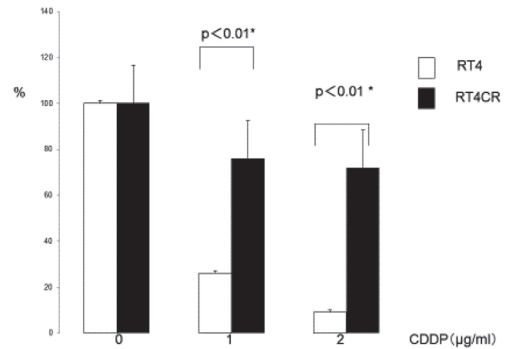


図 4 RT4, RT4CR に CDDP 無添加, CDDP 1 μ g/ml, 2 μ g/ml の状況下で培養し、3 日後に細胞生存率を算出。RT4 は、CDDP 1 μ g/ml 処理で、細胞生存率は 30% 以下。一方 RT4CR は CDDP 1 μ g/ml 処理で細胞生存率は 60% 以上。さらに RT4CR は CDDP 2 μ g/ml 存在下で 50% 以上の細胞生存率を認めた。



図 5 無処理の T24 細胞と比較した CDDP 1 μ g/ml 処理 1 日より発現亢進した遺伝子と CDDP 耐性細胞により発現亢進した遺伝子数

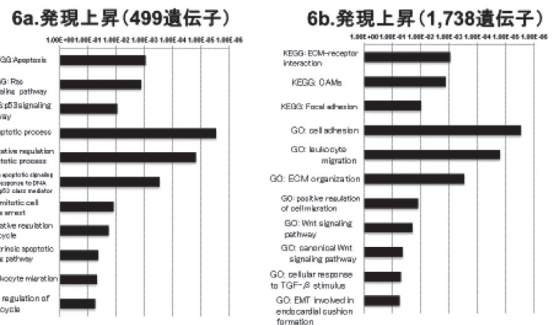


図 6 a T24 に CDDP 1 日処理で発現変動 (亢進) した遺伝子のパスウェイ解析

図 6 b T24 に CDDP 耐性細胞で発現変動 (亢進) した遺伝子のパスウェイ解析

る CDDP 耐性細胞における網羅的遺伝子解析の報告と矛盾しない結果であった。今後今回樹立した RT4 に対する CDDP 耐性細胞についても RNA-seq による網羅的遺伝子解析を予定している。

5. 結 論

膀胱癌細胞株 T24 と RT4 の CDDP 耐性細胞株を樹立した。乳頭状膀胱癌に由来する p53 野生型の RT4 における耐性株の樹立は本邦では初の報告と考えられた。網羅的遺伝子解析では T24 耐性細胞では細胞接着や増殖因子ならびに細胞の形態・分化・運動性に関わる遺伝子の発現が亢進していた。今後本研究で新たに樹立した RT4CR に対する網羅的遺伝子解析を予定している。

文 献

- 1) 日本泌尿器科学会：膀胱癌診療ガイドライン 2015 年版. 医学図書出版, 東京. 2015 ; pp.1-4.
- 2) 鈴木康太郎, 細田英幸, 舟橋 亮, 千葉喜美男, 品川俊人, 水野伸彦, 藤川直也, 村川貴之, 池田伊知郎, 河野尚美：筋層非浸潤性膀胱癌の進展に関する臨床検討. 泌紀. 2012 ; 58 : 1-5.
- 3) Honma I, Masumori N, Sato E, et al : Local recurrence after radical cystectomy for invasive bladder cancer : an analysis of predictive factors. *Urology*. 2004 ; 64 : 744-748.
- 4) Advanced Bladder Cancer (ABC) meta-analysis collaboration : Neoadjuvant chemotherapy in invasive bladder cancer : updated of a systemic review and meta-analysis of individual patient data. *Eur. Urol*. 2005 ; 48 : 202-206.
- 5) 富田喜彦：immuno-oncology drug によるがん薬物治療の新展開. 医事新報. 2018 ; 4901 : 53.
- 6) Tanaka N, Miyajima A, et al : Acquired platinum resistance enhances tumour angiogenesis through angiotensin II type 1 receptor in bladder cancer. *Br. J. Cancer*. 2011 ; 105 : 1331-1337.
- 7) Bamias A, et al : Prospective, open-label, randomized, phase III study of two dose-dense regimens MVAC versus gemcitabine/cisplatin in patients with inoperable, metastatic or relapsed urothelial cancer. *Ann. Oncol*. 2013 ; 24 : 1011-1017.
- 8) 越智淳三：Cis-diamminedichloroplatinum 耐性ヒト膀胱癌培養細胞株の樹立とその特性. 日泌会誌. 1991 ; 82 : 1045-1052.
- 9) Watanabe R, Kanno SI, Mohammadi Roushandedeh A, Ui A, and Yasui A : Nucleosome remodelling, DNA repair and transcriptional regulation build negative feedback loops in cancer and cellular ageing. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci*. 2017 ; 372 : 20160437.
- 10) Bubenik J, Beresova M, et al : Established cell line of urinary bladder carcinoma (T24) containing tumour-specific antigen. *Int. J. Cancer*. 1973 ; 11 : 765-773.
- 11) Rigby CC and Franks LM : A human tissue culture cell line from a transitional cell tumour of the urinary bladder : growth, chromosome pattern and ultrastructure. *Br. J. Cancer*. 1970 ; 24 : 746-754.
- 12) 加藤哲郎, 石川 清, 根本良介：ヒト膀胱癌由来樹立細胞株 T24 ならびに MGH-U1 の形態学的研究. 日泌会誌. 1978 ; 69 : 40-46.
- 13) 関口 浩：培養ヒト膀胱癌細胞株による制癌剤感受性試験. 日泌会誌. 1983 ; 74 : 25-31.
- 14) Mani J, et al : Chemoresistance is associated with increased cytoprotective autophagy and diminished apoptosis in bladder cancer cells treated with the BH3 mimetic (-)-Gossypol (AT-101). *BMC Cancer*. 2015 ; 15 : 224.
- 15) Tanaka N, Kosaka T, et al : Acquired platinum resistance involves epithelial to mesenchymal transition through ubiquitin ligase FBXO32 dysregulation. *JCI. Insight*. 2016 ; 1 : e83654.

(2018年8月24日受理)