



HOKKAIDO UNIVERSITY

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
Author(s)	義達, 理恵子; 鈴木, 邦明; 吉村, 善隆 他
Citation	北海道歯学雑誌, 43, 19-28
Issue Date	2022-09-15
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/86832
Type	journal article
File Information	43_04.pdf



原 著

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

義達理恵子¹⁾ 鈴木 邦明²⁾ 吉村 善隆²⁾ 南川 元²⁾ 鄭 漢忠¹⁾

抄 録 :

【目的】白金系抗がん剤による化学療法において耐性化が障害となるが、その機序には不明な点も多い。そこで耐性化の機構の検討を目的に、シスプラチン耐性化に伴う白金系抗がん剤及び抗がん活性を示す強心配糖体のウアバインに対する感受性の変化を検討した。

【材料と方法】口腔がん細胞株（親株：H1, KB）及びそれらのシスプラチン耐性株（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。

【結果と考察】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の減少を保護した。以上の結果は、口腔がん細胞及びそのシスプラチン耐性株に対する白金系抗がん剤の作用はその濃度によって異なることと、シスプラチン耐性化に伴いウアバインの作用も変化することを示唆する。

【結論】口腔がん細胞株である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。また、耐性化に伴い、白金系抗がん剤及び強心配糖体の作用が変化する。

キーワード：口腔がん細胞、シスプラチン耐性、白金系抗がん剤、Na,K-ATPase、ウアバイン

緒 言

シスプラチンをはじめとした白金系抗がん剤は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)}。白金系抗がん剤は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³⁻⁷⁾、細胞質内解毒機構⁸⁻¹¹⁾、DNA修復機構¹²⁾等の多因子性であると報告されている。DNA修復機構は、シスプラチン等の抗がん剤によりDNA鎖間架橋結合が誘導されDNA複製が抑制されたがん細胞において、DNA修復

タンパク質が活性化され、抗がん剤に対して耐性を示す機構である。

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¹³⁾。DNA修復機構の抑制は、抗がん剤への耐性を減弱することによって抗がん剤の細胞毒性効果を高め、細胞死を誘導すると考えられている。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⁶⁾。さらに、シスプラチンによるがん治療の障害としては、副作用の存在も重要である。重篤なものに腎障害があげられる。シスプラチン

¹⁾ 〒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）

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 教授）

がNa,K-ATPase活性を阻害することによるNa,K-ATPaseの機能阻害が報告^{1, 2, 14, 15)}されており、腎障害は腎臓に豊富に存在するNa,K-ATPaseのシスプラチンによる阻害が原因ではないかと推測されている。一方、腎毒性の低いカルボプラチンやオクサリプラチンはNa,K-ATPaseを阻害しないという報告もあり¹⁾、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。

今回実験に使用した細胞は口腔癌細胞であるH1及びKB細胞と、それらにシスプラチン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であるH1R及びKBR細胞^{16, 17)}である。マイクロアレイ解析によりH1細胞と比較してH1R細胞では12の遺伝子のmRNA発現が高いことが示された¹⁶⁾。これらのなかで多剤耐性遺伝子と関係のあるATP-binding cassette transporter (ABCトランスポーター) 遺伝子であるMDR1, MRP1, MRP2, 及びCD55, PKG1の発現の増加と、Caveolin1の発現減少が、逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) またはリアルタイムPCRにより確認された。またKBR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ている¹⁷⁾。しかし、シスプラチン耐性化に伴う他の白金系抗がん剤及びウアバインに対する感受性の変化に関する報告は見られない。

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。

材料と方法

1. 細胞の培養と回収

口腔癌細胞であるH1及びKB細胞と、それぞれにシスプラチン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であるH1R及びKBR細胞は、千葉大学の丹沢秀樹教授から分与された。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%CO₂-95%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

ウアバイン (Sigma, UK), シスプラチン (Sigma, USA),

カルボプラチン及びネダプラチン (和光純薬) を購入した。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シスプラチン、カルボプラチン及びネダプラチンの濃度と作用時間依存性

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 μ Mのシスプラチン、カルボプラチン及びネダプラチン存在下で培養し、6, 12, 24, 48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) を使い、Wallac 1420 ARVO_{SX} マルチラベルカウンタ (PerkinElmer, Inc, MA) にて測定した。シスプラチン、カルボプラチン及びネダプラチン非存在下の測定値をコントロール (100%) とした。

4. シスプラチン、カルボプラチン及びネダプラチン濃度と作用時間に依存した細胞生存に対するウアバインの影響

シスプラチン、カルボプラチン及びネダプラチン濃度と作用時間に依存した細胞生存率に対するウアバインの影響を調べるために、0.01 μ Mのウアバイン存在下でH1とH1R細胞を使用して上記の3と同様の測定を行った。

5. 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。

結 果

1-1. H1及びH1R細胞生存のシスプラチン濃度及び作用時間依存性

H1及びH1R細胞生存のシスプラチン濃度及び作用時間依存性をFig. 1a及びFig. 1bに、72時間作用H1及びH1R細胞のシスプラチン濃度依存性をFig. 1cに示す。H1細胞は6時間の作用ではシスプラチン濃度に依存した顕著な細胞数の減少は観察されなかった (Fig. 1a)。しかし、12及び24時間では62.5 μ Mまでのシスプラチン濃度に依存した細胞数の減少が認められ、48及び72時間では7.8 μ Mのシスプラチンでコントロールの26.5及び17.8%まで減少した。また、12, 24, 48時間の作用では250 μ Mのシスプラチンを最大とする細胞数減少の軽減がみられた。一方、H1R細胞は、6及び12時間では31.2 μ M以上、24, 48, 72時間では7.8 μ M以上で、シスプラチン濃度に依存して細胞数は減少した (Fig. 1b)。低濃度シスプラチンでの細胞数の減少にはH1細胞に比較してH1R細胞ではより高濃度のシスプラチンを必要とし (Fig. 1c), H1及びH1R細胞に対する低濃度シスプラチンでの50%細胞生存率抑制濃度 (IC₅₀) はH1R細胞のほうが2倍以上大きかった (表1)。またH1細胞で認めら

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

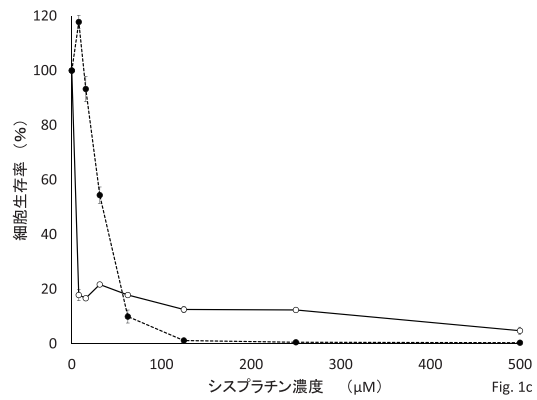
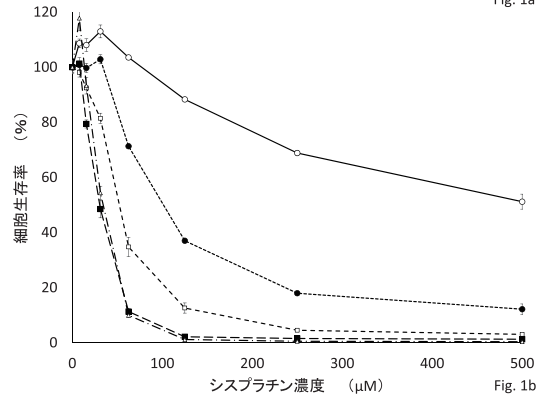
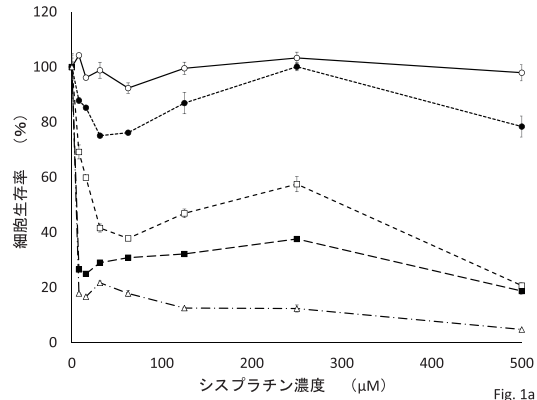


Fig. 1 H1及びH1R細胞生存のシスプラチン濃度及び作用時間依存性

H1 (a) 及びH1R (b) 細胞をシスプラチン存在下で培養し、6 (○), 12 (●), 24 (□), 48 (■) 及び72 (△) 時間後に、生存細胞率を測定するためにViaLight™ plus kit (LONZA) を用いて細胞内ATP量を測定した。また、72時間作用H1 (○) 及びH1R (●) 細胞のシスプラチン濃度依存性をFig. 1cに示した。各時間でのシスプラチン非存在下の測定値を100%とした。

培養時間(hour)	H1 (μ M)	H1R (μ M)	KB (μ M)	KBR (μ M)
6	—	—	—	—
12	—	82	—	93.9
24	22.1	57.3	29.1	52.8
48	<7.8	27.6	<7.8	28.4
72	<7.8	26.7	<7.8	23.5

表1 シスプラチンによるH1及びH1R, KB及びKBRのIC₅₀
シスプラチンによる各細胞の50%細胞生存率抑制濃度 (IC₅₀) を Hill plotを用いて算出した。

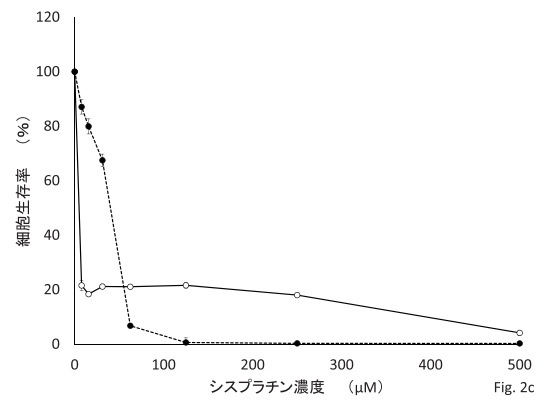
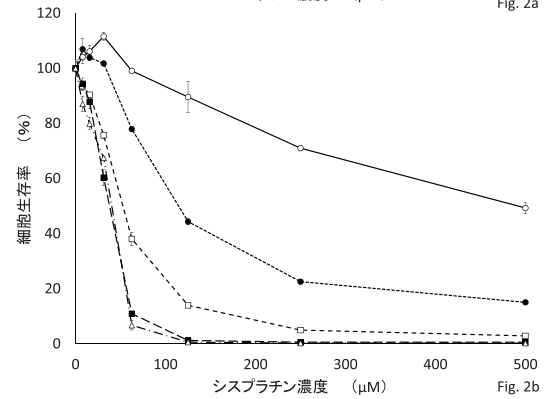
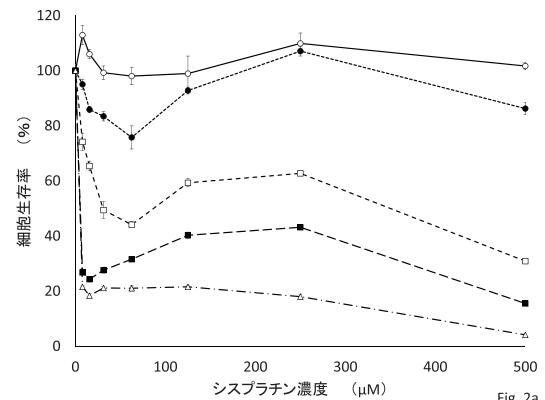


Fig. 2 KB及びKBR細胞生存のシスプラチン濃度及び作用時間依存性

KB (a) 及びKBR (b) 細胞をシスプラチン存在下で培養し、Fig. 1と同様に行った。培養時間は6 (○), 12 (●), 24 (□), 48 (■) 及び72 (△) 時間である。また、72時間作用KB (○) 及びKBR (●) 細胞のシスプラチン濃度依存性をFig. 2cに示した。各時間でのシスプラチン非存在下の測定値を100%とした。

れた250 μM程度での細胞数減少の軽減効果はH1R細胞では観察されなかった。

1-2. KB及びKBR細胞生存のシスプラチン濃度及び作用時間依存性

KB及びKBR細胞を用いて、H1及びH1R細胞と同様に細胞生存のシスプラチン濃度及び作用時間依存性を測定した結果をFig. 2a及びFig. 2bに、72時間作用KB及びKBR細胞のシスプラチン濃度依存性をFig. 2cに示す。KB細胞はH1細胞と同様の、またKBR細胞はH1R細胞と同様の結果を

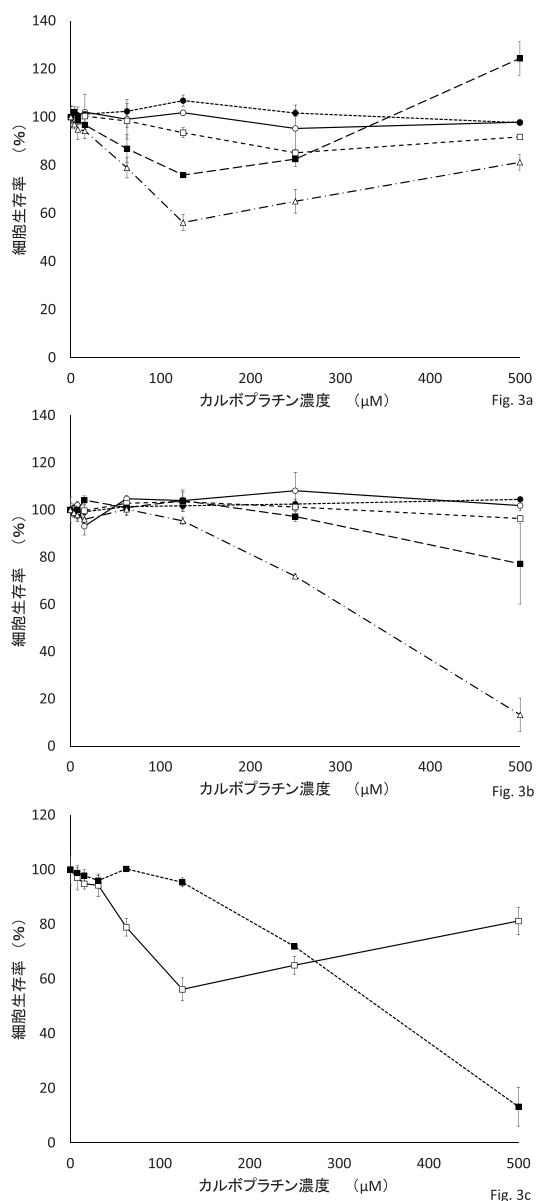


Fig. 3 H1及びH1R細胞生存のカルボプラチン濃度及び作用時間依存性

H1 (a) 及びH1R (b) 細胞をカルボプラチン存在下で培養し、Fig. 1と同様に行った。培養時間は6 (○)、12 (●)、24 (□)、48 (■) 及び72 (△) 時間である。また、72時間作用H1 (○) 及びH1R (●) 細胞のカルボプラチン濃度依存性をFig. 3cに示した。各時間でのカルボプラチン非存在下の測定値を100%とした。

示した。低濃度シスプラチンでの細胞数の減少にはKB細胞に比較してKBR細胞ではより高濃度のシスプラチンが必要とし (Fig. 2c)、KB及びKBR細胞に対する低濃度シスプラチンでの IC_{50} 値はKBR細胞のほうが2倍程度以上大きかった (表1)。

2. H1及びH1R細胞と、KB及びKBR細胞生存のカルボプラチン濃度及び作用時間依存性

H1及びH1R細胞生存のカルボプラチン濃度及び作用時間依存性をFig. 3a及びFig. 3bに、72時間作用H1及びH1R

細胞のカルボプラチン濃度依存性をFig. 3cに示す。H1細胞は6及び12時間ではカルボプラチン濃度に依存した細胞数の顕著な減少は観察されなかった (Fig. 3a)。しかし、24時間では250 μ Mまで、48及び72時間では125 μ Mまでカルボプラチンの濃度に依存した細胞数の減少が認められたが、より高濃度では生存細胞数の増加が認められた。48時間の作用時間で500 μ Mのカルボプラチンを作用させると細胞生存率はコントロールの124.3%まで増加した。一方、H1R細胞では、6、12及び24時間でのカルボプラチン濃度に依存した細胞数の顕著な変化は観察されなかったが、48時間以上ではカルボプラチン濃度に依存して細胞数は減少した (Fig. 3b)。また、H1細胞で見られた高濃度カルボプラチンでの生存細胞数の増加は認められなかった。低濃度カルボプラチンでの細胞数の減少にはH1細胞に比較してH1R細胞ではより高濃度のカルボプラチンを必要とした (Fig. 3c)。H1及びH1R細胞とも48時間までの作用時間では IC_{50} 値は得られなかったが、24、48および72時間では、H1細胞数がH1R細胞と比較してより低濃度のカルボプラチンで減少した (Fig. 3a,b)。

KB及びKBR細胞を用いて、細胞生存のカルボプラチン濃度及び作用時間依存性を測定したところ、H1及びH1R細胞と同様の結果を得た (結果は示さない)。

3. H1及びH1R細胞と、KB及びKBR細胞生存のネダプラチン濃度及び作用時間依存性

H1及びH1R細胞生存のネダプラチン濃度及び作用時間依存性をFig. 4a及びFig. 4bに、72時間作用H1及びH1R細胞のネダプラチン濃度依存性をFig. 4cに示す。H1細胞は6時間の作用ではネダプラチン濃度に依存した細胞数の減少を示し、12時間では、低濃度のネダプラチンで細胞数が増加したのち、より高濃度では減少した (Fig. 4a)。24時間では250 μ Mまで細胞数が減少したのち、500 μ Mまではほぼ一定であった。48及び72時間では31.2 μ Mまで細胞数が減少したが、さらに濃度が高いと細胞数の増加が認められた。一方、H1Rでは、6及び12時間ではH1細胞と類似した結果を示したが、24、48及び72時間作用では、ネダプラチン濃度に依存した細胞数の減少が見られ、H1細胞のような高濃度ネダプラチンでの細胞数の増加は観察されなかった (Fig. 4b)。低濃度ネダプラチンでの細胞数の減少にはH1細胞に比較してH1R細胞ではより高濃度のネダプラチンが必要とした (Fig. 4c)。H1及びH1R細胞とも12時間までの作用時間では IC_{50} 値は得られなかったが、24時間以上では、H1細胞と比較してH1R細胞で大きな IC_{50} 値を示した (表2)。

KB及びKBR細胞を用いて、細胞生存のネダプラチン濃度及び作用時間依存性を測定したところ、H1及びH1R細胞と同様の結果を得た (結果は示さない)。

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

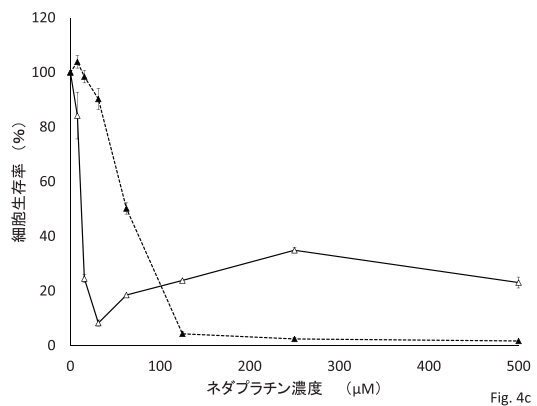
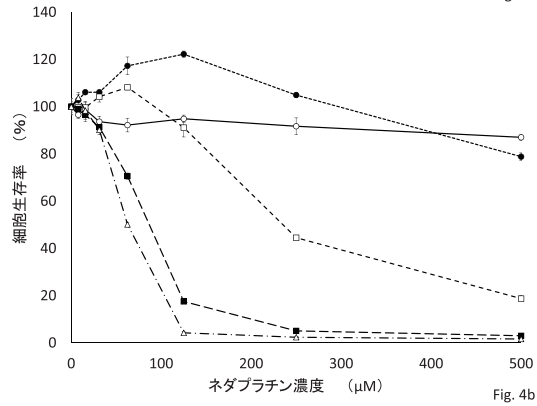
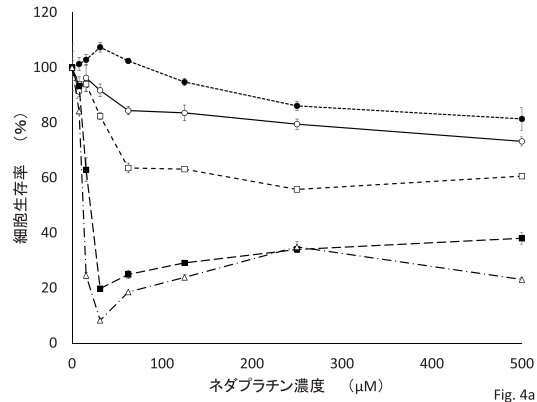


Fig. 4 H1及びH1R細胞生存のネダプラチン濃度及び作用時間依存性
H1 (a) 及び (b) 細胞をネダプラチン存在下で培養し、Fig. 1と同様に行った。培養時間は6 (○), 12 (●), 24 (□), 48 (■) 及び72 (△) 時間である。また、72時間作用H1 (○) 及びH1R (●) 細胞のネダプラチン濃度依存性をFig. 4cに示した。各時間でのネダプラチン非存在下の測定値を100%とした。

培養時間 (hour)	H1 (μM)	H1R (μM)	KB (μM)	KBR (μM)
6	—	—	—	—
12	—	—	—	—
24	—	217.6	—	277.1
48	19.1	78	19.2	90.2
72	12.6	55.8	11.2	69.1

表2 ネダプラチンによるH1及びH1R, KB及びKBRのIC₅₀
ネダプラチンによる各細胞のIC₅₀をHill plotを用いて算出した。

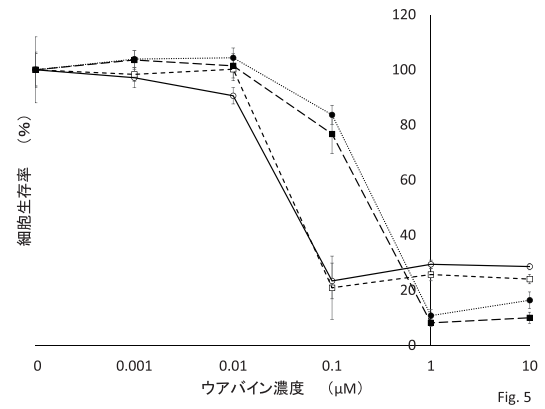


Fig. 5 72時間作用後H1及びH1R細胞, KB及びKBR細胞生存のウアバイン濃度依存性

H1 (○) 及びH1R (●), KB (□) 及びKBR細胞 (■) を、ウアバイン存在下で培養し、72時間後に細胞内ATP量を測定した。ウアバイン非存在下の測定値を100%とした。

4. H1, H1R, KB及びKBR細胞生存のウアバイン濃度依存性

72時間作用後のH1, H1R, KB及びKBR細胞生存のウアバイン濃度依存性をFig. 5に示す。いずれの細胞の生存率も0.01 μM以上のウアバイン濃度に依存して低下したが、親株であるH1及びKB細胞と比較して、耐性株であるH1R及びKBR細胞の生存率の低下には、より高濃度のウアバインを必要とした。

5. ウアバイン存在下でのH1及びH1R細胞生存のシスプラチン濃度及び作用時間依存性

H1及びH1R細胞生存のシスプラチン濃度及び作用時間依存性に対するウアバインの作用について検討することを目的に、Fig. 1a及びFig. 1bと同様の実験を0.01 μMウアバイン存在下で行った (Fig. 6a及びFig. 6b)。シスプラチン非存在下では、H1及びH1R細胞とも、0.01 μMウアバイン存在下での作用時間に依存して細胞数は減少した。H1細胞の結果 (Fig. 6a) はFig. 1aとは大きく異なった。H1細胞の24, 48, 72時間では、シスプラチンの濃度依存性にウアバイン存在下で減少した細胞数の回復が見られた。回復の程度は作用時間が長いほど低下した。また、シスプラチンの濃度が500 μMに近づくと細胞数は減少した (Fig. 6a)。一方、H1R細胞ではウアバイン存在下での細胞数の減少が回復することとはなく、シスプラチン濃度と作用時間に依存して細胞数は減少した (Fig. 6b)。KB及びKBR細胞を用いても、H1及びH1R細胞と同様の結果を得た (結果は示さない)。

6. ウアバイン存在下でのH1及びH1R細胞生存のカルボプラチン濃度及び作用時間依存性

Fig. 6a及び6bで示した実験と同様の実験をカルボプラチン存在下で行った。H1細胞では、ウアバイン存在下で減

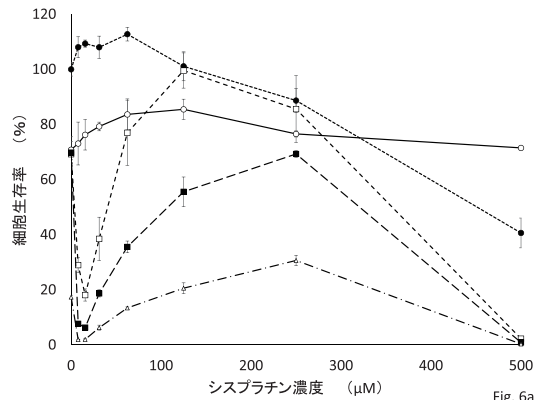


Fig. 6a

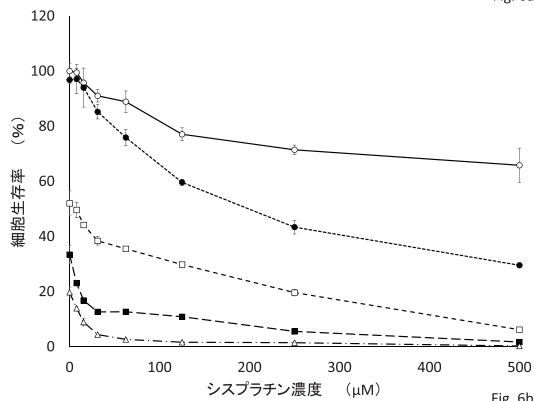


Fig. 6b

Fig. 6 ウアバイン存在下でのH1及びH1R細胞生存のシスプラチン濃度及び作用時間依存性

0.01 μM のウアバイン存在下で、H1 (a) 及びH1R (b) 細胞をシスプラチン存在下で培養し、6 (○), 12 (●), 24 (□), 48 (■) 及び72 (Δ) 時間後に、生存細胞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。12時間 (a), 6時間 (b) 作用させたシスプラチン非存在下の測定値を100%とした。

少しした細胞数は作用時間にかかわらず7.8, 15.6及び31.2 μM のカルボプラチン存在下で回復した。しかし、カルボプラチンの濃度が上がると細胞数は減少し、細胞数の減少は作用時間が長いほど大きかった (Fig. 7a)。得られた結果はFig. 3aの結果とは大きく異なった。一方、H1R細胞でも、ウアバイン存在下で減少した細胞数は作用時間にかかわらず7.8, 15.6, 31.2及び62.5 μM のカルボプラチン存在下で回復した。しかし、H1細胞では125 μM 以上のカルボプラチン存在下の作用時間に依存した顕著な細胞数の減少が観察されたのに対して、H1R細胞ではより高濃度のカルボプラチンを必要とした (Fig. 7b)。高濃度のカルボプラチン濃度依存性は、Fig. 3bの結果と類似していた。KB及びKBR細胞を用いても、H1及びH1R細胞と同様の結果を得た (結果は示さない)。

7. ウアバイン存在下でのH1及びH1R細胞生存のネダプラチン濃度及び作用時間依存性

Fig. 6a及び6b で示した実験と同様の実験をネダプラチン存在下で行った。H1細胞では、ウアバイン存在下で減少

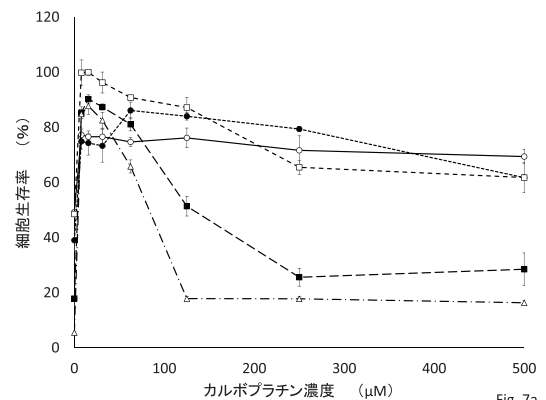


Fig. 7a

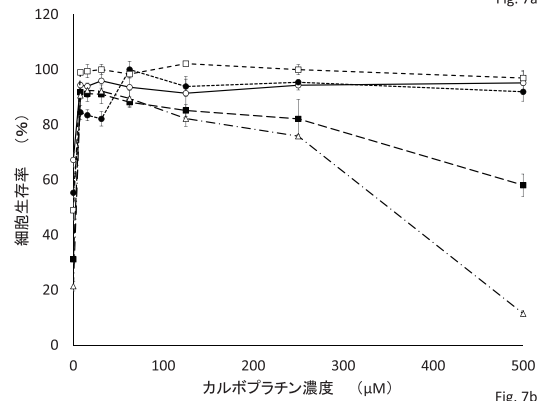


Fig. 7b

Fig. 7 ウアバイン存在下でのH1及びH1R細胞生存のカルボプラチン濃度及び作用時間依存性

0.01 μM のウアバイン存在下で、H1 (a) 及びH1R (b) 細胞をカルボプラチン存在下で培養し、Fig. 8と同様に行った。培養時間は6 (○), 12 (●), 24 (□), 48 (■) 及び72 (Δ) 時間である。24時間作用させたカルボプラチン15.6 μM (a), 31.2 μM (b) での測定値を100%とした。

した細胞数は作用時間にかかわらず7.8 μM のネダプラチン存在下で回復した。しかし、ネダプラチンの濃度が上がると濃度依存的に細胞数は減少し、細胞数の減少は作用時間が長いほど大きかった (Fig. 8a)。高濃度のネダプラチンで得られた結果はFig. 4aの結果と比較的類似していた。一方、H1R細胞でも、ウアバイン存在下で減少した細胞数は培養時間にかかわらず7.8及び15.6 μM のネダプラチン存在下で回復したが、125 μM 以上のネダプラチン存在下では作用時間に依存した細胞数の減少が観察された (Fig. 8b)。高濃度のネダプラチンで得られた結果はFig. 4bの結果と比較的類似していた。KB及びKBR細胞を用いても、H1及びH1R細胞と同様の結果を得た (結果は示さない)。

考 察

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 (H1RとKBR) は親

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

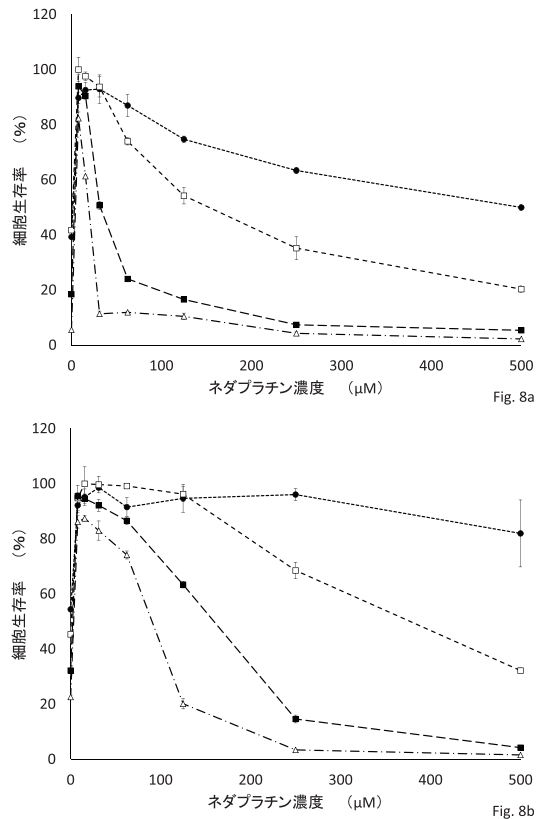


Fig. 8 ウアバイン存在下でのH1及びH1R細胞生存のネダプラチン濃度及び作用時間依存性

0.01 μM のウアバイン存在下で、H1 (a) 及び (b) 細胞をネダプラチン存在下で培養し、12 (●), 24 (□), 48 (■) 及び72 (△) 時間後に、生存細胞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。24時間作用させたネダプラチン7.8 μM (a), 15.6 μM (b) での測定値を100%とした。

株 (H1とKB) に比較して高濃度の抗がん剤を必要としており (Figs. 1-4a,b), 耐性化していることが示された。比較のために各図 (Figs. 1-4a,b) からH1とH1R細胞の72時間作用細胞の結果をFigs. 1-4cに示した。耐性株は親株と比較してシスプラチン、カルボプラチン及びネダプラチン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。シスプラチンに対する IC_{50} 値はH1とKBでは7.8 μM 以下、H1Rでは27 μM , KBRでは24 μM であり、耐性化に伴う IC_{50} 値の増加はこれらの耐性株を作成した論文の報告^{16, 17)} とほぼ一致している。シスプラチン、カルボプラチン及びネダプラチンは化学構造の $\text{Pt}-(\text{NH}_3)_2$ 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。同じ白金系抗がん剤であってもオキサリプラチンは NH_3 の構造が変化しているため、シスプラチン耐性株がオキサリプラチンにも耐性化しているのか興味をもたれる。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。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も見られるが、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、また副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。

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

シスプラチンあるいはネダプラチンではH1及びKB細胞とも低濃度の抗がん剤では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。また、カルボプラチンも同様の傾向を示した (Figs. 1a ~ 4a)。一方、H1R及びKBR細胞は低濃度では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 (Figs. 1 ~ 4b,c)。シスプラチン耐性株を作成した論文の報告^{16, 17)} においては、低濃度のシスプラチンの影響のみの検討であったため本論文で明らかになった現象に関しては報告がない。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つの作用は抗癌作用として従来から想定されていた、DNAのグアニン、アデニンのN-7位に結合し、DNA鎖間架橋結合を形成することにより、DNA合成及び細胞分裂を阻害し、アポトーシスを誘導して抗がん作用を示すものである²⁾。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³⁻¹²⁾。

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¹⁴⁾。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、シスプラチン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が、今後の研究が必要である。

低濃度のネダプラチン (Figs. 4a,b) 及び高濃度カルボプラチン (Fig. 3a) による細胞増殖促進効果も含めて、本研究で明らかにされた現象の一部に関しては、今まで報告が見られない。シスプラチンは様々な悪性腫瘍に対する化学療法において広く使用されているが、これらの機構の更なる解明ががん治療の発展につながる可能性がある。

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。心筋細胞においては、軽度Na,K-ATPaseを抑制することにより細胞内にNa⁺が蓄積した結果、Na⁺/Ca²⁺交換輸送体が活性化されて細胞内Ca²⁺濃度を高め、心筋の収縮力が増大する¹⁸⁾。一方、Na,K-ATPaseはほぼ全身の細胞に存在し、細胞内外のイオン濃度勾配や電位差勾配の維持、細胞体積の維持など基本的な細胞の機能を担う酵素であるため、Na,K-ATPase活性の抑制は生体に対する影響が大きく、強心配糖体の安全域が狭い理由ともなる。本研究においても、ウアバインは濃度および作用時間に依存してH1、H1R、KB及びKBR細胞生存率を低下させた(Figs. 5, 6 ~ 8a,b)。この際、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ことが注目される(Fig. 5)。ウアバインと白金系抗がん剤の関係では、Na,K-ATPaseがシスプラチンの細胞内取り込みに関与し、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がある⁶⁾。

比較的最近、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^{13, 18)}。したがって、ウアバインとシスプラチン等を併用することにより、化学療法や放射線療法に対する感受性を高めること、抗がん剤の使用量を減少させることなどが期待されるが、基礎的な研究はまだ始まったところである。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、シスプラチン、カルボプラチン及びネダプラチン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(Figs. 6 ~ 8)。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(Figs. 6 ~ 8)、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はある。しかし、ウアバインによる細胞死を軽減する際の濃度や、より高濃度での細胞生存に対する作用は抗がん剤の種類と濃度、親株と耐性株の種類によって異なった。これらは、ウアバインと各抗がん剤及びシスプラチン耐性株と感受性株の種々の相互作用によって決定されると推測されるが、現時点ではそれらに対するデータを保持していない。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。

結 論

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。

参 考 文 献

- 1) Huliciak M, Vacek J, Sebel M, Orolinova E, Znaleznia 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 Chemother Pharmacol* 22 : 325-332, 1988.
- 4) Hospers GA, Mulder NH, De Vries EG: Mechanisms of cellular resistance to cisplatin. *Med Oncol Tumor Pharmacother* 5 : 145-151, 1988.
- 5) Kelley SL, Rozencweig M: Resistance to platinum compounds: mechanisms and beyond. *Eur j Cancer Clin Oncol* 25 : 1135-1140, 1989.
- 6) 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.
- 7) Schneider V, Krieger ML, Bendas G, Jaehde U, Kalayda GV: Contribution of intracellular ATP to cisplatin resistance of tumor cells. *J Biol Inorg Chem* 18 : 165-174, 2013.
- 8) Andrews PA, Murphy MP, Howell SB: Metallothionein-mediated cisplatin resistance in human ovarian carcinoma cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 19 : 149-154, 1987.
- 9) 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.
- 10) 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 ; discussion 121-122, 1990.
 - 11) 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.
 - 12) Eastman A, Schulte N: Enhanced DNA repair as a mechanism of resistance to cis-diamminedichloroplatinum(II). *Biochemistry* 27:4730-4734, 1988.
 - 13) Jun DW, Hwang M, Kim HJ, Hwang SK, Kim S, Lee CH: Ouabain, a cardiac glycoside, inhibits the Fanconi anemia/BRCA pathway activated by DNA interstrand cross-linking agents. *PLoS One* 8 : e75905, 2013.
 - 14) 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 : 84-90, 2006.
 - 15) Kubala M, Geleticova J, Huliciak M, Zatloukalova M, Vacek J, Sebel M: Na(+)/K(+)-ATPase inhibition by cisplatin and consequences for cisplatin nephrotoxicity. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 158 : 194-200, 2014.
 - 16) 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.
 - 17) 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.
 - 18) Kulikov AV, Slobodkina EA, Alekseev AV, Gogvadze V, Zhivotovsky B: Contrasting effects of cardiac glycosides on cisplatin- and etoposide-induced cell death. *Biol Chem* 397 : 661-670, 2016.

ORIGINAL

Sensitivity changes to platinum coordination complex and cardiac glycosides in cisplatin-resistant oral cancer cells

Rieko Yoshitatsu¹⁾, Kuniaki Suzuki²⁾, Yoshitaka Yoshimura²⁾
Hajime Minamikawa²⁾ and Kanchu Tei¹⁾

ABSTRACT :

Purpose: Cancer chemotherapy using platinum-based anticancer agents is inhibited by cancer cell cisplatin resistance, but the mechanism is unknown. Hence, we examined how cisplatin-resistant oral cancer cells changed their sensitivity to platinum coordination complex and cardiac glycosides.

Materials and methods: We used oral cancer cells (parent cell line: H1, KB) and cisplatin-resistant lines (resistant cell line: H1R, KBR). The cells were dispersed in a 96-wells plate and incubated with 8, 16, 31, 63, 125, 250, and 500 μ M cisplatin, carboplatin, or nedaplatin (anticancer agent) for 6, 12, 24, 48, and 72 h in the absence or presence of ouabain. The survival rate of the cells was measured by intracellular adenosine triphosphate content using ViaLigh plus kit (LONZA).

Results and discussion:

1. In all experimental conditions, H1 and KB, H1R, and KBR showed similar results as parent or resistant cell lines.
2. The viable cell count of a parent or resistant cells decreased in a concentration and time-dependent manner in response to the anticancer agent.
3. When compared to the parent cell line, the resistant cell line showed resistance to not only cisplatin but also carboplatin and nedaplatin.
4. In parent and resistant cell lines, the 50% inhibitory concentrations of the anticancer agent ranged from low to high in the order of cisplatin, nedaplatin, and carboplatin.
5. In the presence of a low concentration anticancer agent, the number of parent cells was reduced, but it was protected at higher concentrations. On the other hand, there was no such concentration range for anticancer agent-resistant cell lines.
6. The viable cell count of a parent or resistant cells decreased in a concentration and time-dependent manner in response to ouabain.
7. In presence of ouabain, there was a concentration range of anticancer agents that protected against a decrease in the number of cells. This effect occurred only in the parent cell line incubated with cisplatin, but not in the parent or resistant cell line incubated with carboplatin or nedaplatin.

Conclusion: Cisplatin resistance in the oral cancer cell lines H1 and KB showed cross-resistance to carboplatin and nedaplatin. The effect of the platinum coordination complex and cardiac glycosides changed as they became cisplatin-resistant.

Key Words : oral cancer cells, cisplatin resistance, platinum coordination complex, Na, K-ATPase, ouabain

¹⁾ Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Division of Oral Pathobiological Science, Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University, North 13, West 7, Kita-ku, Sapporo 060-8586, Japan.

Director : Prof. Kanchu Tei. (Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Hokkaido University, Graduate School of Dental Medicine)

²⁾ Department of Molecular Cell Pharmacology, Division of Oral Pathobiological Science, Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University, North 13, West 7, Kita-ku, Sapporo 060-8586, Japan.

Director : Prof. Kuniaki Suzuki. (Department of Molecular Cell Pharmacology, Hokkaido University, Graduate School of Dental Medicine)