



Title	口腔癌細胞のシスプラチン耐性化に伴うNa, K-ATPase及びouabain感受性の変化
Author(s)	平川, 直; 出山, 義昭; 吉村, 善隆; 鈴木, 邦明; 鄭, 漢忠
Citation	北海道歯学雑誌, 38(1), 40-47
Issue Date	2017-09
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/67305
Type	article
File Information	38_01_04_Hirakawa.pdf



[Instructions for use](#)

原 著

口腔癌細胞のシスプラチン耐性化に伴うNa, K-ATPase及びouabain感受性の変化

平川 直¹⁾ 出山 義昭²⁾ 吉村 善隆²⁾ 鈴木 邦明²⁾ 鄭 漢忠¹⁾

抄 録 : cis-diamminedichloro-platinum (II) (シスプラチン, CDDP) による癌の化学療法においては癌細胞の耐性化が障害となるが, その機序には不明な点も多い。そこで, 口腔癌細胞株 (Sa3, H1, KB) 及びそれらのCDDP耐性株 (Sa3R, H1R, KBR) と正常歯肉から採取した細胞を用いて, 口腔癌細胞のCDDP耐性化に伴うNa, K-ATPaseの変化を中心として検討した。

CDDPによる50%細胞生存濃度 (IC₅₀) は, H1とH1Rではそれぞれ 1.5×10^{-4} 及び 7.5×10^{-4} M, Sa3とSa3Rでは 4.5×10^{-3} 及び 5.5×10^{-3} M, KBとKBRでは 1.0×10^{-4} 及び 7.0×10^{-4} Mであり, 正常歯肉細胞は 5.0×10^{-5} Mであった。癌細胞は正常歯肉細胞に比べてCDDP感受性が低く, 耐性株はそれぞれの感受性株より低い感受性を示した。Na, K-ATPase活性は, Sa3よりSa3Rが高く, H1よりH1Rがわずかに高値を示したが, KBとKBRで差はなかった。Ouabain存在下での各細胞のIC₅₀は, H1とH1Rでは5及び20 nM, Sa3とSa3Rでは80及び180 nM, KBとKBRでは40及び130 nMであり, 正常歯肉細胞は5 nMであった。この結果から, CDDP耐性化はouabainに対する耐性化も伴うことが示唆された。各親株と耐性株間のNa, K-ATPase活性阻害に対するouabain濃度依存性は細胞によって異なり, ouabainに対する耐性化はNa, K-ATPaseの変化によるものではないと示唆された。各細胞のP-糖タンパク質とATP7Aの発現を親株と耐性株間で比較したところ, 発現量は細胞によって異なった。以上の結果から, CDDP耐性化のメカニズムは細胞の種類によって異なることと, CDDP耐性化はouabain耐性化を伴うことが示唆された。

キーワード : シスプラチン, Na, K-ATPase, P-糖タンパク質, ATP7A

緒 言

現在, 口腔癌の治療は手術による外科的切除が中心である。しかし, 切除による広範囲の侵襲は摂食, 咀嚼, 嚥下, 呼吸および構音などの口腔機能や審美性に影響を及ぼし, 患者のQOLの低下を招く。そこで, 口腔領域の癌治療においてこれらを考慮し抗癌剤による化学療法や放射線療法などの非観血的治療が行われている。

CDDPは化学療法において中心的な薬剤であり, 口腔癌においても多くの症例で使用されている。CDDPは細胞におけるDNA損傷, 複製の障害, 転写阻害および細胞周期の停止をもたらすアポトーシスを引き起こす¹⁾ ことで, 抗がん作用を誘導する。一方, 一部の症例において癌細胞がCDDPに対して抵抗性を示し, 化学療法が奏功せず, 抗癌剤治療の障害となっている。CDDPに対する薬剤耐性機構としては細胞内蓄積機構^{2,4)}, 細胞質内解毒

機構^{5,8)}, DNA修復機構⁹⁾ など多因子性であることが報告されている。能動的にCDDPを運び出すポンプの発現上昇としてP-glycoprotein¹⁰⁾ やATP7A, ATP7B^{11, 12)} に関して広く研究が行われている。しかし, Na, K-ATPaseはCDDPの取り込み^{13, 14)} に関与していると報告されているが, 不明な点が多い。そこで, CDDP耐性についてNa, K-ATPase¹⁵⁾ を中心に検討することとした。Na, K-ATPaseは細胞の形質膜に局在し, ATP1分子の加水分解と共役して3個のNa⁺を細胞外に, 2個のK⁺を細胞内に能動輸送し, 細胞内外のイオン勾配の形成, 維持に重要な役割を演じている。このNa, K-ATPaseを介してCDDPの細胞内流入が行われている可能性が高いため, 口腔癌細胞であるSa3細胞, H1細胞, KB細胞とそれらにCDDPを持続的に作用させ, 耐性を形成させた細胞株であるSa3R細胞, H1R細胞, KBR細胞¹⁶⁻¹⁸⁾ を用いて, 比較検討した。

¹⁾ 〒060-8586 札幌市北区北13条西7丁目
北海道大学大学院歯学研究院 口腔病態学分野 口腔顎顔面外科学教室 (主任: 鄭 漢忠 教授)

²⁾ 〒060-8586 札幌市北区北13条西7丁目
北海道大学大学院歯学研究院 口腔病態学分野 細胞分子薬理学教室 (主任: 鈴木邦明 教授)

材料と方法

1. 試薬

ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) は和光純薬 (大阪) から, adenosine 5'-triphosphate bis (tris) salt dihydrate (ATP), ouabain, cis-diamminedichloro-platinum (II) はSIGMA (St. Louis, MO) から購入した。

2. 細胞の培養ならびに細胞回収

口腔癌細胞であるSa3, H1, KB細胞とそれぞれにCDDPを作用させることにより樹立されたCDDP耐性細胞であるSa3R, H1R, KBR細胞を用いた。なお, これらの細胞は丹沢 秀樹教授 (千葉大学) から分与された。細胞は10%牛胎仔血清 (FBS) 含有, フェノールレッド不含 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) (和光純薬) を用いて5 % CO₂-95%空気, 37 °C気相下にて, サブコンフルエンスまで培養し, 薬物を所定時間作用させ, 細胞を250 mM sucroseにて回収した。

3. ATPase活性の測定

Na, K-ATPase活性は, 50 μ lの各細胞破砕物と最終濃度25 mM sucrose, pH 7.4の50 mM tris-acetate buffer, 各種濃度の金属イオン (160 mM NaCl, 16 mM KCl, 5 mM MgCl₂) とEDTAを30 μ l含む200 μ lの反応液に, 基質として最終濃度5 mMとなる50 μ lのATPを加えて反応を行った。反応はATPの添加により開始し, 37 °Cで30 分間反応させた後に300 μ lの12 % SDSを添加して停止した。Na, K-ATPase活性は, 酵素によりATP加水分解の結果生成された無機リン量をChifflet¹⁹⁾らの方法に従って定量することにより計測した。酵素反応の結果生じた無機リンを1N HCl, 1 %モリブデン酸アンモニウム, L-アスコルビン酸を含む反応液600 μ lにて発色させた。その後2 % (w/v) クエン酸, 2 % (w/v) 亜ヒ酸, 2 % (v/v) 酢酸を含む反応液900 μ lにて発色を増強させた後, HITACHI U-2000 分光光度計を使用し, 吸光度850 nmで測定することにより定量した。また, Na, K-ATPaseの特異的阻害剤であるouabainの存在下で得られる値をbackgroundとして差し引いた。

4. ウェスタンブロッティング

10 μ gのサンプルを10 % SDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した後に, PVDF膜 (Immobilon-P; MILLIPORE, Bedford, MA) に転写した。ブロッキング反応は, Immuno Block[®] (DS Pharma Biomedical Co, Ltd, 大阪) を用いて室温で1時間行った。一次抗体として抗Na, K-ATPase α 1抗体 (Upstate Biotechnology, Lake Placid, CA) (1 : 1000), 抗Na, K-ATPase β 1抗体 (Aviva System Biology, San Diego, CA) (1 : 4000), 抗Mdr-1抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Inc,

CA) (1 : 1000), 抗ATP7A/7B抗体 (Orbigen Inc, San Diego, CA) (1 : 1000), 抗 β -actin抗体 (Santa Cruz Biotechnology) (1 : 1000) を使用し, 4 °C, オーバーナイトで反応させた。二次抗体は抗マウスIgG1抗体 (Life Technologies Corporation, CA) (1 : 1000), 抗マウスIgG2a抗体 (Life Technologies Corporation) (1 : 1000) あるいは, 抗ウサギIgG抗体 (Life Technologies Corporation) (1 : 1000) を使用し, それぞれ室温で1時間反応させた。TBS-T (50 mM tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1 % tween) を用いて室温で15分間, 3回洗浄後, Western Lightning CDP-Star (PerkinElmer, Inc. Winter Street Waltham, MA) を用いて検出した。

5. 細胞内ATP量の測定

細胞を80 %コンフルエンスまで培養し, 血球測定板で細胞数を測定した後に細胞数を調整して96穴プレート (FALCON[®], MICROTTESTM 96, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ) に播種した。培養2日目に培養液を除去して, CDDPとouabainをDMEMに溶解し作用させた。最終濃度は0~10⁻² mM CDDP, 0~120 nM ouabainを含有したDMEMと交換した。添加後24, 48, 72時間後に細胞内ATP量を測定した。測定はViaLight[®] Plus Cell Proliferation and Cytotoxicity Bio Assay Kit (Cambrex Bio Science Rockland, Inc., Rockland, ME) を用い, Wallac 1420 ARVOsx マルチラベルカウンタ (PerkinElmer, Inc., MA) にて行った。

6. データ処理

結果は測定した平均値とSDを求めてグラフに示し, 有意差の検定にはStudentのt検定を用いた。

結 果

1. CDDP感受性とouabain感受性

種々濃度のCDDPあるいはouabain存在下に正常歯肉細胞と親株, 耐性株を培養した後, Wallac 1420 ARVOsx マルチラベルカウンタを用いてATP含量を測定することにより, 細胞生存率のCDDPあるいはouabain濃度依存性を確認した。

Sa3のCDDPに対する50%細胞生存濃度 (IC₅₀) は4.5 × 10⁻³ M, Sa3Rは5.5 × 10⁻³ Mであった (図1 A)。H1のIC₅₀は1.5 × 10⁻⁴ M, H1Rは7.5 × 10⁻⁴ Mであり (図1 B), KBのIC₅₀は1.0 × 10⁻⁴ M, KBRは7.0 × 10⁻⁴ Mであった (図1 C)。また, 正常歯肉細胞のIC₅₀は5.0 × 10⁻⁵ Mであった (図1 D)。これらの結果をまとめたのが, 表1である。

またouabain存在下で培養した際におけるIC₅₀はSa3とSa3Rがそれぞれ80 nMと180 nM (図2 A), H1とH1Rがそれぞれ5 nMと20 nM (図2 B), KBとKBRでそれぞれ40 nMと130 nM (図2 C), 正常歯肉細胞は5 nMであった (図

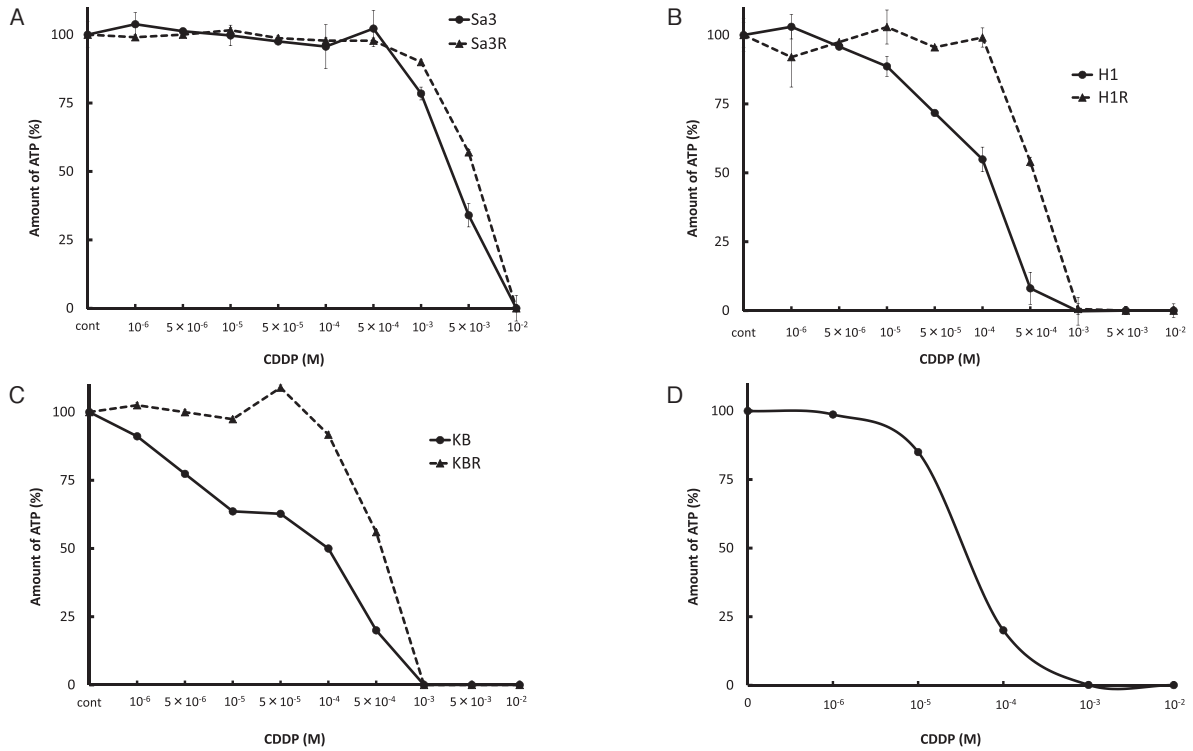


図1 癌細胞ならびに正常歯肉細胞のCDDP感受性

Sa3 (●), Sa3R (▲) (A), H1 (●), H1R (▲) (B), KB (●), KBR (▲) (C), 正常歯肉細胞 (D) に 10^{-6} M ~ 10^{-2} MのCDDPを作用させ24時間後の生存細胞数を確認した. 耐性株は親株よりCDDP感受性が低く, 癌細胞は正常歯肉細胞よりCDDP感受性の低下が認められた.

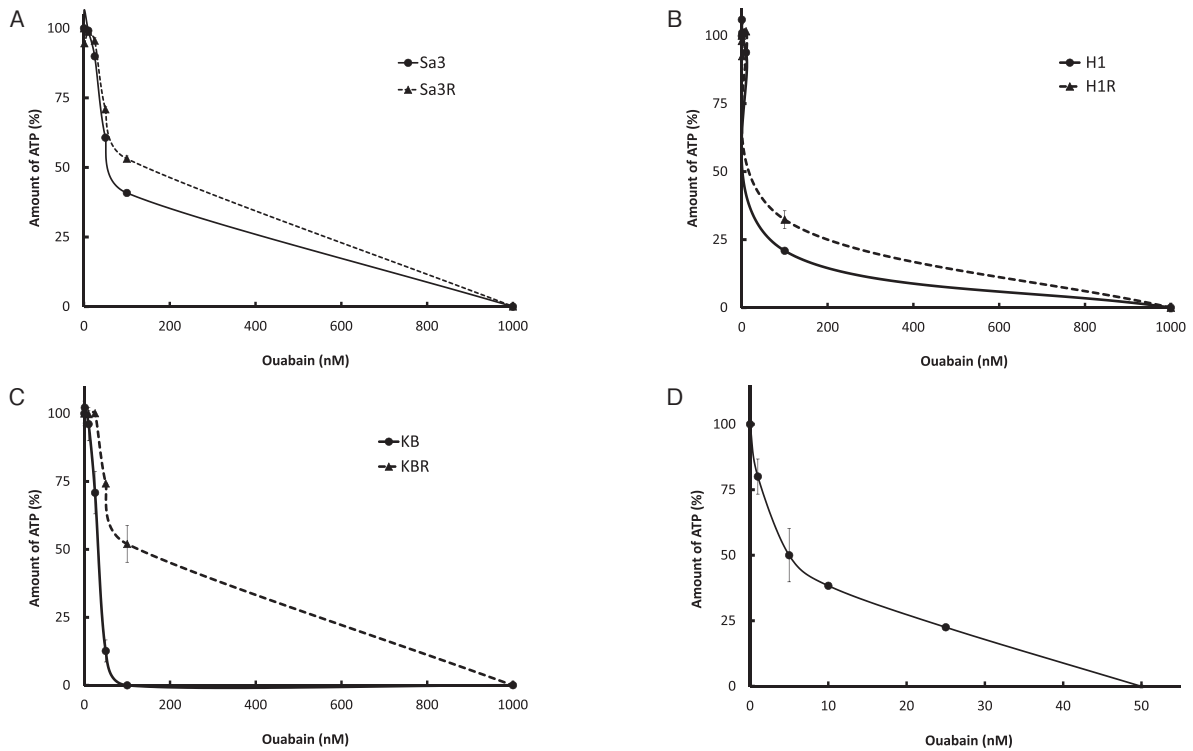


図2 癌細胞ならびに正常歯肉細胞のouabain感受性

Sa3 (●), Sa3R (▲) (A), H1 (●), H1R (▲) (B), KB (●), KBR (▲) (C), 正常歯肉細胞 (D) に1 nM ~ 10^3 nMのouabainを作用させ24時間後の生存細胞数を確認した. 耐性株は親株よりouabain感受性が低く, 癌細胞は正常歯肉細胞よりouabain感受性の低下が認められた.

表1 癌細胞ならびに正常歯肉細胞のCDDP感受性

	親株	耐性株
KB	1.0×10^{-4} M	7.0×10^{-4} M
H1	1.5×10^{-4} M	7.5×10^{-4} M
Sa3	4.5×10^{-3} M	5.5×10^{-3} M
正常歯肉	5.0×10^{-5} M	

表2 癌細胞ならびに正常歯肉細胞のouabain感受性

	親株	耐性株
KB	4.0×10^{-5} M	1.3×10^{-4} M
H1	5.0×10^{-6} M	2.0×10^{-5} M
Sa3	8.0×10^{-5} M	1.8×10^{-4} M
正常歯肉	5.0×10^{-6} M	

2D). これらの結果をまとめたのが、表2である。

2. Na, K-ATPase活性

CDDPに対する耐性化にNa, K-ATPaseが関与しているか明らかにすることを目的にSa3, Sa3R, H1, H1R, KB, KBRのNa, K-ATPase活性を測定した(図3A)。Sa3とSa3Rはそれぞれ 21.4 ± 0.6 と 36.6 ± 1.2 n mol Pi/mg/minでSa3Rが高値を示した。H1とH1Rではそれぞれ 25.5 ± 1.1 と 29.6 ± 0.7 n mol Pi/mg/minでH1Rが高かった。またKBとKBRではそれぞれ 12.5 ± 0.8 と 12.5 ± 0.4 n mol Pi/mg/minとなりNa, K-ATPase活性は同程度であった。また、活性の相違がNa, K-ATPaseタンパク質の発現量の相違に基づくのかを明らかにするため、ウェスタンブロットにてNa,

K-ATPase $\alpha 1$ サブユニットの発現を確認したところ、発現量はSa3に比べSa3Rで高く、KBとKBRでは差がみられず、Chifflet法の結果に一致した(図3A)。細胞を回収した時間によりNa, K-ATPase活性が異なる可能性があるた

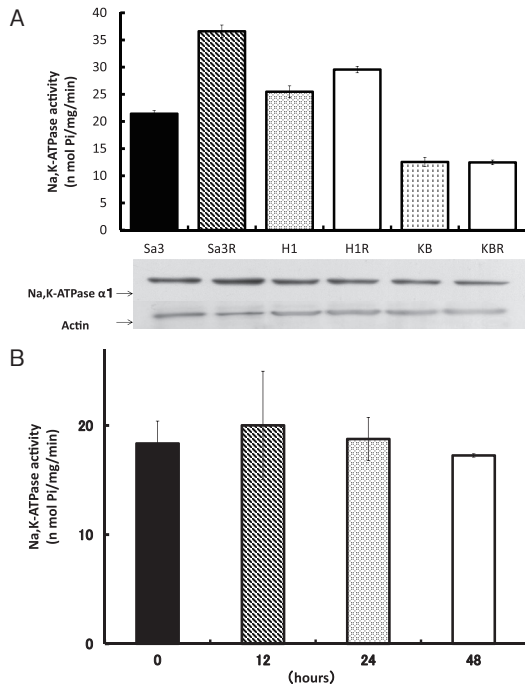


図3 癌細胞のNa, K-ATPase

Sa3, Sa3R, H1, H1R, KB, KBR細胞のNa, K-ATPase活性 (A上段)を測定し、ウェスタンブロットにてNa, K-ATPase $\alpha 1$ subunit発現量を確認した(A下段)。Sa3とH1においては耐性株が親株よりNa, K-ATPase活性が高く、KBの親株と耐性株のNa, K-ATPase活性は同程度であった。

Sa3の培養時間によるNa, K-ATPase活性の経時的変化(B)を確認した。培養時間によるNa, K-ATPase活性の変化はみられなかった。

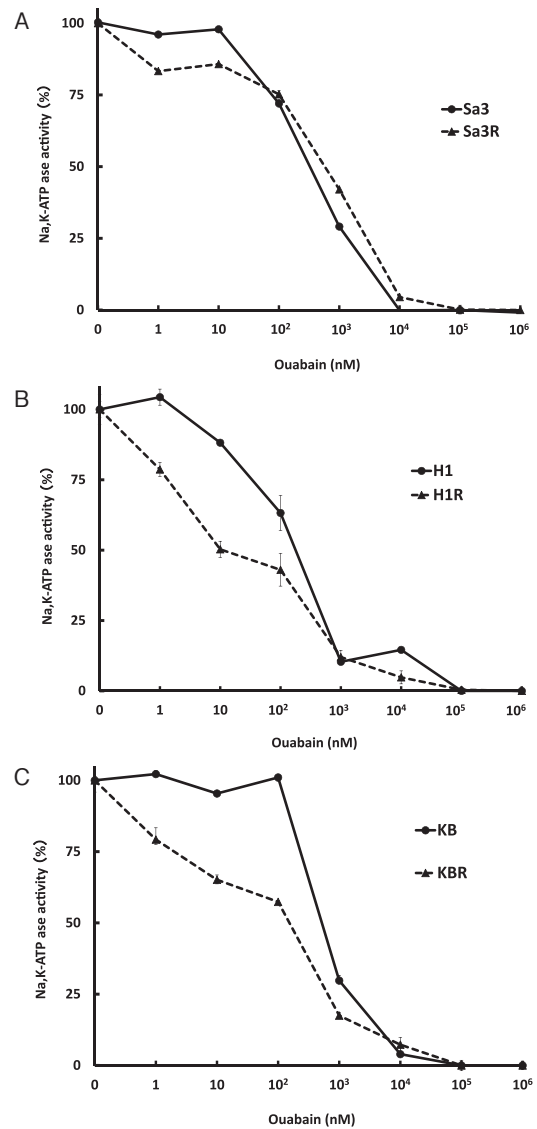


図4 Na, K-ATPase活性のouabain濃度依存性

Sa3 (●), Sa3R (▲) (A), H1 (●), H1R (▲) (B), KB (●), KBR (▲) (C)のNa, K-ATPaseにおけるouabain濃度依存性を測定した。Sa3の親株と耐性株でouabain濃度依存性に差はみられず、H1およびKBでは耐性株のNa, K-ATPase活性は親株よりouabain感受性が高かった。

め、Sa3を0, 12, 24, 48時間培養し、回収した後にNa, K-ATPase活性を測定したところ、差はみられなかった(図3B)。

3. Na, K-ATPase活性のouabain濃度依存性

CDDP耐性化した細胞ではouabainにも耐性化することが示されたので、その理由が各細胞のNa, K-ATPaseのouabain感受性が変化したことによるのかを明らかにするために、Na, K-ATPase活性のouabain濃度依存性を調べた。Sa3とSa3RではouabainによるNa, K-ATPase活性の50%阻害濃度(K_{i50})はそれぞれ800 nM程度(図4A)、H1RとH1の K_{i50} 値はそれぞれ10 nMと120 nM(図4B)、KBRとKBの K_{i50} 値はそれぞれ110 nMと900 nM(図4C)であった。

4. P-糖タンパク質及びATP7Aの発現量

CDDPに対する耐性化の機序をさらに調べるため、各細胞のP-糖タンパク質(P-gp, 図5A)及びATP7Aの発現量(図5B)をそれぞれウェスタンブロットにて確認した。Sa3RはSa3よりP-gp及びATP7Aの発現量が高かった。またH1RはH1よりATP7Aのみ発現量が高く、KBRはKBよりP-gpのみ発現量が高かった。

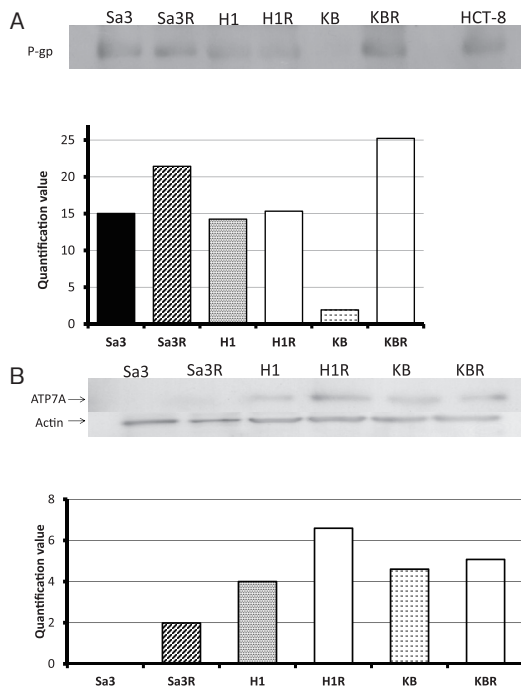


図5 P-gpならびにATP7Aの発現

Western BlotにてP-gp (A) ならびにATP7A (B) の発現を確認し、定量化した。なお、P-gpのポジティブコントロールとしてヒト結腸癌細胞株であるHCT-8を用いた。Sa3とKBでは親株より耐性株でP-gpの発現量が高かった。またSa3とH1では親株より耐性株のATP7A発現量が高かった。

考 察

シスプラチンを主剤とする化学療法は、高い奏効率から頭頸部癌の治療の重要な手段となっているが、その薬剤耐性が大きな治療上の問題となっている。これを克服するためには、耐性機序の解明が不可欠であり、現在までに細胞質内解毒機構、細胞内蓄積機構、DNA修復機構など多因子性^{2,9)}であることがわかっている。細胞質内解毒機構としてはグルタチオン解毒機構があげられる。グルタチオンはグルタミン酸、システイン、グリシンからなるトリペプチドで生体内に広く分布し、外来性の毒物に結合して親水化し、細胞外への排出を容易にする作用をもつ。細胞内蓄積機構による耐性発現としてはP-gp, ATP7A, ATP7B¹⁰⁻¹²⁾が深く関与していると報告されている。P-gpは、小腸、血液脳関門などに分布し、細胞の中からカチオン性の薬剤を排出するトランスポーターとして機能し、CDDPを細胞外に排出し、癌細胞を耐性にする薬剤耐性因子として作用している。またATP7A, ATP7Bはともにゴルジに存在するP型のATPaseで、銅を細胞質からゴルジに取り込む機能をもつ。ATP7A, ATP7Bの存在により細胞内に流入したCDDPがゴルジ体に取り込まれ、CDDPが核内に流入されず耐性を示す。また、耐性にNa, K-ATPaseの汲み入れ機構^{13, 14)}が深く関与しているとの報告はあるが知見に乏しい。そこで今回の検討では、口腔癌細胞のCDDP耐性化に関してNa, K-ATPaseを中心に詳細な検討を行うこととした。

まず、各親株及び誘導された耐性株のCDDP感受性を調べたところ(図1のAからD, 表1)、各耐性化細胞は親株と比較して期待されたCDDP感受性の低下を示した。また、正常細胞と比較して癌細胞となるだけで、CDDPに対して抵抗性を示すことが示唆された。

CDDP耐性化におけるNa, K-ATPaseの関与を調べるため、各親株及び誘導された耐性株のNa, K-ATPase活性を測定した(図3)ところ、Sa3RはSa3より活性が高く、H1RもH1よりわずかに高かった。また、KBとKBRは同程度の活性であった。Na, K-ATPaseが細胞内へのCDDP取りこみに関与するのであれば、活性が高いと細胞内へのCDDP取りこみ量が増加してCDDP感受性が増大することとなり、図1のAからCで得られた結果を説明することができない。

そこで、CDDP存在下でCDDP耐性を形成した際にNa, K-ATPaseに変化があった可能性を考えて、Na, K-ATPaseの特異的な阻害剤であるouabainに対する各細胞の感受性を調べた(図2のAからD)。その結果、3種の細胞すべてで、CDDP耐性化に伴ってouabainに対しても耐性化していることが示唆された。また、H1を除いて、正常歯肉由来細胞と比較して癌細胞はouabain抵抗性であることも明らかになった。そこで、各細胞のNa, K-

ATPase活性のouabain感受性を比較した。もし、親株より耐性株のNa, K-ATPase活性がouabain低感受性であれば細胞の低感受性を説明しようと考えたが、むしろ結果はそれを否定するものであった。

そこで、Na, K-ATPase以外のタンパク質がCDDP耐性形成に関与している可能性を考えて、薬剤排出ポンプであるP-gpおよびATP7A発現をウエスタンブロットで検出した(図5のAB)。その結果を、Na, K-ATPase活性と比較して表3に示した。この結果から、Sa3RはSa3と比較してNa, K-ATPase活性が高いことから細胞内へのCDDP取り込み量は増加するが、排出ポンプのP-gpおよびATP7Aの発現が多いことから耐性化するとして説明可能と考えた。同様に、H1RはH1と比較してNa, K-ATPase活性は高いがATP7Aの発現が多いことによって、KBRはKBと比較してP-gpの発現が増加し耐性化しているとして説明可能と考えた。本研究において、ouabainに対する耐性化は、各細胞の持つNa, K-ATPase活性のouabainに対する感受性が低下したことが原因ではないことが明らかになったので、CDDP耐性化と同様にATP7AとP-gpが関与して耐性化した可能性がある。

表3 癌細胞のNa, K-ATPase, P-gpならびにATP7Aの発現量

	Na,K-ATPase	P-gp	ATP7A
Sa3	Sa3<Sa3R	Sa3<Sa3R	Sa3<Sa3R
H1	H1≦H1R	H1=H1R	H1<H1R
KB	KB=KBR	KB<KBR	KB=KBR

耐性は2種類に大別することができ^{20, 21)}、抗癌剤が元々効きにくい自然耐性と治療により抗癌剤に抵抗性を獲得してしまう獲得耐性がある。自然耐性が存在する場合、化学療法の効果は期待できないことが多い。また獲得耐性の場合、初回化学療法は奏効するが、治療継続中にもかかわらず進行や再発が認められる。このような症例では投与した抗癌剤以外のほかの抗癌剤に対しても交叉耐性を示すことが多い。今回用いたSa3, H1, KBの中で、Sa3はKBの約45倍の耐性を呈して最も自然耐性が高く、次いでH1がKBより高い抵抗性を示した。正常歯肉細胞のIC₅₀は最も耐性の低いKBの1/2程度であった(表1)。また、獲得耐性においてはSa3では耐性株が親株の約1.3倍、H1では約5倍、KBでは約7倍耐性が高かった。この抵抗性の差異には、様々なメカニズムが関与していると考えられる。Na, K-ATPase阻害剤であるsanguinarineがcaspase 3/7の活性化、PARPの断片化、および核DNAの断片化を惹起し、著明なapoptosis誘導効果を示す²²⁾という報告がある。今回得られたCDDPに耐性を示す細胞はouabainに対しても耐性を示すことから、apoptosisを起こしにくい性質を獲得している可能性がある。

今回の検討ではP-gp, ATP7A, Na, K-ATPaseなどの

薬剤蓄積機構にのみ焦点を絞って検討しており、細胞質内解毒機構、DNA修復機構などに関して検討していないため、CDDP耐性機構の全てを説明できるわけではない。しかし、薬剤蓄積機構に関してはP-gp及びATP7Aの排出機構と、Na, K-ATPaseの汲み入れ機構が相互に関連してCDDP耐性に関与している可能性が高いことが示唆された。

結 論

頭頸部癌細胞を用いてCDDP耐性機構におけるNa, K-ATPaseの役割を検討し、以下の結論を得た。癌細胞は正常細胞よりCDDPに対し耐性を示し、CDDP耐性化はouabain耐性化を伴うことが示唆された。CDDP耐性のメカニズムは細胞の種類によって異なり、今回の検討ではNa, K-ATPase, P-gpとATP7Aの総合的な作用が関与すると示唆された。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、本研究に数々の御援助、御協力をいただきました本学大学院歯学研究科口腔病態学講座口腔顎顔面外科学教室、口腔病態学講座細胞分子薬理学教室の教室員各位に厚く御礼申し上げます。

参 考 文 献

- 1) Cara AR, Eileen DM : Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treat Rev* 33 : 9-23, 2007.
- 2) Graeff de A, Slebos RJ, Rodenhuis S : Resistance to cisplatin and analogues : mechanisms and potential clinical implications. *Cancer Chemother Pharmacol* 22 : 325-332, 1988.
- 3) Hospers GA, Mulder NH, De Vries EG : Mechanisms of cellular resistance to cisplatin. *Med Oncol Tumor Pharmacother* 5 : 145-151, 1988.
- 4) Kelley SL, Rozenzweig M : Resistance to platinum compounds : mechanisms and Beyond. *Eur J Cancer Clin Oncol* 25 : 1135-1140, 1989.
- 5) Tew KD, Bomber AM, Hoffman SJ : Ethacrynic acid and piroprost as enhancers of cytotoxicity in drug resistant and sensitive cell lines. *Cancer Res* 48 : 3622-3625, 1988.
- 6) Basu A, Lazo JS : A hypothesis regarding the protective role of metallothioneins against the toxicity of DNA interactive anticancer drugs. *Toxicol Lett* 50 : 123-135, 1990.

- 7) Andrews PA, Murphy MP, Howell SB : Metallothionein-mediated cisplatin resistance in human ovarian carcinoma cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 19 : 149-154, 1987.
- 8) Kasahara K, Fujiwara Y, Nishio K, Ohmori T, Sugimoto Y, Komiya K, Matsuda T, Saijo N : Metallothionein content correlates with the sensitivity of human small cell lung cancer cell lines to cisplatin. *Cancer Res* 51 : 3237-3242, 1991.
- 9) Eastman A, Schulte N : Enhanced DNA repair as a mechanism of resistance to cis-diamminedichloroplatinum (II). *Biochemistry* 27 : 4730-4734, 1988.
- 10) Kawai K, Kamatani N, Georges E, Ling V : Identification of a membrane glycoprotein overexpressed in murine lymphoma sublines resistant to cis-diamminedichloroplatinum (II). *J Biol Chem* 265 : 13137-13142, 1990.
- 11) Samimi G, Varki NM, Wilczynski S, Safaei R, Alberts DS, Howell SB : Increase in expression of the copper transporter ATP7A during platinum drug-based treatment is associated with poor survival in ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res* 9 : 5853-5859, 2003.
- 12) Katano K, Safaei R, Samimi G, Holzer A, Rochdi M, Howell SB : The copper export pump ATP7B modulates the cellular pharmacology of carboplatin in ovarian carcinoma cells. *Mol Pharmacol* 64 : 466-473, 2003.
- 13) Kishimoto S, Kawazoe Y, Ikeno M, Saitoh M, Nakano Y, Nishi Y, Fukushima S, Takeuchi Y : Role of Na⁺, K⁺-ATPase alpha1 subunit in the intracellular accumulation of cisplatin. *Cancer Chemother Pharmacol* 57 : 84-89, 2006.
- 14) Ahmed Z, Deyama Y, Yoshimura Y, Suzuki K : Cisplatin sensitivity of oral squamous carcinoma cells is regulated by Na⁺, K⁺-ATPase activity rather than copper-transporting P-type ATPases, ATP7A and ATP7B. *Cancer Chemother Pharmacol* 63 : 643-650, 2009.
- 15) Horisberger JD, Lemas V, Kraehenbühl JP, Rossier BC : Structure-Function Relationship of Na, K-ATPase. *Annu Rev Physiol* 53 : 565-584, 1991.
- 16) Nakatani K, Nakamura M, Uzawa K, Wada T, Seki N, Tanzawa H, Fujita S : Establishment and gene analysis of a cisplatin-resistant cell line, Sa-3R, derived from oral squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 13 : 709-714, 2005.
- 17) Nakamura M, Nakatani K, Uzawa K, Ono K, Uesugi H, Ogawara K, Shiiba M, Bukawa H, Yokoe H, Wada T, Fujita S, Tanzawa H : Establishment and characterization of a cisplatin-resistant oral squamous cell carcinoma cell line, H-1R. *Oncol Rep* 14 : 1281-1286, 2005.
- 18) Negoro K, Yamano Y, Fushimi K, Saito K, Nakatani K, Shiiba M, Yokoe H, Bukawa H, Uzawa K, Wada T, Tanzawa H, Fujita S : Establishment and characterization of a cisplatin-resistant cell line, KB-R, derived from oral carcinoma cell line, KB. *Int J Oncol* 30 : 1325-1332, 2007.
- 19) Chifflet S, Torriglia A, Chiesa R, Tolosa S : A method for the determination of inorganic phosphate in the presence of labile organic phosphate and high concentrations of protein : application to lens ATPases. *Anal Biochem* 168 : 1-4, 1988.
- 20) Gottesman MM : Mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treatment Reviews* 33 : 9-23, 2007.
- 21) Gottesman MM : Mechanisms of cancer drug resistance. *Annu Rev Med* 53 : 615-627, 2002.
- 22) Tsukamoto H, Kondo S, Mukudai Y, Nagumo T, Yasuda A, Kurihara Y, Kamatani T, Shintani S : Evaluation of anticancer activities of benzo[c]phenanthridine alkaloid sanguinarine in oral squamous cell carcinoma cell line. *Anticancer Res* 31 : 2841-2846, 2011.

ORIGINAL

Change of Na, K-ATPase and ouabain sensitivity in oral cancer cells accompanied by acquisition of cisplatin resistance

Suguru Hirakawa¹⁾, Yoshiaki Deyama²⁾, Yoshitaka Yoshimura²⁾, Kuniaki Suzuki²⁾
and Kanchu Tei¹⁾

ABSTRACT :

Purpose : Resistance of cancer cells is an obstacle in chemotherapy for cancer by cisplatin (CDDP). But it is not well elucidated in the mechanism. We examined the change of Na, K-ATPase accompanied by the acquisition of the CDDP resistance of oral cancer cells.

Methods : Oral cancer cell lines (Sa3, H1, KB) and CDDP-resistant lines of (Sa3R, H1R, KBR) provided from Chiba University, Faculty of Medicine and cells collected from normal gingiva, were used. Na, K-ATPase activity and cell viability under treatment ouabain and CDDP for each cell was measured. Assessment of Na, K-ATPase α subunits, ATP7A and P-glycoprotein (P-gp) was done by western blotting.

Results : According to CDDP, 50% inhibitory concentration (IC_{50}) was, 7.5×10^{-4} M and 1.5×10^{-4} M respectively in H1R and H1, 6.0×10^{-3} M and 4.5×10^{-3} M respectively in Sa3R and Sa3, 7.0×10^{-4} M and 1.0×10^{-4} M respectively in KBR and KB. CDDP sensitivity was lower than the normal gingival cells to cancer cells. Resistant strains showed a lower sensitivity than the more sensitive strains of each.

Measurement of Na, K-ATPase activity, Sa3R is higher than Sa3, H1R was higher than H1 slightly, but there was no significant difference in the KBR and KB. Activity measurements were consistent in Na, K-ATPase and protein expression levels. IC_{50} was examined for each cell in the presence of ouabain and were 80 nM and 60 nM in the H1R and H1, 180 nM and 80 nM in the Sa3R and Sa3, 130 nM and 40 nM in the KBR and KB. The normal gingival cells was 5 nM.

From the results of these examinations, it was suggested the cancer cells resistant to CDDP get resistant to ouabain at the same time. As for the ouabain concentration dependence of Na, K-ATPase inhibition of the cells, there is no significant difference in the 50% inhibitory concentration between resistant and parent lines. Therefore, change of Na, K-ATPase sensitivity to ouabain was not related to resistance of the cells against ouabain. It was suggested that P-gp and Na, K-ATPase, ATP7A is involved in CDDP resistance. The mechanism depends on the type of cells, although we found no features that are common in the between the parent and resistant lines for the expression of ATP7A and P-gp.

Key Words : CDDP, Na, K-ATPase, P-glycoprotein, ATP7A

¹⁾Oral and Maxillofacial Surgery, Department of Oral Pathobiological Science, Faculty of Dental Medicine and Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University (Chief : Prof. Kanchu Tei), Kita 13, Nishi 7, Kita-ku, Sapporo, 060-8586, Japan

²⁾Molecular Cell Pharmacology, Department of Oral Pathobiological Science, Faculty of Dental Medicine and Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University (Chief : Prof. Kuniaki Suzuki), Kita 13, Nishi 7, Kita-ku, Sapporo, 060-8586, Japan