



HOKKAIDO UNIVERSITY

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 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	平川, 直
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第11271号
Issue Date	2014-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/56310
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Suguru_Hirakawa_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（歯学） 氏 名 平 川 直

学 位 論 文 題 名

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

【緒言】シスプラチン(CDDP)は化学療法において中心的な薬剤であるが、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、細胞質内解毒機構、DNA 修復機構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-糖タンパク質(P-gp)や ATP7A、ATP7B に関して広く研究が行われている。しかし、Na,K-ATPase は CDDP の取り込みに関与していると報告されているが、深くは明らかになっていない。そこで、CDDP 耐性について Na,K-ATPase 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、耐性を保有させた細胞株である Sa3R 細胞、H1R 細胞、KBR 細胞を用いて、比較検討した。

【方法】Sa3、H1、KB、Sa3R、H1R、KBR 細胞ならびに正常歯肉細胞から採取した線維芽細胞様細胞を培養し、 $0\sim 10^{-2}$ mM CDDP、及び Na,K-ATPase の特異的な阻害薬である $0\sim 120$ nM ouabain を含有した DMEM と交換した後、24 時間後に ViaLight® Plus Cell Proliferation and Cytotoxicity Bio Assay Kit を用い、Wallac 1420 ARVOsx マルチラベルカウンタにて細胞内 ATP 量を測定し、control 群と比較した。続いて、各癌細胞を培養後サブコンフルエンスで回収し、各細胞破砕物の 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 らの方法に従って定量するとともに、 $0\sim 10^6$ nM ouabain を添加し Na,K-ATPase 活性の ouabain 濃度依存性を測定した。また Sa3 を 0、12、24、48 時間培養後回収し、各種破砕物の Na,K-ATPase 活性を同様に定量し比較した。続いて、Na,K-ATPase、P-gp ならびに ATP7A のタンパク質発現量をウェスタンブロッティング法にて解析した。

【結果と考察】CDDP 感受性を調べるために、各親株及び誘導された耐性株に 24 時間 CDDP を作用させ、50%細胞生存濃度 (IC_{50}) を測定した。結果は 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。獲得耐性において、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 倍耐性が高く、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、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、正常歯肉細胞の IC_{50} は最も耐性の低い KB の 1/2 程度であった。したがって、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。また、ウェスタンブロットにて Na,K-ATPase $\alpha 1$ subunit の発現量を確認したところ、活性と類似した結果を示した。なお、細胞を回収した時間による Na,K-ATPase 活性に差はみられなかった。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 CDDP 感受性が増大することとなり、前述の CDDP 感受性試験から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各細胞に 24 時間 ouabain を作用させ、50%細胞生存濃度 (IC_{50}) を測定することにより調べた。結果は、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。したがって、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、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、各細胞の Na,K-ATPase 活性の ouabain 感受性を比較した。結果は 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 にいたっては、耐性株の Na,K-ATPase 活性は親株より感受性が高く、ouabain に対する耐性化は Na,K-ATPase の変化によるものではないことが示唆された。

続いて、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 発現をウェスタンブロットで検出した。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 のみが発現量が高く、KBR は KB より P-gp のみが発現量が高かった。その結果と Na,K-ATPase 活性を含めて検討したところ、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 の発現が多いため、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。

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、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】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。