



Title	口腔がん細胞のシスプラチン耐性化に伴う白金系抗がん剤及び強心配糖体に対する感受性の変化〔論文内容及び審査の要旨〕
Author(s)	義達, 理恵子
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第12611号
Issue Date	2017-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/66159
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Reiko_Yoshitatsu_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 義達 理恵子

学 位 論 文 題 名

口腔がん細胞のシスプラチン耐性化に伴う白金系抗がん剤及び
強心配糖体に対する感受性の変化

シスプラチンなどの白金系抗がん剤は DNA 鎖間架橋結合を誘導して細胞分裂を阻害する。口腔がんにおいても使用されるが、がん細胞のシスプラチンに対する耐性化が治療の障害となる。シスプラチンに対する薬剤耐性機構は、細胞内蓄積機構、細胞質内解毒機構、DNA 修復機構等の多因子性であると報告されている。

近年、強心配糖体のひとつであり Na,K-ATPase の特異的阻害剤であるウアバインが、DNA 修復機構である FA/BRCA 経路に対し抑制作用を示すと報告された。また、Na,K-ATPase がシスプラチンの口腔がん細胞内への取り込みに関与し、ウアバインが Na,K-ATPase 活性を抑制するとシスプラチンの細胞内取り込み量が減少するという報告もある。ウアバインとシスプラチンの関係は、DNA 修復機構、シスプラチンの細胞内輸送機構、Na,K-ATPase 活性阻害の 3 つの面から注目される。

シスプラチン耐性化に伴う白金系抗がん剤に対する感受性の変化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、シスプラチン感受性株と耐性株に対する白金系抗がん剤の濃度と作用時間の影響を検討した。また、ウアバインは抗がん作用が報告されているだけでなく、シスプラチンの効果に大きな影響を与えることから、その併用がシスプラチン療法の改善にも寄与すると考えた。そこで、ウアバイン

の共存による、がん細胞の白金系抗がん剤に対する感受性の変化について検討した。

口腔がん細胞株(親株：H1,KB)及びシスプラチン耐性細胞株(耐性株：H1R,KBR)のシスプラチン、カルボプラチン及びネダプラチン(抗がん剤と総称)とウアバインに対する感受性の変化を検討した。細胞生存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) を用い、Wallac 1420 ARVO_{SX} マルチラベルカウンタ (PerkinElmer, Inc, MA) にて測定した。

結果を以下に示す。

1. H1 と KB、H1R と KBR はそれぞれ親株と耐性株として類似した結果を示した。

2. 親株、耐性株とも抗がん剤の濃度及び作用時間に依存して細胞数は減少した。

3. 耐性株は、低濃度の抗がん剤に対して親株と比較して耐性を示した。

4. 親株、耐性株とも 50%細胞数を減少するのに必要な抗がん剤の濃度はシスプラチン、ネダプラチン、カルボプラチンの順に増加した。

5. 親株は低濃度の抗がん剤存在下で細胞数が減少したが、さらに濃度が上がると細胞数の減少が抑制される濃度域が存在した。一方、耐性株は抗がん剤の濃度依存性に細胞数が減少するのみであった。

6. 親株及び耐性株はウアバインの濃度及び作用時間に依存して細胞数が減少した。

7. 適当な濃度の抗がん剤はウアバイン存在下での細胞数を回復させた。

これらの実験結果から、以下のように考察した。

1. シスプラチン耐性株のカルボプラチン及びネダプラチンとの交叉耐性

ウアバイン非存在下での低濃度の抗がん剤による細胞数の減少において、シスプラチン耐性株は親株に比較して高濃度の抗がん剤を必要としており、耐性化していることが示された。耐性株は親株に比較して抗がん剤に対して耐性化しており、シスプラチン耐性化に伴って交叉耐性を形成したことを示している。両細胞系の抗がん剤に対する感受性はシスプラチンに対して最大で、ネダプラチン、カルボプラチンの順であった。

2. 低濃度抗がん剤によって誘導される細胞死の中間濃度の抗がん剤による軽減効果

親株は低濃度の抗がん剤において細胞生存率が減少したが、250 μM 程度の濃度をピークに細胞数の増加が見られた。一方、耐性株は低濃度において抗がん剤に対して耐性化しているが、親株の持つ 250 μM 程度の濃度をピークに細胞数を増加させる性質を示さなかった。これらの結果は、シスプラチンをはじめとした白金系抗がん剤には異なった 2 つの作用があるとして説明が可能である。

1 つの作用は抗がん作用として従来から想定されていた、DNA 鎖間架橋結合の形成により、DNA 合成及び細胞分裂を阻害し、アポトーシスを誘導するものである。本研究で使用した耐性株は、細胞質内解毒機構、細胞内蓄積機構、DNA 修復機構などの変異によりシスプラチン耐性を獲得したものと推測される。

一方、シスプラチンはタンパク質の 2 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いう報告が最近された。もし 250 μM 程度のシスプラチンが DNA 損傷とは別な機構によって細胞死を抑制する作用を示すことがあれば、親株の示す細胞増殖効果の説明が可能となる。また、耐性株は低濃度での細胞死に対する耐性を獲得したが、250 μM 程度の細胞死を抑制する作用を失ったとして説明することが可能である。

シスプラチンの臨床使用における最大血中濃度は 13.3 μM 程度であり、今回の研究における親株の細胞数が減少する濃度に近いが、親株の細胞数が増加する中間濃度は血中濃度よりかなり高い。実際にシスプラチンが作用するがん細胞周囲の濃度は血中濃度よりかなり高い可能性があると推測される。

3. 抗がん剤とウアバインの相互作用

強心配糖体であるウアバインは Na,K-ATPase の特異的阻害剤である。ウアバインは濃度および作用時間に依存して全ての細胞生存率を低下させた。また、シスプラチン耐性株はウアバインに対しても耐性傾向を示した。ウアバインとその類似物質は生体内にも存在してステロイドホルモン類似作用を示すこと、核において遺伝子転写調節物質として機能することにより生体機能の調節に関与することも明らかになりつつある。また、ウアバインの抗がん作用も報告されている。そこで、本研究においてウアバインと白金系抗がん剤の相互作用、シスプラチン感受性株と耐性株に対する作用の違いなどを明らかにすることを試みた。

その結果、使用した抗がん剤はいずれもウアバインによる細胞生存率の抑制を軽減する作用を示した。白金系抗がん剤はウアバインと共通して Na,K-ATPase 活性の抑制作用を示し、また、遺伝子の転写調節に影響すること

から、白金系抗がん剤とウアバインの相互作用が生じた可能性がある。また、ウアバインが共存することによりシスプラチン耐性株及び感受性株の白金系抗がん剤に対する感受性の変化が観察されたことも、ウアバインと白金系抗がん剤の相互作用による効果の可能性がある。相互作用が明らかにされると、ウアバインとの併用による白金系抗がん剤の臨床的な応用に大きく貢献する可能性があると考えられる。

口腔がん細胞を用いてシスプラチン耐性化に伴う白金系抗がん剤及びウアバインに対する感受性の変化を検討し、以下の結論を得た。H1 及び KB のシスプラチン耐性化によりカルボプラチン及びネダプラチンに対する交叉耐性を示す。白金系抗がん剤には細胞生存率低下以外の作用があり、親株ではその作用を受けるが耐性株では失っている。また、ウアバインと白金系抗がん剤は相互作用し、シスプラチン耐性化に伴い白金系抗がん剤及びウアバインの作用が変化する。