HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	口腔がん細胞（KB）およびそのシスプラチン耐性株（KB-R）に対するネダプラチンおよびカルボプラチンの作用
Author(s)	義達, 理恵子; 鈴木, 邦明; 吉村, 善隆; 鄭, 漢忠; 平野, 正康
Citation	北海道歯学雑誌, 39(1), 11-16
Issue Date	2018-09
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/71544
Type	article
File Information	39_01_02_Yoshitatsu.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

原　著

口腔がん細胞（KB）およびそのシスプラチン耐性株（KB-R）に対するネダプラチンおよびカルボプラチンの作用

義達理恵子[1, 3)]　鈴木　邦明[2)]　吉村　善隆[2)]　鄭　漢忠[3)]　平野　正康[1)]

抄　録：
【目的】口腔がん細胞のシスプラチン耐性化に伴うネダプラチンおよびカルボプラチンに対する感受性の変化を検討することを目的に本研究を行った．
【材料と方法】口腔がん細胞である KB 細胞（KB）及びそのシスプラチン耐性株（KB-R）をネダプラチンおよびカルボプラチン存在下で培養し，細胞生存率の指標として細胞内 ATP 量を測定した．
【結果と考察】ネダプラチンおよびカルボプラチン存在下で 72 時間培養した KB および KB-R は濃度に依存して細胞生存率が低下した．KB および KB-R の細胞生存率が 50％低下する濃度は，ネダプラチン存在下では 11 μM および 69 μM，カルボプラチン存在下では 86 μM および 334 μM となり，シスプラチン耐性株はネダプラチンおよびカルボプラチンに対しても耐性化していることが示された．また，細胞生存率の低下において，カルボプラチンはネダプラチンと比較してより高濃度を必要とした．KB は 62.5 μM のネダプラチンおよび 125 μM のカルボプラチン存在下で細胞生存率が最低となり，より高濃度のネダプラチンおよびカルボプラチン存在下では細胞生存率が増加した．ネダプラチンおよびカルボプラチンには，KB の細胞死を引き起こす濃度域と，細胞死を抑制する濃度域が存在することが示唆された．KB-R は，低濃度のネダプラチンおよびカルボプラチンに対して KB よりも耐性を示したが，より高濃度のネダプラチンおよびカルボプラチン存在下では，KB で観察される細胞生存率の増加を示さなかった．以上の結果は，KB と KB-R はネダプラチンおよびカルボプラチンに対する反応性が異なること，及び，シスプラチン耐性株はネダプラチンおよびカルボプラチンに対しても耐性を示すことを示唆する．
【結論】口腔がん細胞株である KB がシスプラチンに対して耐性化すると，ネダプラチンおよびカルボプラチンに対する交叉耐性を示す．また，耐性化に伴い，広い濃度範囲でネダプラチンおよびカルボプラチンに対する感受性が変化する．

キーワード：口腔がん細胞，KB 細胞，シスプラチン耐性，ネダプラチン，カルボプラチン

緒　　言

シスプラチンをはじめとした白金系抗がん剤はがん化学療法において中心的な薬剤のひとつであり，口腔がんにおいても多くの症例で使用されている．白金系抗がん剤は DNA 鎖間架橋結合を誘導することにより DNA 合成を抑制し，細胞分裂を阻害する[1, 2)]が，一部の症例においてがん細胞のシスプラチンに対する耐性化が抗がん治療の障害となっている．シスプラチンに対する薬剤耐性機構は，細胞内蓄積機構[3-5)]，細胞質内解毒機構[6, 7)]，DNA 修復機構[8)]等の多因子性であると報告されている．

本研究に使用した KB-R 細胞は，シスプラチンに対する耐性化機構の研究を目的として，口腔がん細胞である KB 細胞にシスプラチンを作用させることにより樹立されたシスプラチン耐性細胞株である[9)]．KB-R 細胞は KB 細胞と比較して MRP1 及び MRP2 の発現増加と，MDR2 の発現減少が確認されたが[9)]，シスプラチン耐性化に伴う他の白金系抗がん剤に対する感受性の変化に関する報告は見ら

1) 〒068-0004 岩見沢市４条東16丁目５番地
北海道中央労災病院歯科口腔外科（主任：平野　正康 指導医）
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科口腔病態学講座細胞分子薬理学教室（主任：鈴木　邦明 名誉教授）
3) 〒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科口腔病態学講座口腔顎顔面外科学教室（主任：鄭　漢忠 教授）

れない．シスプラチン耐性化と他の白金系抗がん剤に対する感受性の変化の関係を明らかにすることは，臨床におけるシスプラチン耐性を克服する抗がん剤の使用法の開発に寄与すると考え，KB および KB-R に対するネダプラチンおよびカルボプラチンの作用を検討した．

方　　法

1．細胞の培養と回収

KB 細胞および KB-R 細胞は，千葉大学の丹沢秀樹教授から恵与された．細胞は 10％牛胎仔血清（FBS）を含有し，フェノールレッドを含まない Dulbecco's Modified Eagle Medium（DMEM）（和光純薬，大阪）を用いて 5％ CO_2-95％空気の気相下にて 37℃でサブコンフルエンスまで培養したのち 250 mM sucrose にて回収した．

2．試薬

ネダプラチンおよびカルボプラチンを和光純薬から購入した．また，その他の試薬は特級を使用した．

3．細胞の生存に対するネダプラチンおよびカルボプラチンの濃度依存性

回収した細胞を 96 穴プレートに播種し，0，7.8，15.6，31.2，62.5，125，250 及び 500 μM のネダプラチンあるいはカルボプラチン存在下で培養し，12，24（ネダプラチン）あるいは 48（カルボプラチン）及び 72 時間後に，生存細胞率を測定するために細胞内 ATP 量を測定した．測定には ViaLight™ Plus Cell Proliferation and Cytotoxicity Bio Assay Kit（LONZA, Walkersville, MD）を使用し，Wallac 1420 ARVOSX マルチラベルカウンタ（PerkinElmer, Inc, MA）にて測定した．ネダプラチンおよびカルボプラチン非存在下の測定値をコントロール（100%）とした．

4．データ処理

結果は測定（n ＞ 6）した平均値と標準偏差を求めてグラフに示した．細胞生存率を 50％低下させるネダプラチンおよびカルボプラチンの濃度（IC_{50}値）は，測定値を使用して Hill プロットを行い，計算した．

結　　果

1．KB及びKB-R細胞生存率のネダプラチン濃度依存性

KB 及び KB-R 細胞生存率のネダプラチン濃度依存性を図１及び図２に示した．KB および KB-R 細胞とも，ネダプラチンとのインキュベーション時間が 12，24 および 72 時間と増加すると，細胞生存率は低下した（図１と２）．KB 細胞は 12 および 24 時間のインキュベーションでは，ネダプラチン濃度に依存して細胞生存率は低下し，500 μM のネダプラチンではそれぞれ 86％および 67％まで低下した．72 時間のインキュベーションでは，細胞生存率はネダプラチン濃度に依存して低下し 31.2 μMでは 13％であったが，さらにネダプラチン濃度が増加すると細胞生存率の低下は抑制され 250 μM のネダプラチンでは 40％の低下にとどまった．ネダプラチンによる IC_{50}値は 11 μM であった（図１）．一方，KB-R 細胞は 12 時間のインキュベーションでは 125 μM のネダプラチンで 121％，24 時間のインキュベーションでは，62.5 μM のネダプラチンで 108％と細胞生存率の増加を示し，より高濃度のネダプラチンでは濃度に依存した細胞生存率の低下が観察された．72 時間のインキュベーションでは，細胞生存率はネダプラチン濃度に依存して低下し，IC_{50}値は 69 μM であった（図２）．

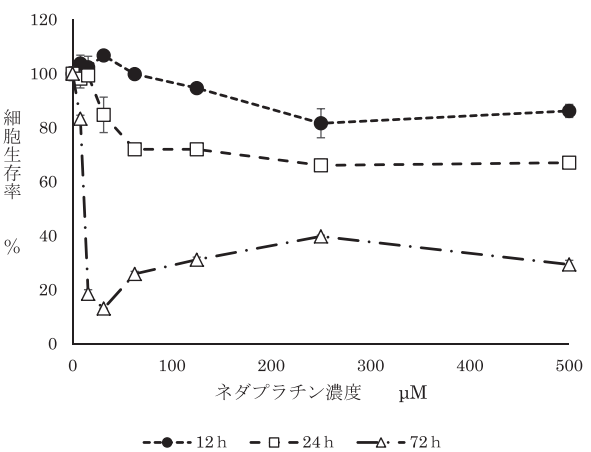

図１　KB 細胞生存のネダプラチン濃度依存性
KB 細胞を種々濃度のネダプラチン存在下で培養し，12（●），24（□）及び72（△）時間後に，細胞生存率を測定するために ViaLightTM plus kit（LONZA）を用いて細胞内 ATP 量を測定した．各時間でのネダプラチン非存在下の測定値を 100％とした．

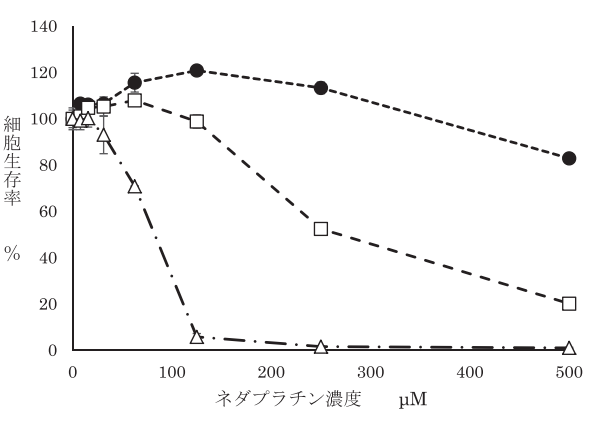

図２　KB-R 細胞生存のネダプラチン濃度依存性
シスプラチン耐性である KB-R 細胞を種々濃度のネダプラチン存在下で培養し，12（●），24（□）及び72（△）時間後に，図１と同様に細胞内 ATP 量を測定した．

2．KB 及び KB-R 細胞生存率のカルボプラチン濃度依存性

KB 及び KB-R 細胞生存率のカルボプラチン濃度依存性を図３及び図４に示した．カルボプラチンとのインキュベーション時間が 12 時間では，KB および KB-R 細胞とも，細胞生存率のカルボプラチン濃度に依存した変化はほぼ観察されなかったが，インキュベーション時間が 48 および 72 時間と増加すると，細胞生存率は低下した（図３と４）．KB 細胞は 48 および 72 時間のインキュベーションでは，細胞生存率はカルボプラチン濃度に依存して低下し，125 μM のカルボプラチンではそれぞれ 67%および 28%まで低下した．しかし，さらに高濃度のカルボプラチン存在下では，細胞生存率の低下はカルボプラチン濃度に依存して顕著に抑制された．500 μM のカルボプラチン存在下で，48 時間のインキュベーションでは 118%と細胞生存率の増加が見られ，72 時間のインキュベーションでは 92%であった．72 時間のインキュベーションでは，カルボプラチンによる IC_{50}値は86 μM であった（図３）．一方，KB-R 細胞は 48 および 72 時間のインキュベーションでは，カルボプラチン濃度に依存性して細胞生存率は低下し，72 時間インキュベーションでの IC_{50}値は 334 μM であった（図４）．

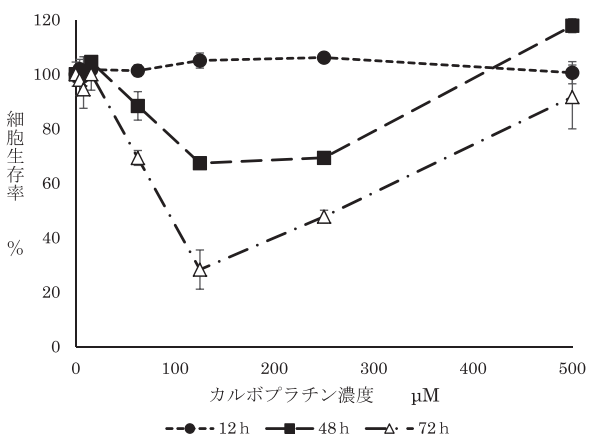

図３　KB 細胞生存のカルボプラチン濃度依存性
KB 細胞を種々濃度のカルボプラチン存在下で培養し，12（●），48（■）及び 72（△）時間後に，図１と同様に細胞内ATP量を測定した．

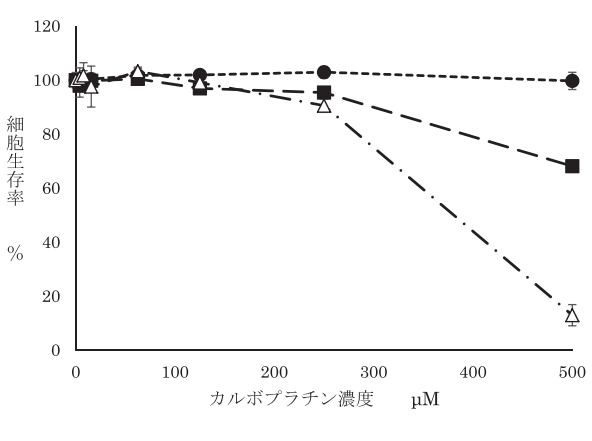

図４　KB-R 細胞生存のカルボプラチン濃度依存性
KB-R 細胞を種々濃度のカルボプラチン存在下で培養し，12（●），48（■）及び 72（△）時間後に，図１と同様に細胞内ATP量を測定した．

考　　察

1．KB-R のネダプラチンおよびカルボプラチンに対する交叉耐性

12 時間あるいは 24 時間のインキュベーションにおいて，KB は低濃度のネダプラチンでも濃度依存性に細胞生存率が低下したが（図１），KB-R は低濃度のネダプラチン存在下では細胞生存率の増加が観察された（図２）．72 時間のインキュベーションでは，ネダプラチンの KB に対する IC_{50}値は 11 μM であるのに対し，KB-R に対する IC_{50}値は 69 μMであった（図１，２）．また 72 時間のインキュベーションにおいて，カルボプラチンの KB に対する IC_{50}値は 86 μM であるのに対し，KB-R に対する IC_{50}値は 334 μM であった（図３，４）．シスプラチン耐性株（KB-R）は親株（KB）に比較して，細胞生存率の低下に高濃度のネダプラチンおよびカルボプラチンを必要としており，耐性化していることが示された．すなわち，シスプラチン耐性化に伴って，ネダプラチンおよびカルボプラチンに対する交叉耐性を形成したことを示している．シスプラチン，ネダプラチンおよびカルボプラチンは化学構造の $Pt\text{-}(NH_3)_2$が共通していることから，この部位の認識が交叉耐性の形成に関与している可能性がある．

白金系抗がん剤であるシスプラチン，ネダプラチン，カルボプラチンの薬理作用について，動物実験では作用の強さがシスプラチン，ネダプラチン，カルボプラチンの順という記載が見られる[1, 2]．また，代表的な有害作用である腎毒性はカルボプラチンが最も頻度が低いとされる．しかし，これら抗がん剤のヒトにおける臨床用途は腫瘍の部位と種類によって異なり，また有害作用も異なることから，作用の強さを比較できる報告は見いだせなかった．本研究において，72 時間インキュベーション後の，KB 細胞に対するネダプラチンの IC_{50}値は 11 μM，カルボプラチンの IC_{50}値は 86 μM であった．KB-R 株を樹立した Negoro らは，MTT アッセイにより，72 時間インキュベーション後の KB に対するシスプラチンの IC_{50}値は 2 μM，KB-R では 12 μM と報告している[9]．これらの結果は，口腔がん細胞に対する白金系抗がん剤の作用の強さは，シスプラチン，ネダプラチン，カルボプラチンの順であることを示唆する．

2．KB 細胞の生存率に対するネダプラチンおよびカルボプラチンの作用の２相性

ネダプラチン存在下で 72 時間インキュベーションした KB 細胞は，31.2 μM では細胞生存率が 13%まで低下したが，さらにネダプラチン濃度が増加すると細胞生存率も増大し 250 μM では 40%であった（図１）．また，カルボプラチン存在下で 48 あるいは 72 時間インキュベーションした KB 細胞は，125 μM までは細胞生存率が低下したが，さらにカルボプラチン濃度が増加すると細胞生存率が増大した（図３）．すなわち，ネダプラチンあるいはカルボプラチンには，KB 細胞の生存率を低下する濃度域と，生存率を増大する濃度域が存在し，作用は２相性であることを示唆する．KB-R 株を樹立した Negoro らは，33 μM のシスプラチン濃度までしか細胞生存率を測定していない[9]ので，このような現象を見いだしていない．著者らが知る限り白金系抗がん剤が濃度によってはがん細胞の増殖を促進するという報告は初めてである．

シスプラチンの抗がん作用は，DNA のグアニンあるいはアデニンの N-7位に結合して DNA 鎖間架橋結合を形成し，DNA 合成及び細胞分裂を阻害してアポトーシスを誘導する説が有力である[2, 10]．この過程では，さまざまな細胞内情報伝達系が，活性化あるいは抑制されると報告されており[10]，複雑である．一方，シスプラチンはタンパク質の二次構造に影響を与えることにより細胞内情報伝達機構に関与すると報告されている[11]．低濃度の白金系抗がん剤による DNA 架橋やタンパク質の構造変化はアポトーシスなどの細胞死の情報伝達系を促進するが，高濃度では細胞死の抑制あるいは細胞増殖の情報伝達系が促進されることがあれば，比較的高濃度のネダプラチンやカルボプラチンによる細胞増殖の増大は説明可能である．

シスプラチンの臨床使用濃度は血中濃度で 13.3 μM 程度であり，KB の細胞生存率が低下するネダプラチン濃度に近いことから，シスプラチンに対する耐性獲得の臨床的な意義からは，低濃度での耐性化で十分である．しかし，実験的高濃度ではあるが，高濃度の白金系抗がん剤が細胞増殖を促進するという結果は，白金系抗がん剤の作用機構および耐性化の機構の研究において有用な知見であると考えられる．

一方，KB-R 細胞は低濃度ではネダプラチンおよびカルボプラチンに対して耐性化しているが，比較的高濃度のネダプラチンおよびカルボプラチン存在下で KB が示す，細胞生存率の増大を示さなかった（図２，４）．KB-R 細胞は，低濃度の白金系抗がん剤による細胞死に対する耐性を獲得したが，比較的高濃度の白金系抗がん剤存在下で細胞死を抑制する機能を失った可能性がある．これらの現象における分子的基盤の解明が今後の課題である．

結　　論

KB および KB-R を用いてシスプラチン耐性化に伴うネダプラチン及びカルボプラチンに対する感受性の変化を検討し，以下の結論を得た．KB のシスプラチン耐性化によりネダプラチン及びカルボプラチンに対する交叉耐性を示す．白金系抗がん剤には濃度に依存した細胞生存率低下および増大の作用があり，KB は両作用を受けるが，耐性株であるKB-Rは反応性の一部を欠如している．

参 考 文 献

1) Huliciak M, Vacek J, Sebela M, Orolinova E, Znaleziona J, Havlikova M, Kubala M : Covalent binding of cisplatin impairs the function of Na(+)/K(+)-ATPase by binding to its cytoplasmic part. Biochem Pharmacol 83 : 1507-1513, 2012.

2) Eljack ND, Ma HY, Drucker J, Shen C, Hambley TW, New EJ, Friedrich T, Clarke RJ : Mechanisms of cell uptake and toxicity of the anticancer drug cisplatin. Metallomics 6 : 2126-2133, 2014.

3) De Graeff A, Slebos RJ, Rodenhuis S : Resistance to cisplatin and analogues : mechanisms and potential clinical implications. Cancer Chemoth Pharm 22 : 325-332, 1988.

4) Hospers GA, Mulder NH, De Vries EG : Mechanisms of cellular resistance to cisplatin. Med Oncol Tumor Phar 5 : 145-151, 1988.

5) Kelley SL, Rozencweig M : Resistance to platinum compounds : mechanisms and beyond. Eur J Cancer Clin On 25 : 1135-1140, 1989.

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) 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.

8) Eastman A, Schulte N : Enhanced DNA repair as a mechanism of resistance to cis-diamminedichloroplatinum(II). Biochemistry US 27 : 4730-4734, 1988.

9) 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.

10) Siddik ZH : Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. Oncogene 22 : 7265-7279, 2003.

11) 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 Chemoth Pharm 57 : 84-90, 2006.

Hokkaido J. Dent. Sci., 39 : 11−16, 2018.

ORIGINAL

The effect of nedaplatin and carboplatin on oral carcinoma cell line, KB, and its cisplatin-resistant cell line, KB-R.

Rieko Yoshitatsu[1, 3], Kuniaki Suzuki[2], Yoshitaka Yoshimura[2], Kanchu Tei[3] and Masayasu Hirano[1]

ABSTRACT :

Purpose : We examined the change of sensitivity for nedaplatin and carboplatin of oral carcinoma cell line, KB, and its cisplatin-resistant cell line, KB-R.

Materials and methods : We used oral carcinoma cells (parent cell line: KB) and cisplatin-resistant line of KB (resistant cell line: KB-R). The cells were disseminated at a 96-well plate and incubated with 0, 7.8, 15.6, 31.2, 62.5, 125, 250 and 500 μM nedaplatin or carboplatin for 12, 24 or 48 and 72 hours. Then the intracellular ATP content was measured by use of ViaLight™ plus kit (LONZA) for the measurement of the survival rate of the cells.

Results and discussion : The survival rate of KB and KB-R decreased depending on the concentration of nedaplatin or carboplatin after 72 hours incubation. The 50% inhibitory concentrations of survival rate for KB and KB-R were 11 and 69 μM for nedaplatin and 86 and 334 μM for carboplatin. This suggests that the cisplatin resistant cell line showed resistance to nedaplatin or carboplatin. A higher concentration was required for carboplatin to decrease the survival rate compared to nedaplatin. The survival rate of KB was the lowest at 62.5 μM nedaplatin and 125 μM carboplatin, but the survival rate increased at higher concentrations of nedaplatin or carboplatin. This suggests there are two concentration ranges for nedaplatin or carboplatin, and one is for cell death and the other is for recovery from cell death. KB-R showed resistance to lower concentration of nedaplatin or carboplatin compared to KB, but KB-R did not show an increase of survival rate, which KB showed, at higher concentration of nedaplatin or carboplatin. These results suggest that cisplatin resistant KB-R show resistance to nedaplatin or carboplatin and that KB and KB-R possess different sensitivity to nedaplatin or carboplatin.

Conclusion : Cisplatin resistant KB-R showed cross resistance to nedaplatin and carboplatin. Also, the effect of nedaplatin and carboplatin on KB and KB-R changed due to becoming cisplatin resistant.

Key Words : oral carcinoma cell, KB cell, cisplatin-resistant, nedaplatin, carboplatin

[1]Department of Dentistry and Oral Surgery, Hokkaido Chuo Rosai Hospital (Chief : Dr. Masayasu Hirano), 4 Jo Higashi 16 chome, Iwamizawa 068-0004, Japan.
[2]Department of Molecular Cell Pharmacology, Division of Oral Pathobiological Science, Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University (Chief : Prof. Kuniaki Suzuki), North 13, West 7, Kita-ku, Sapporo, 060-8586, Japan.
[3]Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Division of Oral Pathobiological Science, Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University (Chief : Prof. Kanchu Tei), North 13, West 7, Kita-ku, Sapporo, 060-8586, Japan.