



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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k11271
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/58179
Type	doctoral thesis
File Information	Suguru_Hirakawa.pdf



博 士 論 文

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

平成 26 年 3 月申請

北海道大学
大学院歯学研究科口腔医学専攻

平川 直

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

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。

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 の各細胞破碎物と最終濃度 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®, MICROTES™ 96, Becton Dickinson Lab-ware, 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 $0 \sim 10^{-2}$ mM CDDP, $0 \sim 120$ 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。

5. 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 (Fig.1A)。H1 の IC_{50} は 1.5×10^{-4} M、H1R は 7.5×10^{-4} M であり (Fig.1B)、KB の IC_{50} は 1.0×10^{-4} M、KBR は 7.0×10^{-4} M であった (Fig.1C)。また、正常歯肉細胞の IC_{50} は 5.0×10^{-5} M であった (Fig.1D)。これらの結果をまとめたのが、Table 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 (Fig.2A)、H1 と H1R がそれぞれ 5 nM と 20 nM (Fig.2B)、KB と KBR でそれぞれ 40 nM と 130 nM (Fig.2C)、正常歯肉細胞は 5 nM であった (Fig.2D)。これらの結果をまとめたのが、Table 2 である。

	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
------	------------------------

Table.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	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
------	------------------------

Table.2 癌細胞ならびに正常歯肉細胞のouabain感受性

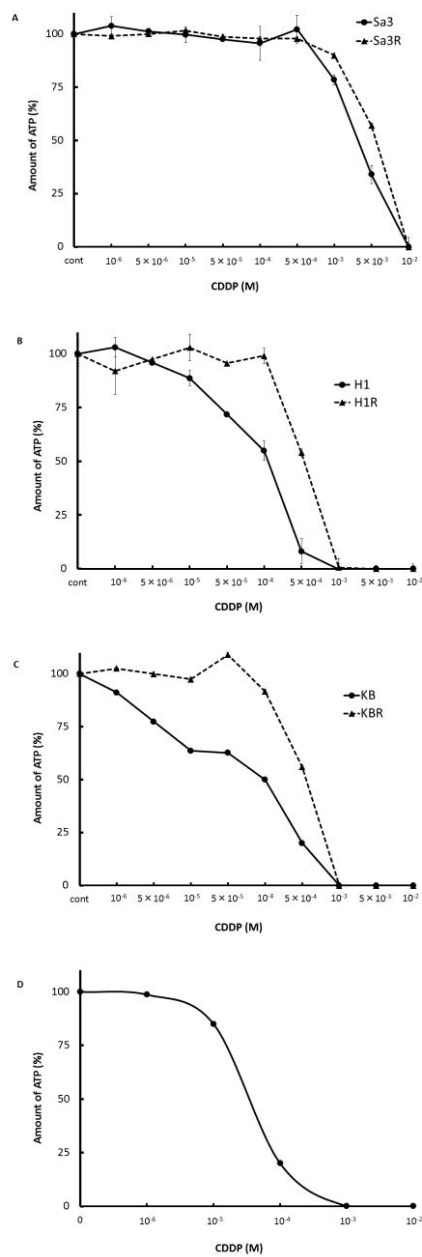


Fig.1 癌細胞ならびに正常歯肉細胞の CDDP 感受性

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 時間後の細胞内 ATP 量を測定することにより生存細胞数を推測した。メディウムのみで培養した 24 時間後の細胞の ATP 量を 100 %とし、CDDP を含むメディウムで培養したものの ATP 量をパーセンテージで表した。

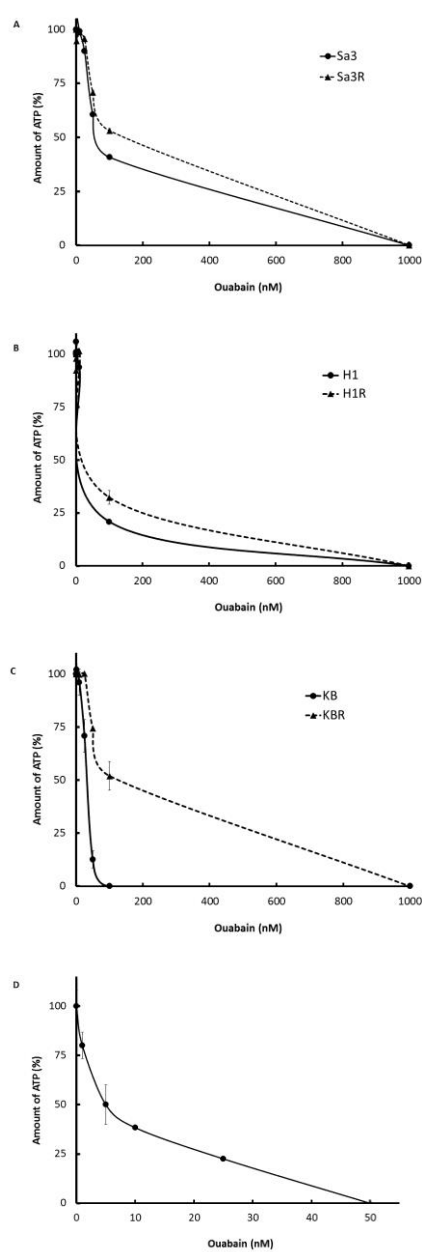


Fig.2 癌細胞ならびに正常歯肉細胞の ouabain 感受性

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 時間後の細胞内 ATP 量を測定することにより生存細胞数を推測した。メディウムのみで培養した 24 時間後の細胞の ATP 量を 100 %とし、CDDP を含むメディウムで培養したものの ATP 量をパーセンテージで表した。

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(Fig.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(Fig.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(Fig.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(Fig.4A)、H1R と H1 の K_{i50} 値はそれぞれ 10 nM と 120 nM (Fig.4B)、KBR と KB の K_{i50} 値はそれぞれ 110 nM と 900 nM(Fig.4C)であった。

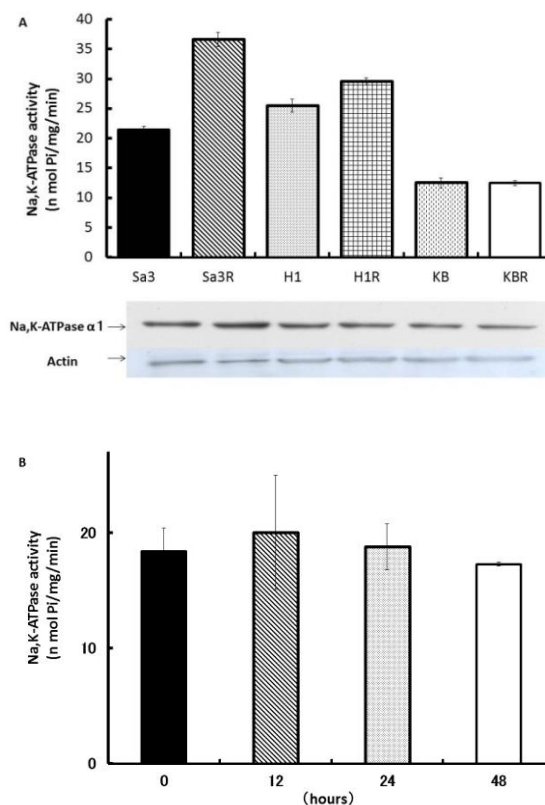


Fig.3 癌細胞の Na,K-ATPase 活性

Sa3, Sa3R、H1、H1R、KB、KBR 細胞を培養して confluence 前に細胞を回収し、細胞破砕物の Na,K-ATPase 活性を測定した。ATP を基質として遊離無機リン量を Chifflet 法にて定量した (A 上段)。ウェスタンブロッティングにて Na,K-ATPase $\alpha 1$ subunit 発現量を確認した(A 下段)。Sa3 細胞を 0、12、24、48 時間培養し、回収後に Na,K-ATPase 活性を測定した (B)。

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, Fig.5A) 及び ATP7A の発現量(Fig.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。

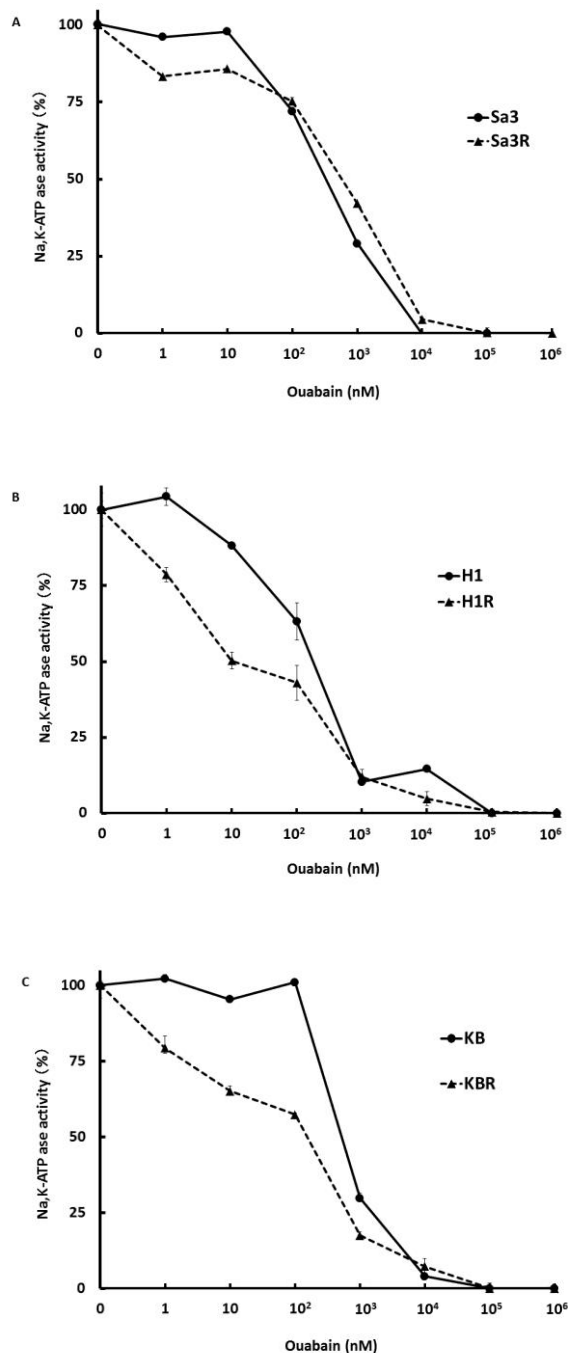


Fig.4 Na,K-ATPase 活性の ouabain 濃度依存性

Sa3(●), Sa3R(▲) (A), H1(●), H1R(▲) (B), KB(●), KBR(▲) (C)の Na,K-ATPase に 1 nM~10⁶ nM の ouabain を添加し、Na,K-ATPase の ouabain 濃度依存性を測定した。

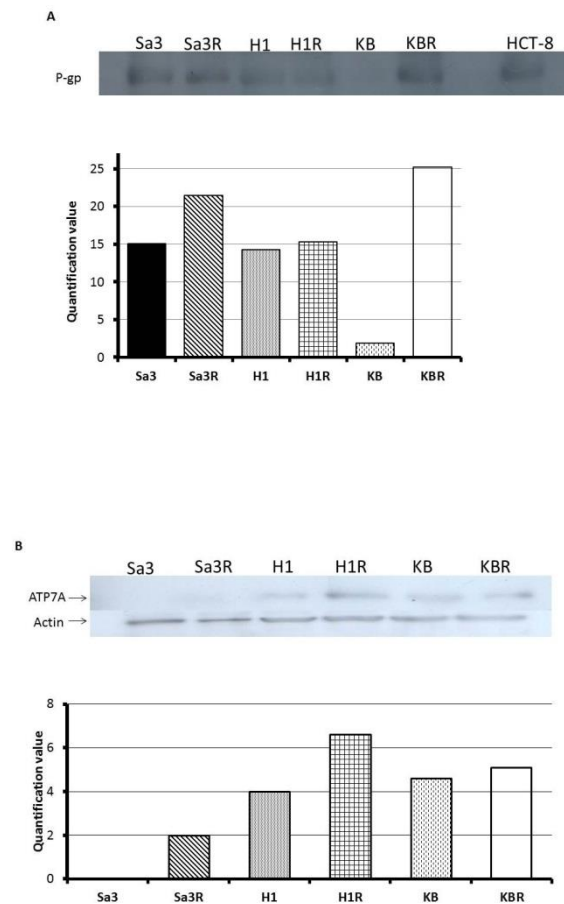


Fig.5 P-gp ならびに ATP7A の発現

Sa3, Sa3R, H1, H1R, KB, KBR 細胞を培養し、Western Blot にて P-gp (A)ならびに ATP7A (B)の発現を確認した。下段は Photoshop により Actin を基準に定量化し、比較した。なお、P-Glycoprotein 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。

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 の汲みいれ機構^{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 (Fig. 1 の A から D, Table 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 (Fig.3) とところ、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、Fig. 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 (Fig. 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 (Fig. 5 の AB)。その結果を、Na,K-ATPase 活性と比較して Table 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。また、ouabain に対する耐性化も同じ機構で考えることが可能かもしれない。

	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

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

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(Table.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 caspase3/7 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⁾が、今回得られた CDDP に耐性を示す細胞は ouabain にも耐性を示すという現象も関連する可能性がある。

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 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.
 - 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 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.

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

Suguru Hirakawa

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

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

Results : CDDP 50% inhibitory concentrations (IC_{50}) were, 7.5×10^{-4} and 1.5×10^{-4} M respectively in H1R and H1, 6.0×10^{-3} and 4.5×10^{-3} M respectively in Sa3R and Sa3, 7.0×10^{-4} and 1.0×10^{-4} M respectively in KBR and KB. CDDP sensitivity of cancer cells is lower than the normal gingival cells and induced resistant strains showed a lower sensitivity than original cells. Na, K-ATPase activity was measured. Sa3R is higher than Sa3, and H1R was higher than H1 slightly, but there was no significant difference in the KBR and KB. The results of Na, K-ATPase activity were consistent with protein expression level. Then IC_{50} of each cell in the presence of ouabain were measured and they were 80 and 60 nM in the H1R and H1, 180 and 80 nM in the Sa3R and Sa3, 130 and 40 nM in the KBR and KB, and normal gingival cells was 5 nM. These results suggest CDDP resistant cells are also resistant to ouabain. The ouabain concentration dependency of Na,K-ATPase inhibition of cells were measured. The 50% inhibitory concentration between resistant and parent lines were different in the cells tested. Therefore, there seemed no relation between the sensitivities of the cells and Na,K-ATPase activities to ouabain. It was suggested that the mechanism of the change of CDDP sensitivity were different in the cells and P-gp, Na,K-ATPase and ATP7A are related to it.

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