

Establishment and Characterization of  
two novel pancreatic carcinoma cell lines

新たに樹立した膵癌細胞株 2 株の生物学的特性の解析

平成 26 年 3 月

富山大学大学院

医学薬学研究部 (博士課程) 生命・臨床医学専攻

消化器・腫瘍・総合外科 (外科学第二講座)

平野 勝久

<目次>

Establishment and Characterization of two novel pancreatic carcinoma cell lines  
(新たに樹立した膵癌細胞株2株の生物学的特性の解析)

要旨	3
緒論	5
材料・実験方法	6
結果	9
考察	10
結語	11
謝辞	12

参考文献

## 要旨

### <目的>

膵癌は世界的に最も予後不良な癌の一つである。膵癌は診断時に進行例であることが多く、治癒切除可能な症例が多くない。また化学療法に対しても抵抗性であることが予後不良な原因として考えられている。今回の研究では、詳細な症例背景が判明している症例を用いて新たに膵癌細胞株 (TYPK-1, TYPK-2) を樹立した。さらにその生物学的特性について解析した。

### <方法並びに成績>

#### 1. 患者背景

##### *TYPK-1*

症例は 82 歳の男性で、膵癌 (T4, N1, M0, UICC 第 7 版) と診断された。門脈、肝動脈への浸潤が疑われ、治癒切除困難と判断された。消化管通過障害に対して姑息的手術 (胃空腸バイパス、空腸空腸バイパス、空腸瘻造設) が施行された。その後、積極的な治療は行わず原病死した。

##### *TYPK-2*

症例は 55 歳の男性で、肝転移を認め、切除不能膵癌 (T4, N1, M1, UICC 第 7 版) と診断された。GS 療法 (Gemcitabine + TS-1) が開始されたが、肝転移の増大と癌性腹水の出現を認めたため、FOLFIRINOX 療法 (5-FU, leucovorin, irinotecan, and oxaliplatin) に変更された。その後も腫瘍は増大傾向を認め、骨転移も出現し、原病死した。

#### 2. 初代培養

TYPK-1, TYPK-2 ともに培地は 5% の fetal bovine serum (FBS; GIBCO, Grand Island, NY, USA) を加えた Dulbecco's modified Eagles' medium plus Ham's F12 (DMEM/Ham's; Wako, Osaka, Japan) を用いて、37°C, 5% CO<sub>2</sub> の環境で培養した。

##### *TYPK-1*

手術時にサンプリングしたリンパ節を phosphate-buffered saline (PBS) で洗浄した後に、剪刀を用いて細かく細断し、これを培養した。

##### *TYPK-2*

腹水穿刺によって採取した 50ml の癌性腹水を 1600G, 10 分間遠心分離した。上清を取り除き、ペレットを回収し培養した。

#### 3. 継代方法

Subconfluent となった細胞は、PBS (-) で洗浄した後に 0.25% Trypsin-EDTA (ThermoFisher, Waltham, MA, USA) を加え、37°C, 5% CO<sub>2</sub> で 5 分間インキュベートして、細胞を剥離した。細胞懸濁液に 5ml の培地を加え、1600G, 5 分間の遠心分離を行った。上清を除去してペレットを回収した。これを 4 等分に分けて培地を加えて継代した。

#### 4. 細胞増殖曲線

$5 \times 10^4$  cells の細胞懸濁液を 35mm-dish に播種し培養した。24 時間ごとに 0.25% Trypsin-EDTA を用いて細胞を剥離し、細胞数を計算した。9 日間の細胞数をもとに細胞増殖曲線を作成した。そこから doubling time を計算したところ、TYPK-1 と TYPK-2 それぞれ 22.1 時間と 40.4 時間であった。

#### 5. マウス皮下移植

生後 6 週の雌ヌードマウス (BALB/CAN, Cg-Foxn1<sup>nu</sup>/CrlCrlj; Charles River Laboratories, Yokohama, Japan) の皮下に  $1 \times 10^7$  cells の TYPK-1, TYPK-2 をそれぞれ移植した。3 か月後にともに直径 1 cm 大の皮下腫瘍を形成しこれを摘出し、10%ホルマリンで固定した後に HE 染色を行った。TYPK-1, TYPK-2 ともに腺癌の形態を認めた。

## 6. 遺伝子解析

TYPK-1 および TYPK-2 の TP53、KRAS の変異を direct-sequencing analysis によって解析した。TP53 の exon5-8、KRAS の codon12 の変異について解析した。その結果、TYPK-1 は KRAS、TP53 ともに wild type であった。TYPK-2 について TP53 は wild type であったが、KRAS の codon12 に GGT→CGT の変異を認めた。

## 7. コロニー形成率 (Colony formation efficiency; CFE)

TYPK-1、TYPK-2 それぞれの細胞を 300cells, 500cells, 1000cells ずつ 60mm-dish に播種し 5ml の培養液を加え 7 日間培養した。その後 Diff-Quick で染色し、10cells 以上を含むコロニーの数を測定した。形成したコロニー数から CEF を計算すると、TYPK-1 と TYPK-2 はそれぞれ 10.8%と 19.9%であった。

## 8. Cell migration assay and Matrix invasion assay

Cell culture insert 用 24well-plate と Cell culture insert を用いて cell migration assay と matrix invasion assay を行った。Cell migration assay では upper chamber に FCS を含まない DMEM/Ham' s F12 培地を 250 $\mu$ L と  $1 \times 10^6$ cells を播種、Lower chamber には DMEM/Ham' s F12+50% FCS 750 $\mu$ L を加えた。Matrigel invasion assay では upper chamber に希釈した Matrigel (Corning, LA, USA) を 100 $\mu$ L 加えて 8 時間培養しゲル化させた。以下は cell migration assay と同様のプロトコールで行った。Migration assay では TYPK-1 と TYPK-2 において同程度であったが、matrigel invasion assay では TYPK-2 のほうが高い浸潤能を示した。

## 9. 抗癌剤感受性

膵癌治療に用いられる gemcitabine (GEM), 5-fluorouracil (5-FU), oxaliplatin (L-OHP) のそれぞれに対する薬剤感受性を MTT assay により解析した。この実験には既存の膵癌細胞株である KMP-2 を TYPK-1、TYPK-2 の比較として用いた。それぞれ細胞株について GEM, 5-FU, CDDP, L-OHP に対する IC50 を計算したところ、TYPK-1 はこれまでに報告されている膵癌細胞株と比較しても高い GEM 耐性を示した。また TYPK-2 は L-OHP に抵抗性を示した。

## 10. 薬剤感受性関連遺伝子

GEM は hENT1 によって細胞内に取り込まれ dCK によってリン酸化を受けることにより活性を得る。5-FU は DPD によって失活される。白金製剤により架橋形成された DNA は ERCC1 によってヌクレオチド除去修復を受ける。今回はこれら hENT1, dCK, DPD, ERCC1 の発現について real-time PCR によって解析した。TYPK-1, TYPK-2, KMP-2 で比較したときに、GEM の感受性と hENT1, dCK の発現には相関を認めた。5-FU に最も抵抗性を示した KMP-2 は最も DPD の発現が高い結果であった。しかし、TYPK-1 と TYPK-2 を比較すると、TYPK-2 が 5.9 倍と高い DPD 発現を認めたが、5-FU に対する感受性は同程度であった。L-OHP に最も感受性の高い KMP-2 では最も ERCC1 の発現が低い結果であった。しかし TYPK-1 と TYPK-2 を比較すると、TYPK-2 の L-OHP に対する感受性は低いが、ERCC1 の発現については TYPK-1 の 0.19 倍であった。

### <総括>

今回我々は新たな膵癌細胞株である TYPK-1, TYPK-2 を樹立した。両細胞株ともヌードマウスへの移植が可能であった。TYPK-1 は GEM に、TYPK-2 は L-OHP に対して抵抗性を示した。TYPK-1 は TP53 wild type の細胞株であり、これまでに GEM 耐性株として知られている PANC1 などは TP53 変異株であり、比較することで TP53 に依存しない薬剤耐性機構を解明できる可能性がある。TYPK-2 は高い増殖能力と浸潤能を認め、転移性膵癌の性質を反映していることと考えられた。局所進行膵癌から樹立した TYPK-1 と比較することにより、転移のメカニズムを解明する一助となる可能性がある。

膵癌は世界的にも最も予後不良な癌のひとつである(1)。大半の膵癌症例においては、診断された時点で進行例であり、治癒切除が困難である(1-3)。治癒切除が可能な症例は10~15%ほどであるとの報告もある(1)。そのため、膵癌の予後を改善させるためには補助療法が重要となる。しかし、化学療法や放射線化学療法などが行われているが、膵癌の予後は依然として不良であり、5年生存率は5%以下である(1,3)。

切除不能膵癌のなかでも、転移性膵癌においては化学療法や放射線化学療法などの姑息的治療に限られている(4)。しかし、局所進行膵癌のなかで切除断端陽性となった膵切除症例のほうが、切除不能局所進行膵癌と比較して予後が改善されるとの報告もある(5,6)。そのため化学療法が局所進行膵癌の予後を改善させるのに重要となる。膵癌治療において、Gemcitabine (GEM)が最も多く用いられる抗癌剤の一つである(4)。そのほかに経口5-fluorouracil (5-FU)剤であるS-1がGEMと比較して非劣性が示されている(7,8)。また、近年5-FUとleucovorin, irinotecan, oxaliplatin (L-OHP)を組み合わせたFOLFIRINOXが膵癌に対する治療として導入された(9)。様々な治療法が施行されているが、膵癌の予後はいまだ満足できるものではない。膵癌治療を向上させるためには、膵癌細胞の生物学的、遺伝的研究が重要となってくる。その研究ツールとして膵癌細胞株は有用な材料である。今回我々は、切除不能局所進行膵癌からTYPK-1を、GEM+S-1 (GS)療法と近年導入されたFOLFIRINOXにも耐性を示した切除不能転移性膵癌からTYPK-2を樹立した。

## 材料・実験方法

本研究は富山大学倫理委員会の承認(臨認 22-11)を受けており、患者からのインフォームド・コンセントを得て行われている。

### 患者背景

#### *TYPK-1*

症例は 82 歳の男性で、上腹部違和感を主訴に精査を受けたところ、膵癌 (T4, N1, M0, UICC 第 7 版) と診断された。門脈、肝動脈への浸潤が疑われ、治癒切除困難と判断された。腫瘍は十二指腸を壁外性に圧排し通過障害を来していたため、姑息的手術(胃空腸バイパス、空腸空腸バイパス、空腸瘻造設)が施行された。その後、希望により積極的な治療は行わず原病死した。

#### *TYPK-2*

症例は 55 歳の男性で、心窩部痛を主訴に精査を受けたところ、肝転移を伴う膵癌 (T4, N1, M1, UICC 第 7 版) と診断された。手術適応はなく、GS 療法 (Gemcitabine + S-1) が開始された。しかし、肝転移の増大と癌性腹水の出現を認めたため、FOLFIRINOX に変更された。その後も腫瘍は増大傾向を認め、骨転移も新たに出現し、原病死した。

### 初代培養

TYPK-1, TYPK-2 ともに培地は 5% の fetal bovine serum (FBS; GIBCO, Grand Island, NY, USA) を加えた Dulbecco' s modified Eagles' medium plus Ham' s F12 (DMEM/Ham' s; Wako, Osaka, Japan) を用いて、37°C, 5% CO<sub>2</sub> の環境で培養した。

#### *TYPK-1*

手術時にサンプリングしたリンパ節を phosphate-buffered saline (PBS) で洗浄した後に、剪刀を用いて細かく細断し、これを培養した。

#### *TYPK-2*

腹水穿刺によって採取した 50ml の癌性腹水を 1600G, 10 分間遠心分離した。上清を取り除き、ペレットを回収した。これを 24well-plate のうち 6well に均等に分散して播種した。培地を加え、上記の条件で培養した。

### 継代方法

Subconfluent となった細胞は、PBS(-)で洗浄した後に 0.25% Trypsin-EDTA (ThermoFisher, Waltham, MA, USA) を加え、37°C, 5% CO<sub>2</sub> で 5 分間インキュベートして、細胞を剥離した。細胞懸濁液に 5ml の培地を加え、1600G, 5 分間の遠心分離を行った。上清を除去してペレットを回収し継代した。

### 細胞増殖曲線

5×10<sup>4</sup> cells の細胞懸濁液を 35mm-dish に播種し培養した。24 時間ごとに 0.25% Trypsin-EDTA を用いて細胞を剥離した。1600G で 5 分間遠心分離を行い、ペレットを回収した。トリパンブルーで死細胞を除去した細胞数を計算した。9 日間の細胞数をもとに細胞増殖曲線を作成した。細胞数のカウントは triplicate で行い、中央値と標準偏差を計算した。

## マウス皮下移植

生後 6 週の雌ヌードマウス (BALB/CAN, Cg-Foxnl<sup>tm</sup>/Cr1Cr1j; Charles River Laboratories, Yokohama, Japan) の皮下に  $1 \times 10^7$  cells の TYPK-1, TYPK-2 をそれぞれ移植した。3 か月後に sacrifice し皮下腫瘍を摘出した。摘出した腫瘍は 10%ホルマリンを用いて固定し、48 時間以内に FFPE を作成して HE 染色を行った。

## 染色体解析

58 継代した TYPK-1 と 45 継代した TYPK-2 をそれぞれ G-band (Q-band) 染色によって染色体を解析した。

## 遺伝子変異解析

TYPK-1 および TYPK-2 について KRAS と TP53 遺伝子の変異の有無について解析した。KRAS については codon 12 と codon 13 の変異について、TP53 については exon 5-8 の変異について、direct sequencing analysis によって解析した (11)。

## Colony forming efficiency (CFE)

TYPK-1, TYPK-2 それぞれの細胞を 300cells, 500cells, 1000cells ずつ 60mm-dish に播種し 5ml の培養液を加え 7 日間培養した。その後 Diff-Quick で染色し、10cells 以上を含むコロニーの数を測定した。

## Cell migration assay and Matrix invasion assay

Cell culture insert 用 24well-plate と Cell culture insert を用いて cell migration assay と matrix invasion assay を行った。Cell migration assay では upper chamber に FCS を含まない DMEM/Ham' s F12 培地を 250 $\mu$ L と  $1 \times 10^6$  cells を播種、Lower chamber には DMEM/Ham' s F12+50% FCS 750 $\mu$ L を加えた。Matrix invasion assay では upper chamber に希釈した Matrigel (Corning, LA, USA) を 100 $\mu$ L 加えて 8 時間培養してゲル化させた。以下は cell migration assay と同様のプロトコールで行った。

## 抗癌剤感受性 (MTT assay)

使用した薬剤は GEM, 5-FU, CDDP, L-OHP で、methylthiazol tetrazolium (MTT) assay を用いて検証した。 $2 \times 10^3$  cells の TYPK-1 および TYPK-2 をそれぞれ 96 well-plate に 100 $\mu$ L の培地とともに播種し、24 時間培養した。その後培地を破棄し、新たに 100 $\mu$ L の培地を加え、それぞれの薬剤を 0, 0.01, 0.1, 1, 10, 100, 1000 $\mu$ M の濃度で各 well に投与した。72 時間薬剤に暴露した後に、Cell Proliferation Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) を用いて、添付されているプロトコールに従って MTT assay を行った。生存率は GENios multi-plate reader (TECAN, Kanagawa, Japan) を用いて計測した。それぞれの反応は triplicate で行った。また TYPK-1、TYPK-2 と比較するために膀胱癌細胞株 KMP-2 を用いた。

## 定量的 real-time PCR

それぞれの細胞株から TRIzol reagent (Life Technologies, Tokyo, Japan) を用いて RNA を抽出した。抽出した total RNA は Prime Script II First strand cDNA Synthesis Kit (Takara Bio, Shiga, Japan) により cDNA へ合成した。dCK, hENT1, DPD, ERCC1 の mRNA 発現量を定量的 real-time PCR により測定した。Internal control として GAPDH を用いた。それぞれの primer は table I に示した。PCR 反応には Syber Primix Ex Taq II (Takara Bio) を用いて、Mx3000P QPCR System (Agilent Technologies, Santa Clara, Ca, USA) で行った。データの解

析には、TYPK-1 の mRNA 発現を基準とした  $\Delta \Delta Ct$  値により解析した。

#### 統計学的解析

それぞれの実験データは Mann-Whitney U-test を用いて、p 値が 0.05 未満を有意差ありと判定した。統計処理には JMP 11.0 (SAS Institute Inc. , Cary, NC, USA) を使用した。



## 結果

### TYPK-1

患者から採取したリンパ節およびマウス皮下に移植し形成した腫瘍の HE 染色では腺癌の所見を認める (Figure 1A and 1B)。転移リンパ節から初代培養を行い、13 週目に初回の細胞継代を行った。その後、現在まで 127 回の継代を行った。

### TYPK-2

腹水細胞診では粘液産生を伴う腺癌の所見を認めた (Figure 1D)。採取した腹水の培養を開始してから 7 日目に初回の継代を行い、現在まで 58 継代を行った。

TYPK-1 と TYPK-2 はともにフラスコの底辺に単層シートのようにタイトに接着している。また細胞形態は初代培養から現在に至るまで変化を認めなかった。細胞増殖曲線から計算した TYPK-1 と TYPK-2 の doubling time はそれぞれ 22.1 時間と 40.4 時間であった (Table II and Figure 2)。

### 染色体検査

TYPK-1、TYPK-2 の染色体数はそれぞれ 65 (range=58-68), 84 (range=80-88) であった。そのなかで最も典型的であった染色体を示す (Table III and Figure 3)。

### 遺伝子変異解析

TP53 の変異については TYPK-1 と TYPK-2 とともに認めなかった。KRAS については TYPK-1 では変異を認めなかったが、TYPK-2 では codon 12 に GGT から CGT への変異が認められた (Table II)。

### CEF

TYPK-1 および TYPK-2 それぞれの CEF は 10.8%と 19.9%であった (Table II)。

### Cell migration assay and Matrix invasion assay

TYPK-1 および TYPK-2 についての migration assay と invasion assay の結果は Figure 4 に示す。Migration assay では両者に有意差を認めなかったが、invasion assay では TYPK-2 のほうが有意に浸潤した細胞数が多かった ( $p=0.04$ )。

### 抗癌剤感受性

MTT assay により得られた GEM, 5-FU, CDDP, L-OHP それぞれの生存率を Figure 5 に示す。このグラフをもとに IC50 を算出した。TYPK-1 の GEM に対する IC50 >1000 $\mu$ M と高い抵抗性を示した。TYPK-2 は L-OHP に対して IC50=12.9 $\mu$ M で TYPK-1 (IC50=1.9 $\mu$ M)と比較して高い抵抗性を示した。CDDP は TYPK-1、TYPK-2 とともに IC50>1000 $\mu$ M と高い抵抗性を示した (Table IV)。

### 薬剤感受性に関わる遺伝子発現

TYPK-2 と KMP-2 の dCK mRNA 発現は TYPK-1 と比較してそれぞれ 2.1 倍、2.3 倍であった。また hENT1 mRNA 発現はそれぞれ 14.3 倍、8.2 倍であった。さらに DPD ではそれぞれ 5.9 倍、11.2 倍、ERCC1 では 0.19 倍、0.01 倍であった (Table IV, Figure 6)。

膵癌は進行例で発見されることが多く、また化学療法に抵抗性であるためその予後は不良である。この研究でわれわれは膵癌治療に広く用いられる GEM, 5-FU, L-OHP に対する感受性について示した。

GEM は膵癌治療において最もよく用いられる抗癌剤である。GEM は hENT1 を介して細胞内に輸送され、dCK によってリン酸化を受ける (13)。GEM に対する IC50 と dCK, hENT1 の mRNA 発現に相関が認められた。

S-1 は体内において 5-FU に変換される経口剤である S-1 の GEM に対する非劣性を示す報告もなされている (7-8)。DPD は 5-FU を選択的に阻害する律速酵素であり、DPD の発現と 5-FU への抵抗性は相関するとされている (14)。KMP-2 が TYPK-1 や TYPK-2 と比較して DPD の発現量が高く、また 5-FU に対して抵抗性を示した。TYPK-2 が TYPK-1 と比較して 5.9 倍の DPD の発現を認めたが、5-FU に対する抵抗性は同程度であった。これについては thymidylate synthase などのそのほかの酵素が影響して可能性がある (15)。

白金製剤もまた膵癌治療において用いられる抗癌剤である (9)。ERCC1 は白金製剤によって重合し傷害を受けた DNA に対してヌクレオチド除去修復に働く。そのため、ERCC1 が高発現していると、白金製剤に対して抵抗性を示す (16)。KMP-2 は L-OHP に対して最も感受性が高く、また ERCC1 の発現が最も低かった。TYPK-2 は今回の研究で最も L-OHP に対して抵抗性を示したが、ERCC1 の発現は TYPK-1 の 0.19 倍であった。これまでの研究で ERCC1 には codon118 遺伝子多型があり、野生型 (AAC) と変異型 (AAT) が存在し、遺伝子型によって L-OHP に対する感受性に差があると報告されている (17-18)。今回の TYPK-1 と TYPK-2 についての L-OHP に対する感受性と ERCC1 発現についても遺伝子多型が影響している可能性が考えられた。

膵癌細胞株において TP53, KRAS, CDKN2A, SMAD4 などの遺伝子変異が多くみられる (19-21)。今回の研究では TP53 と KRAS の遺伝子変異について検索した。TYPK-1 については TP53 と KRAS とともに wild-type であることを明らかにした。これまでに報告されている 36 株の膵癌細胞株のうち、TP53 と KRAS とともに wild-type である細胞株は Paca3 と HS766T の 2 株のみであった (12, 19-21)。また TP53 は膵癌の化学療法抵抗性に関与しているとの報告もある (22-23)。代表的な GEM 抵抗性膵癌細胞株として、PANC-1, AsPc1 は GEM に対して高い抵抗性を示し、TP53 の wild-type であることから、TYPK-1 が TP53 変異に依存しない GEM 抵抗性の機序を明らかにするうえでも有用な細胞株といえる。

TYPK-2 は TYPK-1 と比較して浸潤能が高いことが示された。また文献的に報告が確認できた膵癌細胞株の colony-forming efficiency は 0.1~13% であった。TYPK-1 は 10.8% であったが、TYPK-2 は 19.9% とこれまでの報告より高いコロニー形成能を認めた。これらの特徴は多臓器へ転移を認めた元の腫瘍の性質を反映しているものと推測された。

## 結語

今回我々は新たな膵癌細胞株である TYPK-1, TYPK-2 を樹立した。両細胞株ともヌードマウスへの移植が可能であった。TYPK-1 は GEM に、TYPK-2 は L-OHP に対して抵抗性を示した。TYPK-1 は TP53 wild type の細胞株であり、これまでに GEM 耐性株として知られている PANC1 などは TP53 変異株であり、比較することで TP53 に依存しない薬剤耐性機構を解明できる可能性がある。TYPK-2 は高い増殖能力と浸潤能を認め、転移性膵癌の性質を反映していることと考えられた。局所進行膵癌から樹立した TYPK-1 と比較することにより、転移のメカニズムを解明する一助となる可能性がある。

## 謝辞

本研究を進めるにあたり、ご指導、ご鞭撻を賜りました富山大学医学薬学研究部消化器・腫瘍・総合外科学教室 塚田一博 教授に厚く御礼申し上げます。

動物実験を行うにあたりご協力いただきました、富山大学生命科学先端研究センター動物実験セ施設の山本博センター長をはじめ、動物実験施設のスタッフの方々に厚く御礼申し上げます。本研究に使用した膵癌細胞株 (KMP-2) を提供いただいた京都大学大学院薬学研究科ナノバイオ医薬創成科学講座 嶋田裕 准教授に厚く御礼申し上げます。また論文作成全般にわたりご指導いただきました奥村知之 講師をはじめとする富山大学医学薬学研究部消化器・腫瘍・総合外科の方々に深く感謝いたします。

## 参考文献

1. Bilici A: Prognostic factors related with survival in patients with pancreatic adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* 20(31): 10802-10812, 2014.
2. N Alexakis, C Halloran, M Paraty, P Ghaneh, R Sutton, and JP Neoptolemos: Current standards of surgery for pancreatic cancer. *British Journal of Surgery* 91: 1410-1427, 2004.
3. M Hidalgo: Pancreatic cancer. *N Engl J Med* 362: 1605-1017, 2010.
4. BE Kadera, DB Sunjaya, WH Isacoff, L Li, J Hines, JS Tomlinson, D Dawson, MM Rochefort, GW Donald, BM Clerkin, HA Reber, and TR Donahue. Locally advanced pancreatic cancer. Association between preoperative treatment and lymph-node negativity and overall survival. *JAMA Surg* 149(2): 145-153, 2014.
5. IT Konstantinidis, AL Warshaw, JN Allen, LS Blaszkowsky, CF Castillo, V Despande, TS Hong, EL Kwak, GY Lauwers, DP Ryan, JA Wargo, KD Lillemoe, and CR Ferrone. Pancreatic ductal adenocarcinoma. Is there a survival difference for R1 resections versus locally advanced unresectable tumors? What is a “true” R0 resecion? *Ann Surg* 257: 731-736, 2013.
6. H Ueno, Y Ioka, M Ikeda, S Ohkawa, H Yanagimoto, N Boku, A Fukutomi, K Sugimori, H Baba, K Yamao, Y Shimamura, M Sho, M Kitano, AL Cheng, K Mizumoto, JS Chen, J Furuse, A Funakoshi, T Hatori, T Yamaguchi, S Egawa, A Sato, Y Ohashi, T Okusaka, and M Tanaka: Randomized Phase III study of gemcitabine plus S-1, S-1 alone, or gemcitabine alone in patients with locally advanced and metastatic pancreatic cancer in Japan and Taiwan: GEST study. *J Clin Oncol* 31: 1640-1650, 2013.

7. T Okusaka, A Funakoshi, J Furuse, N Boku, K Yamao, S Ohkawa, and H Saito: A late phase II study of S-1 for metastatic pancreatic cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 61: 615-621, 2008.
8. T Conroy, F Desseigne, M Ychou, Olivier Bouché, Y Bécouarn, A Adenis, JL Raoul, S Gourgou-Bougade, M Sc, C de la Fouchardère, J Bennouna, JB Bachet, F Khemissa-Akouz, D Péré-Vergé, C Delbaldo, E Assenat, B Chauffert, P Michel, C Montoto-Grillot, M Chem, and M Ducreux. FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N Eng J Med* 364 (19): 1817-1825.
9. T Iwamura, T Katsuki, and K Ide. Establishment and characterization of a human pancreatic cancer cell line (SUIT-2) producing carcinoembryonic antigen and carbohydrate antigen 19-9. *Jpn. J. Cancer Res.* 78: 54-62, 1987.
10. S Sekine, Y Shimada, T Nagata, M Moriyama, T Omura, I Yoshioka, Y Hori, K Matsui, S Sawada, T Okumura, T Yoshida, and K Tsukada. Establishment and characterization of a new human gallbladder carcinoma cell line. *Anticancer Res* 32:3211-3218, 2012.
11. M Kato, Y Shimada, H Tanaka, R Hosotani, G Ohshio, K Ishizaki, M Imamura: Characterization of six cell lines established from human pancreatic adenocarcinomas. *Cancer* 85: 832-840, 1999.
12. R Mori, T Ishikawa, Y Ichikawa, K Taniguchi, R Matsuyama, M Ueda, Y Fujii, I Endo, S Togo, PV Danenberg, and H Shimada: Human equilibrative nucleoside transporter 1 is associated with the chemosensitivity of gemcitabine in human pancreatic adenocarcinoma and biliary tract carcinoma cells. *Oncol Rep* 17: 1201-1205, 2007.

13. H Kuramochi, K Hayashi, K Uchida, G Nakajima, T Hatori, KD Danenberg, PV Danenberg, M Yamamoto. High intratumoral dihydropyrimidine dehydrogenase mRNA levels in pancreatic cancer associated with a high rate of response to S-1. *Cancer Chemother Pharmacol* 63: 85-89, 2008
14. M. Fulushima, A Fujioka, J Uchida, F Nakagawa, T Takechi. Thymidylate synthase (TS) and ribonucleotide reductase (RNR) may be involved in acquired resistance to 5-fluorouracil (5-FU) in human cancer xenografts *in vivo*. *Eur J Cancer* 37: 1681-1687, 2001.
15. KA Olausson, A Daunant, P Fouret, E Brambilla, E Andre, V Haddad, E Taranchon, M Fillipits, R Pirker, HH Popper, R Stahel, L Sabatier, and JC Soria. DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy. *N Engl J Med* 335: 983-991, 2006.
16. P MH Chang, CH Tzeng, PM Chen, JK Lin, TC Lin, WS Chen, JK Jiang, HS Wang, and WS Wang. ERCC1 codon 118 C →T polymorphism associated with ERCC1 expression and outcome of FOFX-4 treatment in Asian patients with metastatic colorectal carcinoma. *Cancer Sci* 100: 278-283, 2009.
17. H Kamikozuru, H Kuramochi, K Hayashi, G Nakajima, and M Yamamoto. ERCC1 codon 118 polymorphism is a useful prognostic marker in patients with pancreatic cancer treated with platinum-based chemotherapy. *Int J Oncol* 32: 1091-1096, 2008.
18. PS Moore, B Sipos, S Orlandini, C Soriom, FX Real, NR Lemoine, T Gress, C Bassi, G Klöppel, H Kalthoff, H Ungefroren, M Löhr, and A Scarpa: Genetic profile of 22 pancreatic carcinoma cell lines Analysis of K-ras, p53, p16 and DPC4/Smad4. *Virchows Arch* 439: 798-802, 2001.

19. B Sipos, S Möser, H Kalthoff, V Török, M Löhr, and G Köppel. A comprehensive characterization of pancreatic ductal carcinoma cell lines: towards the establishment of an in vitro research platform. *Virchows. Arch* 442: 444-452, 2003.
20. EL Deer, GH Jessica, JD Coursen, JE Shea, J Ngatia, CL Scaife, MA Firpo, and SJ Mulvihill. Phenotype and genotype of pancreatic cell lines. *Pancreas* 39 (4): 425-435, 2010.
21. C Fiorini, M Cordani, C Padroni, G Blandino, SD Agostino, and M Donadelli. Mutant p53 stimulates chemoresistance of pancreatic adenocarcinoma cells to gemcitabine. *Biochim. Biophys. Acta* 1853: 89-100, 2015.
22. CM Galmarni, MK Clarke, N Falette, A Putsteux, JR Mackey, C Dumontet. Expression of a non-functional p53 affects the sensitivity of cancer cells to gemcitabine. *Int. J. Cancer* 97: 439-445, 2002.
23. FH Sarkar, Y Li, Z Wang, and D Kong. Pancreatic cancer stem cells and EMT in drug resistance and metastasis. *Minerva Chir.* 64(5): 489-500, 2009.
24. M Lieber, J Mazzetta, W Nelson-Rees, M Kaplan, and G Todaro. Establishment of a continuous tumor-cell line (PANC-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas. *Int. J. Cancer* 15: 741-747, 1975.



Table I. *Sequences of PCR primers.*

Primer	Forward	Reverse
dCK	TCTCTGAATGGCAAGCTCAA	CTATGCAGGAGCCAGCTTTC
hENT1	CTCATTAATTCATTTGGTGCCA	CCTCTCCTTTGCTAATGAGGT
DPD	CCACTTGTAGCCAAAGGCAGTA	TCCGAACAAACTGCATAGCA
ERCC1	GCCTCCGCTACCACAACCT	TCTTCTCTTGATGCGGCGA
GAPDH	AGCCTCAAGATCATCAGCAATGCC	TGTGGTCATGAGTCCTTCCACGAT

Table II. *Characteristics of the TYPK-1 and TYPK-2 cell lines.*

	<b>TYPK-1</b>	<b>TYPK-2</b>
Adhesiveness	Yes	Yes
Xenotransplantation	Yes	Yes
Doubling time (h)	22.1	40.4
CFE (%)	10.8	19.9
p53	wild type	wild type
K-ras	wild type	Codon12; GGT(Gly)→CGT(Arg)

Table III.  $IC_{50}$  values of anticancer drugs and relative levels of mRNA expression.

Cell line	IC <sub>50</sub> value ( $\mu$ M)	mRNA		IC <sub>50</sub> value ( $\mu$ M)	mRNA	IC <sub>50</sub> value ( $\mu$ M)	mRNA
	GEM	dCK	hENT1	5-FU	DPD	L-OHP	ERCC1
TYPK-1	>1000	1	1	196.3	1	1.9	1
TYPK-2	0.92	2.11	14.36	116.5	5.91	12.9	0.19
KMP-2	0.03	2.25	8.19	>1000	11.18	0.93	0.01

Figure 1 *Histopathological futures of TYPK-1 and TYPK-2 cell lines.*

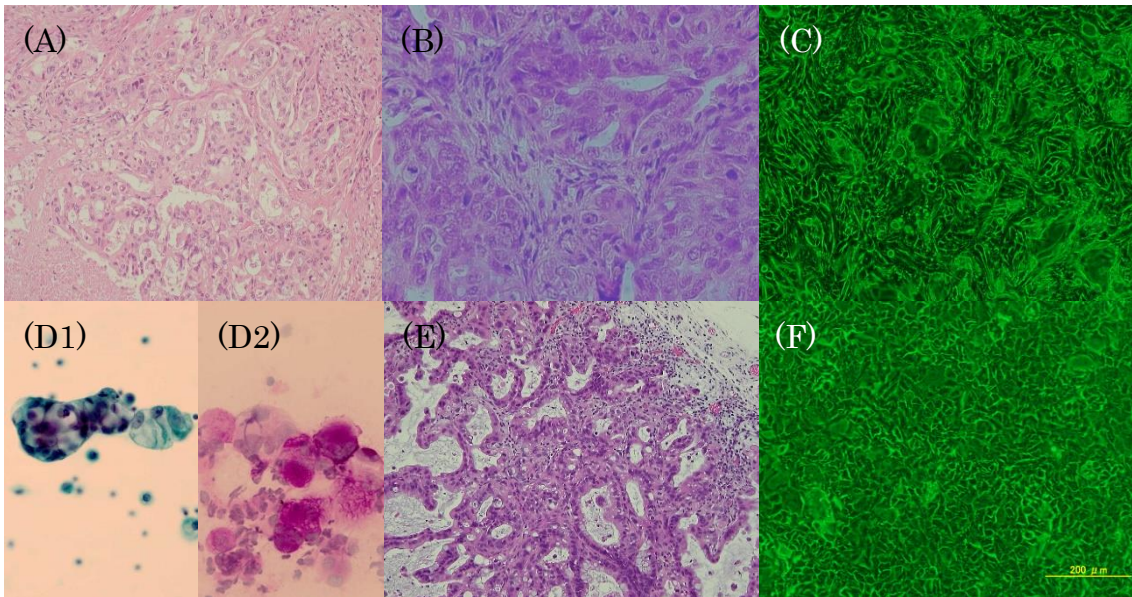


Figure 2 Cell growth curve of TYPK-1 and TYPK-2 cell lines..

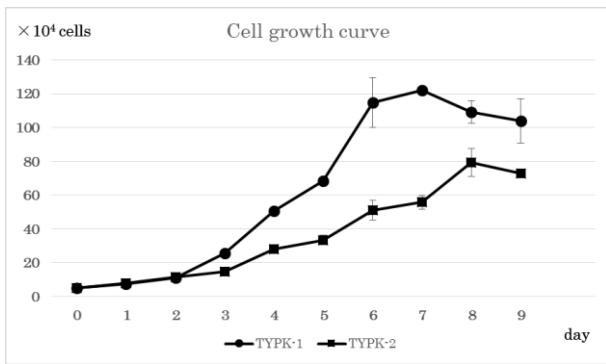


Figure 3 Typical karyotype of *TYPK-1* and *TYKK-2* cell lines.

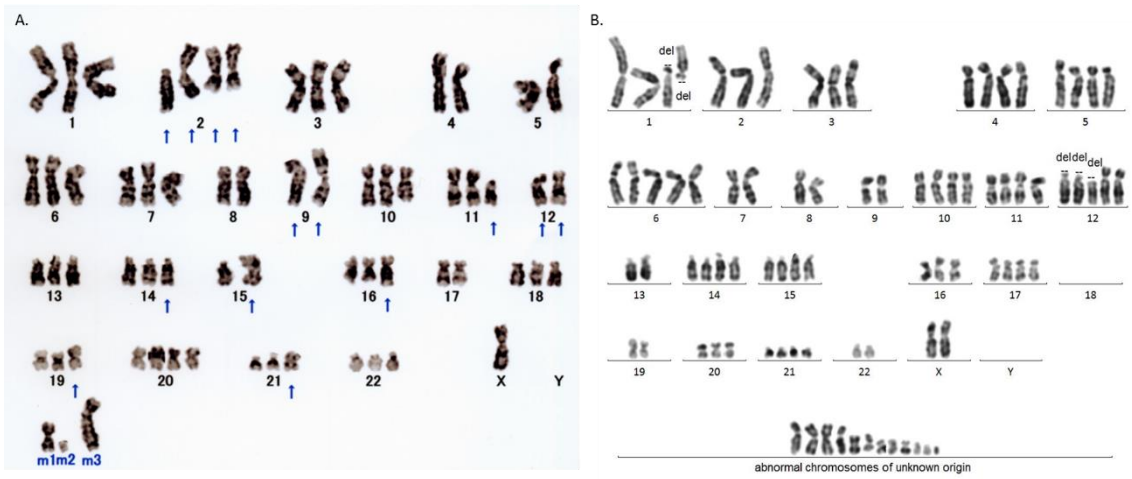


Figure 4 *Migration and Invasion assay.*

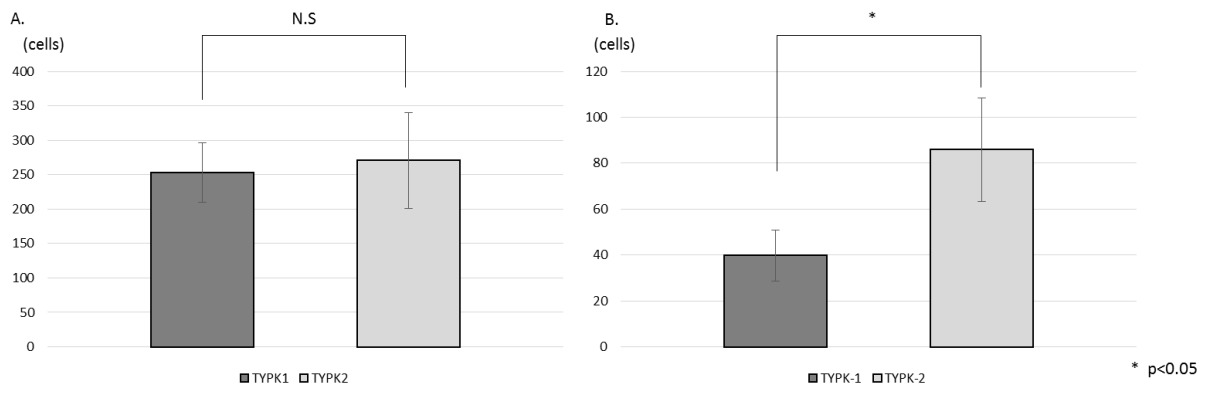


Figure 5 Sensitivity to anticancer drugs.

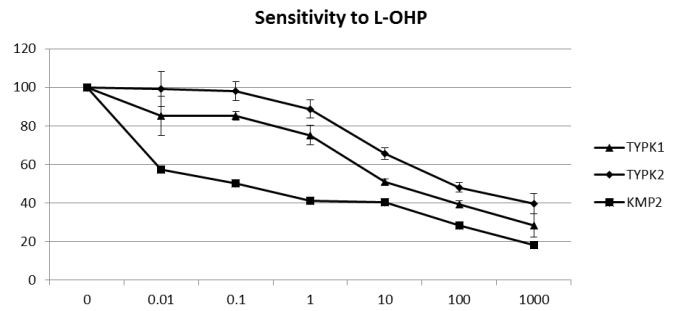
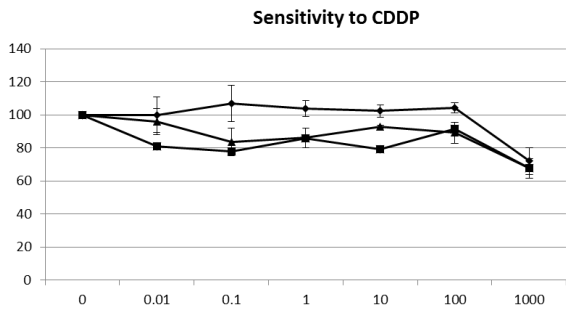
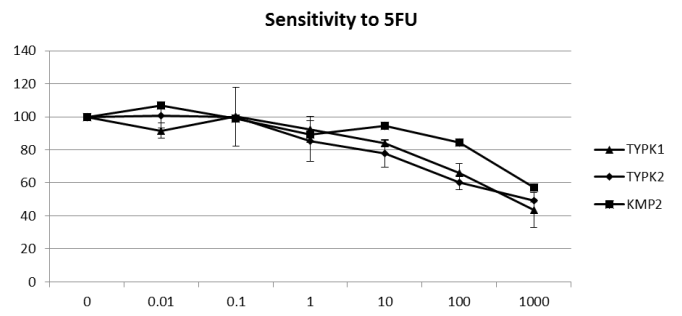
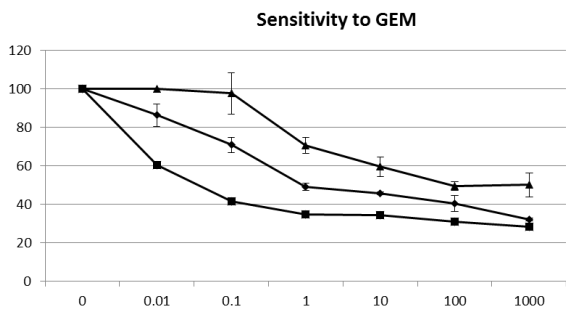
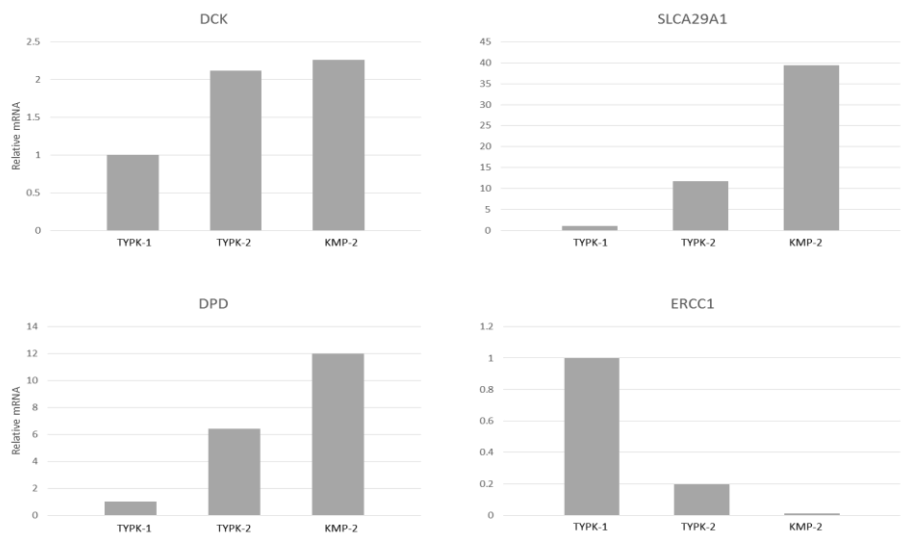




Figure 6 *Relative expression of mRNA.*



## Legends

Figure 1. Histopathological features of the TYPK-1 and TYPK-2 cell lines. A: Hematoxylin and eosin staining of the original metastatic lymph node, showing a papillar tubular adenocarcinoma ( $\times 40$ ). B: The tumor formed by the xenograft resembled the original tubular adenocarcinoma ( $\times 40$ ). C: TYPK-1 cells grew as an adherent monolayer ( $\times 20$ ). D: i: Papanicolaou stain of the ascites. The tumor cells formed papillary clusters ( $\times 40$ ); ii: the cytoplasm of the tumor cells was stained by Periodic acid-Schiff (PAS) and the tumor cells produced mucus ( $\times 40$ ). E: The tumor formed by the xenograft resembled a tubular adenocarcinoma ( $\times 40$ ). F: TYPK-2 cells grew as an adherent monolayer ( $\times 20$ ).

Figure 2. Growth curves of TYPK-1 and TYPK-2 cells.

Figure 3. Chromosomal analysis of TYPK-1 and TYPK-2 cells.

Figure 4. Representative karyotypes. A: TYPK-1 cells; B: TYPK-2 cells.

Figure 5. Sensitivity to anticancer drugs. Sensitivities to anticancer drugs of TYPK-1 and TYPK-2 cells were determined using an MTT assay. Sensitivity to gemcitabine (A), 5-fluorouracil (5FU; B), cisplatin (CDDP; C) and oxaliplatin (D).

Figure 6. Relative levels of mRNAs. The expression of mRNAs encoding of the enzymes that catalyze the rate-limiting steps in the pathways that metabolize anticancer drugs were measured using real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). A: deoxycytidine kinase (dCK). B: human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1), C: dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD), D: excision repair cross-complementation group 1 (ERCC1).