



Rapid Assay for Cell Death

上皮性卵巣癌 細胞株におけるカスパーゼ活性と化学物質に対する反応との相関性

By Ayesha B. Alvero, M.D., and Gil Mor, M.D., Ph.D., Department of Obstetrics and Gynecology, Yale University School of Medicine

アブストラクト

治療効果の迅速な判定は、卵巣癌患者にとっては特に有益です。本研究では、薬剤誘発性のカスパーゼ活性化をウェスタンブロット法とCaspase-Glo™ Assayで求め、両測定結果の相関性を明らかにしました。我々は初期の研究において、細胞毒性物質に対するin vitro反応の評価法に、Caspase-Glo™ Assayが簡便、迅速かつ高感度な選択肢を提供することを既に実証しています。臨床におけるカスパーゼ活性と治療効果との相関性は現在検討中です。

本研究の結果、Caspase-Glo™ Assayを用いれば、処置に対するEOC細胞株の反応性が2～3時間以内で評価できることを明らかにしました。

イントロダクション

上皮性卵巣癌（EOC）は女性における癌に関連する死因の第4位を占めており、婦人科癌の中で最も致死率の高い癌です（1）。EOC治療の主な限界のひとつは通常用いられる化学療法剤に対する耐性の発現です。臨床効果の実用的な予測手段がないため、用法には難しい問題が存在します。

化学療法剤による細胞障害作用の主要な機序がアポトーシス、すなわちプログラム細胞死であることは、現在では十分に立証されています（2）。アポトーシスはカスパーゼと称される細胞内因子のカスケードを介する反応です。カスパーゼは特異性の高いプロテアーゼで、酵素前駆体として合成され切断により活性化されます（3）。カスパーゼはアポトーシスの「イニシエーター」と「エフェクター」に分類することができます。イニシエーターカスパーゼ（カスパーゼ-8、-9など）は上流のシグナルにตอบสนองしてオリゴマー形成および自己活性化をもたらす一方、エフェクターカスパーゼ（カスパーゼ-3、-6、-7など）は細胞基質を断片化することにより、アポトーシス死を引き起こします。

我々は最近、再発性卵巣癌患者の悪性腹水から単離したEOC細胞中のカスパーゼ-3活性と同患者における化学療法のin vivo効果との間に相関性がみられることを明らかにしました（4）。その研究では、活性化型カスパーゼ-3の発現検出にウェスタンブロット法を用いました。しかし、ウェスタンブロット法には、長時間を要する、感度が低い、材料を大量に要するといったいくつかの欠点があります。

本研究の目的は、ドセタキセルおよびTriapine®処理したEOC細胞を用いてCaspase-Glo™ Assayの感度および特異性を評価することとしました。本稿には、ウェスタンブロット法により求めた活性化型カスパーゼの発現とCaspase-Glo™ Assayにより測定したカスパーゼ活性との相関性を示します。

方法

Caspase-Glo™ Assay

Caspase-3/7、-8および-9活性は、それぞれCaspase-Glo™ 3/7、8および9 Assayを用いて測定しました。カスパーゼ活性化は3種類のシステム、すなわち 1) 細胞ライセート、シングル アッセイ、2) 腫瘍検体由来のタンパク質抽出物、ならびに3) 全細胞（whole cell）培養、96ウェルプレートアッセイにて評価しました。

細胞ライセート

EOC細胞（ $5 \sim 10 \times 10^5$ ）は100×20mmのシャーレ（BD Discovery Labware, Bedford, MA）に播種し、70～80%コンフルエントになるまで培養しました。この時点で培地をOpti-MEM® I reduced-serum medium（GIBCO, Carlsbad, CA）に交換し、4時間後、ドセタキセル（Aventis）100ng/mlまたはTriapine®（Vion）10mMで0、24、48および72時間処理しました。処理後の細胞は培養容器からかき落とし、遠心（1,500rpm、4）によりペレット状にした後、PBS（1%NP40、0.1%SDSを含む）中で溶解しました。氷上で20分間インキュベート後、細胞残渣を遠心分離（14,000×g、4）しました。タンパク質10μg（全容量50μl）と平衡化したCaspase-Glo™ 3/7、Caspase-Glo™ 8またはCaspase-Glo™ 9 Reagent 50μlを混和し、室温で1時間インキュベートしました。発光はTD-20/20 Luminometerを用いて測定しました。

腫瘍検体由来のタンパク質抽出物

卵巣癌異種移植モデルから採取した腫瘍検体をホモジナイズし、既報の方法に従ってタンパク質を抽出しました（5）。タンパク質5～10μg（全容量50μl）と平衡化したCaspase-Glo™ 3/7、Caspase-Glo™ 8またはCaspase-Glo™ 9 Reagent 50μlを混和し、室温で1時間インキュベートしました。発光はTD-20/20 Luminometerを用いて測定しました。

96ウェルプレートアッセイ

EOC細胞（ $2 \sim 5 \times 10^3$ 個/ウェル）を96ウェルプレートに播種し、24時間インキュベートしました。その後、細胞をOpti-MEM® 培地で4時間インキュベートし、ドセタキセルでさらに24時間処理しました。ドセタキセル処理終了時にCaspase-Glo™ 3/7 Reagent 50μlを各ウェルに添加し、1時間インキュベートしました。発光はTurner Designs社のReporter® microplate luminometerを用いて測定しました。

結 果

細胞ライセート中のカスパーゼ-3活性

活性化型カスパーゼ-3の有無はまず、ウェスタンブロット法により評価しました。図1のパネルAに示すように、ドセタキセル処理後、感受性細胞（CP70）では活性化型カスパーゼ-3（p19, p17）の発現が認められたのに対し、耐性細胞（R182）では活性化型カスパーゼ-3の発現が認められませんでした。続いて、同一検体中のカスパーゼ-3活性をCaspase-Glo™ 3/7 Assayを用いて評価しました。図1のパネルBに示すように、カスパーゼ-3活性はウェスタンブロット法により求めたp19/p17の発現と一致します。すなわち、ドセタキセルで24時間処理したCP70細胞には高レベルのカスパーゼ-3活性が確認されました。カスパーゼ-3活性はドセタキセル48時間処理時点でさらに上昇し、72時間処理時点で低下しました。ドセタキセル処理したR182細胞から得た検体には、測定可能なカスパーゼ-3活性は認められませんでした。

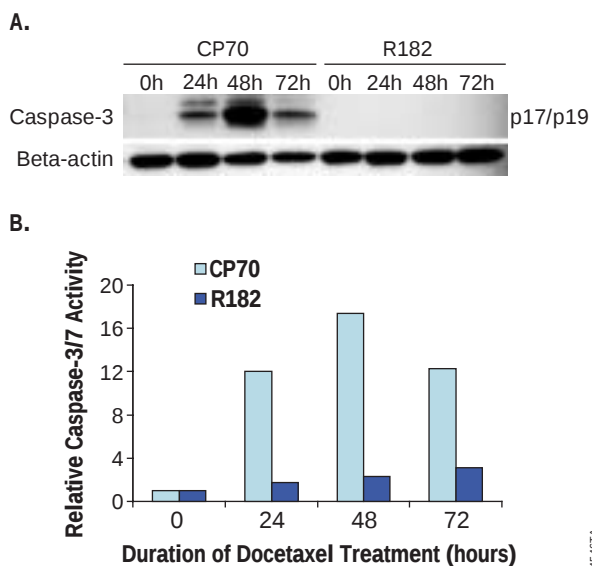


図1. 細胞ライセート中のカスパーゼ-3活性測定

CP70およびR182細胞はドセタキセル100ng/mlで0、24、48および72時間処理した。カスパーゼ-3活性は、細胞ライセートを用いてウェスタンブロット法（パネルA）およびCaspase-Glo™ 3/7 Assay（パネルB）により求めた（p17およびp19は活性化型カスパーゼ-3）。

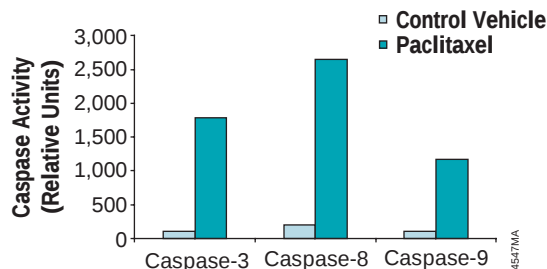


図2. バクリタキセルまたは対照溶媒を10日間投与した動物から採取した腫瘍検体中のカスパーゼ-3、-8および-9活性を求めた。

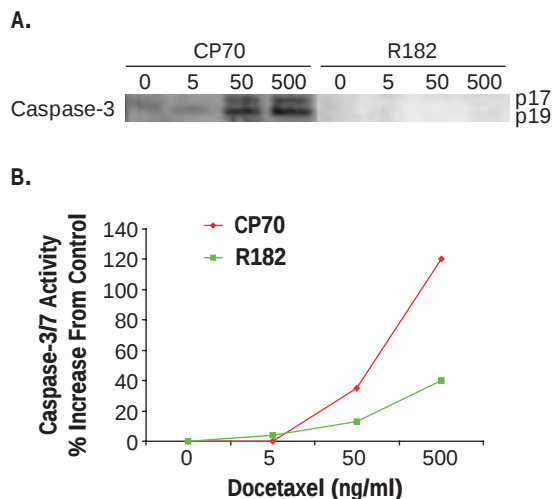


図3. 96ウェルプレートで培養した全細胞（whole cell）中のカスパーゼ活性
パネルA. CP70およびR182細胞は段階希釈したドセタキセルで24時間処理した。カスパーゼ-3活性は、細胞ライセートを用いてウェスタンブロット法により求めた（p17およびp19は活性化型カスパーゼ-3）。パネルB. CP70およびR182細胞は96ウェルプレートで培養した後、パネルAと同様にドセタキセル処理した。全細胞（whole cell）中のカスパーゼ-3活性はCaspase-Glo™ 3/7 Assayを用いて測定した。

腫瘍検体中のカスパーゼ活性

この実験の目的は、化学療法を施行された動物の腫瘍検体から得たタンパク質抽出物中のカスパーゼ-3、-8および-9活性が測定可能かどうかを明らかにすることでした。本アッセイに使用したタンパク質は5μgと少量でしたが、優れたシグナルを得ることができました。図2に示すように、Caspase-Glo™ Assayは、治療に反応した腫瘍検体中のカスパーゼ活性を十分検出する感度を有していました。

96ウェルプレートで培養した全細胞（whole cell）中のカスパーゼ活性

ウェスタンブロット法により求めた細胞ライセート中の活性化型カスパーゼ-3の発現と、Caspase-Glo™ Assayにより測定した全細胞（whole cell）中のカスパーゼ-3活性の相関性を明らかにするため、CP70細胞およびR182細胞を96ウェルプレートに播種後、10倍系列希釈したドセタキセル（0～500ng/ml）で24時間処理しました。図3に示すように、96ウェルプレートアッセイは細胞ライセートを用いたウェスタンブロット法と同様の結果を示しました。

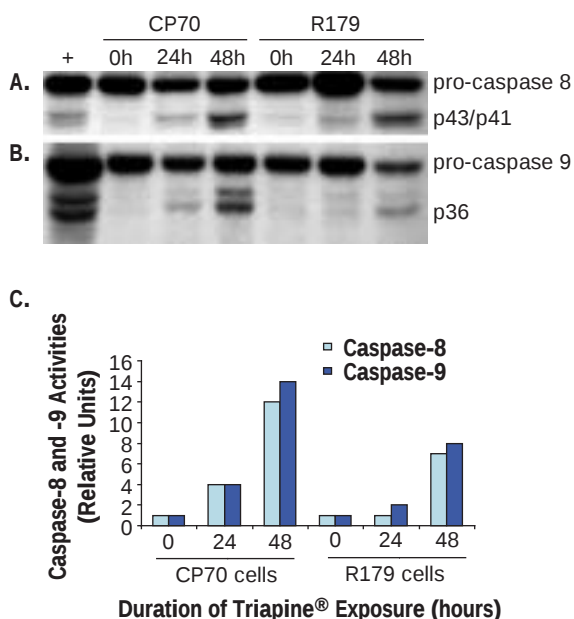


図4. カスパーゼ-8および-9発現と活性との相関性
CP70およびR179細胞はTriapine® 10μMで0、24および48時間処理した。カスパーゼ-8および-9活性は、細胞ライセートを用いてウェスタンブロット法（パネルA）およびCaspase-Glo™ 8および9 Assay（パネルB）により求めた（p43/41は活性化型カスパーゼ-8、p36は活性化型カスパーゼ-9）。

カスパーゼ-8および-9の発現および活性

我々はウェスタンブロット法で認められた活性化型カスパーゼ-8および-9の発現と、Caspase-Glo™ 8および9 Assayにより求めたカスパーゼ-8および-9のin vitro活性との相関性も評価しました。この評価には、Triapine® 10mMで0、24および48時間処理したCP70細胞とR179細胞を用いました。図4のパネルAに示すように、両細胞株中の活性化型カスパーゼ-8（p45）および-9（p36）発現はTriapine® 48時間処理時点でピークに達しました。Caspase-Glo™ 8 AssayおよびCaspase-Glo™ 9 Assayの結果、両細胞株中のカスパーゼ-8および-9活性も同様の時間依存的な上昇を示すことが明らかになりました（図4、パネルC）。

結 論

治療効果を迅速に判定できる高感度で特異的なアッセイが利用可能であることは、EOC患者には特に有益です。本研究の結果、Caspase-Glo™ Assayを用いれば、治療に対するEOC細胞株の反応性が2～3時間以内に評価できることが明らかになりました。これは、結果が得られるまでに最長3日を要するウェスタンブロット法とは対照的です。Caspase-Glo™ Assayには、96ウェルプレート中の全細胞（whole cell）細胞および組織のタンパク質抽出物にも用いることができます。

臨床におけるカスパーゼ活性と治療効果との相関性は現在検討中です。

参考文献

1. Schwartz, P.E. (2002) *Cancer Treat. Res.* **107**, 99–118.
2. Kaufmann, S.H. and Earnshaw, W.C. (2000) *Exp. Cell Res.* **256**, 42–9.
3. Cohen, G.M. (1997) *Biochem. J.* **326** (Pt 1), 1–16.
4. Flick, M.B. et al. (2004) *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*, in press.
5. Kamsteeg, M. et al. (2003) *Oncogene* **22**, 2611–20.

製品案内については23ページをご覧ください。