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	
Туре	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

**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(IC $_{50}$ )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IC $_{50}$ 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問期の停止をもたらしアポトーシスを引き起こす<sup>1)</sup>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<sup>24)</sup>、細胞質内解毒

機構<sup>5-8)</sup>, DNA修復機構<sup>9)</sup> 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-glycoprotein<sup>10)</sup> やATP7A, ATP7B<sup>11, 12)</sup> 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<sup>13, 14)</sup> 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-ATPase<sup>15)</sup> 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<sup>+</sup>を細胞外に、2個のK<sup>+</sup>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<sup>16-18)</sup> を用いて、比較検討した。

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)

<sup>1) 〒060-8586</sup> 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)

<sup>2) 〒060-8586</sup> 札幌市北区北13条西7丁目

## 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%  $CO_2$ 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 μl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 MgCl<sub>2</sub>) とEDTAを30 μl含む200 μlの反応液に、基質とし て最終濃度5 mMとなる50 μl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 ℃で30 分間反 応させた後に300 µl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Chifflet<sup>19)</sup>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 μl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 μl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 μg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<sup>®</sup>(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 αl 抗体(Upstate Biotechnology、Lake Placid、CA)(1:1000)、抗Na、K-ATPase βl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℃、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®, MICROTESTM 96, Becton Dickinson Labware, Flanklin 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<sup>-2</sup> 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.

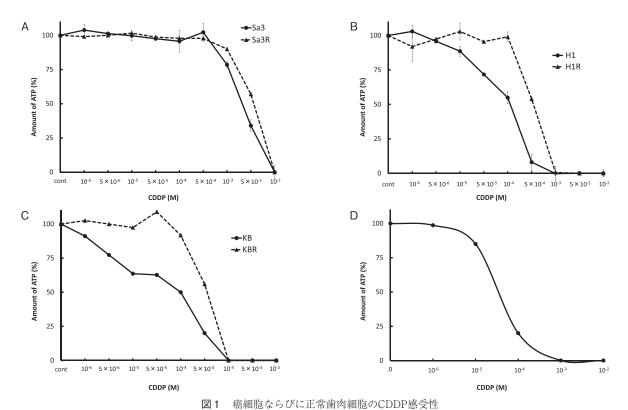
## 結 果

## 1. CDDP感受性とouabain感受性

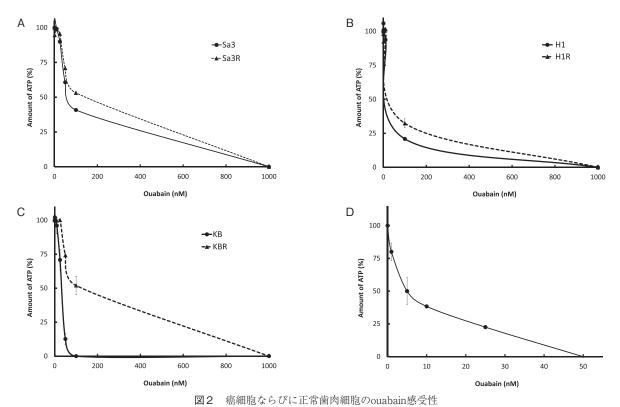
種々濃度のCDDPあるいはouabain存在下に正常歯肉細胞と親株、耐性株を培養した後、Wallac 1420 ARVOsx マルチラベルカウンタを用いてATP含量を測定することにより、細胞生存率のCDDPあるいはouabain濃度依存性を確認した。

Sa3のCDDPに対する50%細胞生存濃度( $IC_{50}$ )は4.5× $10^{-3}$  M, Sa3Rは5.5× $10^{-3}$  Mであった(図1A)、H1の $IC_{50}$ は1.5× $10^{-4}$  M, H1Rは7.5× $10^{-4}$  Mであり(図1B)、KBの $IC_{50}$ は1.0× $10^{-4}$  M, KBRは7.0× $10^{-4}$  Mであった(図1C)。また、正常歯肉細胞の $IC_{50}$ は5.0× $10^{-5}$  Mであった(図1D).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 $IC_{50}$ 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



Sa3 (●), Sa3R (▲) (A), H1 (●), H1R (▲) (B), KB (●), KBR (▲) (C), 正常歯肉細胞 (D) に10<sup>-6</sup> M ~10<sup>-2</sup> 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.



Sa3 (ullet), Sa3R (ullet) (A), H1 (ullet), H1R (ullet) (B), KB (ullet), KBR (ullet) (C), 正常歯肉細胞 (D) に1 nM  $\sim$ 10³ 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	$1.0 \times 10^{-4} \mathrm{M}$	$7.0 \times 10^{-4} \mathrm{M}$
H1	$1.5 \times 10^{-4} \mathrm{M}$	$7.5 \times 10^{-4} \mathrm{M}$
Sa3	$4.5 \times 10^{-3} \mathrm{M}$	$5.5 \times 10^{-3} \mathrm{M}$

正常歯肉	$5.0 \times 10^{-5} \mathrm{M}$
------	---------------------------------

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 3 A). Sa3と Sa3Rはそれぞれ $21.4\pm0.6$ と $36.6\pm1.2$  n mol Pi/mg/minで Sa3Rが高値を示した. H1とH1Rではそれぞれ $25.5\pm1.1$ と  $29.6\pm0.7$  n mol Pi/mg/minでH1Rが高かった. またKBと KBRではそれぞれ $2.5\pm0.8$ と $12.5\pm0.4$  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,

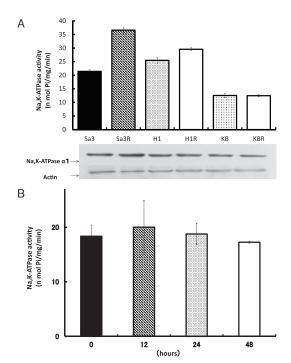


図3 癌細胞のNa, K-ATPase

Sa3, Sa3R, HI, HIR, KB, KBR細胞のNa, K-ATPase活性 (A 上段) を測定し、ウエスタンブロッティングにてNa, K-ATPase αl 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.

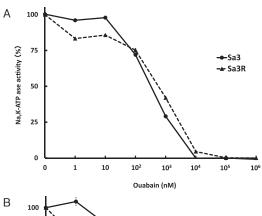
Sa3の培養時間によるNa, K-ATPase活性の経時的変化 (B) を確認した。培養時間によるNa, K-ATPase活性の変化はみられなかった。

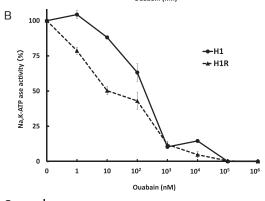
表2 癌細胞ならびに正常歯肉細胞のouabain感受性

	親株	耐性株
KB	$4.0 \times 10^{-5} \mathrm{M}$	$1.3 \times 10^{-4} \mathrm{M}$
H1	$5.0 \times 10^{-6} \mathrm{M}$	$2.0 \times 10^{-5} \mathrm{M}$
Sa3	$8.0 \times 10^{-5} \mathrm{M}$	$1.8 \times 10^{-4} \mathrm{M}$

正常歯肉 5.0×10<sup>-6</sup> M

K-ATPase αl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





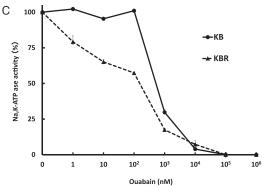


図4 Na, K-ATPase活性のouabain濃度依存性

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。

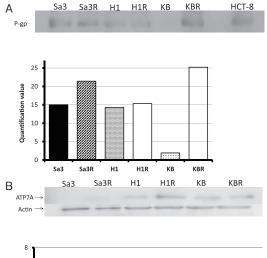
め, Sa3を0, 12, 24, 48時間培養し, 回収した後にNa, K-ATPase活性を測定したところ, 差はみられなかった(図3B).

#### 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( $Ki_{50}$ )はそれぞれ800 nM程度(図4A)、H1RとH1の $Ki_{50}$ 値はそれぞれ10 nMと120 nM(図4B)、KBRとKBの $Ki_{50}$ 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 5 A)及びATP7Aの発現量(図 5 B)をそれぞれウェスタンプ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。



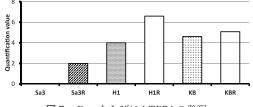


図5 P-gpならびにATP7Aの発現

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HI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<sup>2-9)</sup> 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, ATP7B<sup>10-12)</sup> 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の汲みいれ機 構<sup>13, 14)</sup> 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うると考えたが, 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< td=""><td>Sa3<sa3r< td=""><td>Sa3<sa3r< td=""></sa3r<></td></sa3r<></td></sa3r<>	Sa3 <sa3r< td=""><td>Sa3<sa3r< td=""></sa3r<></td></sa3r<>	Sa3 <sa3r< td=""></sa3r<>
H1	H1≦H1R	H1=H1R	H1 <h1r< td=""></h1r<>
KB	KB=KBR	KB <kbr< td=""><td>KB=KBR</td></kbr<>	KB=KBR

耐性は2種類に大別することができ<sup>20,21)</sup>, 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 の場合は、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apotosis誘導効果を示す<sup>22)</sup>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、apotosis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の汲みい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.
- 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.
- Kelley SL, Rozencweig 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 piriprost 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.

- 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.
- Eastman A, Schulte N: Enhanced DNA repair as a mechanism of resistance to cis-diamminedichloroplatinum (II). Biochemistry 27: 4730-4734, 1988.
- 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 5: 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<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase alphal 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<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-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 Hirakawa<sup>1)</sup>, Yoshiaki Deyama<sup>2)</sup>, Yoshitaka Yoshimura<sup>2)</sup>, Kuniaki Suzuki<sup>2)</sup> and Kanchu Tei<sup>1)</sup>

#### 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<sub>50</sub>) was,  $7.5 \times 10^{-4}$  M and  $1.5 \times 10^{-4}$  M respectively in H1R and H1,  $6.0 \times 10^{-3}$  M and  $4.5 \times 10^{-3}$  M respectively in Sa3R and Sa3,  $7.0 \times 10^{-4}$  M and  $1.0 \times 10^{-4}$  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

<sup>&</sup>lt;sup>1)</sup>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

<sup>&</sup>lt;sup>2)</sup>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