

学 位 論 文 題 名

Cis - diamminedichloroplatinum(Ⅱ)(CDDP)耐性

ヒト肺扁平上皮癌細胞株の樹立とその特性

学位論文内容の要旨

緒 言

CDDPはその高い奏功率の故、様々な悪性腫瘍に対して用いられているが、しばしばCDDP耐性癌細胞の出現によりその有効性が失われる。従って、CDDPを基礎とした化学療法の実績向上のためにはCDDP耐性機序の解明が不可欠である。

今までCDDP耐性機序として、細胞内CDDP蓄積量低下、グルタチオンやその関連酵素およびメタロチオネインの発現上昇、さらにDNA修復の亢進などが見出されているが、まだ解明されていない因子もあると考えられる。今回、筆者はヒト肺扁平上皮癌細胞株からCDDP耐性株を作成し、その特性と耐性機構を検索した。

方 法

細胞株：ヒト肺扁平上皮癌細胞株PC10は、10%FCS加RPMI-1640培地で継代した。

増殖曲線、細胞径およびDNAインデックス：細胞を $2 \times 10^4/\text{ml}$ で24穴に移し、7～8日間、24時間毎に細胞数を算定して増殖曲線を作成した。細胞径およびDNAインデックスはFACScan flow cytometerを用いて解析し、ヒト正常リンパ球の細胞径およびDNA量との比で表した。

CDDP耐性株の樹立：PC10のCDDP耐性株は、段階的に濃度を上げる方法により作成された。即ち、CDDPの最初の濃度を $0.1 \mu\text{g/ml}$ とし、CDDPの間歇投与により数継代毎に濃度を $0.1 \mu\text{g/ml}$ ずつ上げて約6カ月間で $1.5 \mu\text{g/ml}$ まで達した。次に、 $0.5 \mu\text{g/ml}$ 、 $1.0 \mu\text{g/ml}$ のCDDPをそれぞれ約3カ月間連続接触させると、 $0.5 \mu\text{g/ml}$ 下の細胞集団PC10/0.5sのみ安定に増殖し、そこから段階希釈法によりCDDP耐性サブクローンPC10-B3が得られた。一方、不安定だった $1.0 \mu\text{g/ml}$ 下の細胞からも同様の方法によりサブクローンPC10-E5が得られた。

MTT アッセイ：細胞を96穴に、アッセイ時に至適な細胞数となるように播種し、翌日各濃度の薬剤を加えた。4日後MTT溶液を加え、生細胞によって還元されるformazanの量をELISAリーダーで測定した。

細胞内プラチナ蓄積量：Hitachi Model Z-8000 polarized Zeeman atomic absorption spectrometer を用いて原子吸光法により測定した。

2次元電気泳動法：各細胞から9.2M urea, 2%NP-40で可溶化して全タンパク質を抽出した。タンパク質 $100 \mu\text{g/ml}$ に対し10%polyacrylamide, 2%ampholytesにより1次元目の等電点電気泳動を $6000\text{V}\cdot\text{hr}$ で、2次元目の電気泳動を10%polyacrylamideにより $540\text{V}\cdot\text{hr}$ で行った。泳動後、銀染色を行いタンパク質スポットを検出した。

ペプチドマッピング：2次元電気泳動後、タンパク質をPVDF膜に転写しクマシーブルーで染色した。40枚のPVDF膜から目的のタンパク質を切り出し、トリブシンで 37°C , 18hr 反応させて消化した。消化後のタンパク質を逆相HPLCに添加し、回収したペプチド断片のアミノ酸配列をプロテインシーケンサーで決定した後、ホモロジー検索を行い目的のタンパク質を解析した。

結 果

増殖曲線、細胞径およびDNAインデックス： $0.5 \mu\text{g/ml}$ CDDP 存在下で

PC10-B3 はわずかに増殖が阻害されたが、PC10-B3 は殆ど増殖不能だった。PC10とPC10-B3 の倍加時間はそれぞれ23.5hr, 33.0hrであり、PC10-B3 で有意に延長していた。また、PC10-B3 はPC10に比べ DNAインデックスは低下(PC10 — 2.15, PC10-B3 — 1.93)、細胞径は増加(PC10 — 1.98, PC10-B3 — 2.57)していた。

耐性度および交叉耐性の有無：MTT アッセイより求めた IC_{50} と比較すると、PC10-B3 およびPC10-E5 はPC10に比べ、CDDPに対してそれぞれ11.4倍、19.9倍耐性だった。また、PC10-B3 はCDDP誘導体であるCBDCA と254-S に対しそれぞれ4.7 倍、7.1 倍の交叉耐性を示したが、doxorubicin, etoposideに対しては示さなかった。

細胞内プラチナ蓄積量：5.0 μ g/ml CDDP 添加、1hr, 3hr および6hr 後の細胞内プラチナ蓄積量をみると、PC10-B3 ではPC10に比べ約1/5 ~ 1/8 に低下していた。

2 次元電気泳動：PC10に対して、PC10-B3 およびPC10-E5 でタンパク質スポットMW50kD, pI5.3の著しい減少とスポットMW50kD, pI4.9の増加、また、PC10-E5 でスポットMW58kD, pI5.8の新たな出現がみられた。特にMW50kD, pI5.3 (以下、50kD-5.3) については、PC10-B3 およびPC10-E5 でともにほぼCDDP耐性の獲得時期に一致して著減していたので、CDDP耐性との関連性を考え、さらに解析を進めた。

ペプチドマッピング：50kD-5.3より得られた5 つのペプチド断片のアミノ酸配列を解析すると、合計63残基のうち60残基が50kD, type I keratin(K14)と一致した。また、K14 の分子量が50kD、等電点が5.3 という従来 of 報告と合わせ、50kD-5.3はK14 そのものであると考えられた。

retinoic acid (RA)によるK14 の減少と耐性の誘導：PC10を10 μ M RAに持続接触させると、96時間以降K14 がPC10-B3 に近いレベルまで減少した。そこで、PC10において10 μ M RAを予め96時間接触させた後MTT アッセイを行ったところ、K14 の減少に伴って、対照群と比較しCDDPに対し4.0 倍耐性になった。

考 察

今回、ヒト肺扁平上皮癌細胞株PC10から、肺の扁平上皮癌として初めて、CDDP耐性株PC10-B3とPC10-E5を樹立した。PC10-B3では、PC10に対し細胞内CDDP蓄積量が $1/5 \sim 1/8$ に低下していた。細胞内CDDP蓄積量低下は、CDDP耐性機構の一つとして他のCDDP耐性株でも報告されているが、今回さらに、1) PC10-B3およびPC10-E5で共通して、CDDP耐性獲得の時期と一致して50kD, type I k-eratin(K14)が著しく減少したこと2) PC10をRAで処理したところ、K14の減少に伴ってCDDPに対し4.0倍耐性になったことから、K14の著減とCDDP耐性の関連性が示唆された。

PC10-B3およびPC10-E5におけるK14の減少がCDDP耐性にどのように関与しているかについては、次のような可能性が考えられる。

1) K14の著減が細胞内CDDP蓄積量低下をひきおこす；

K14を含めたkeratinサブファミリーが構成する中間径フィラメントは細胞膜と直接結合する。また、サイトカラシンB、コルヒチン、ニッケルの投与によるkeratinの再編成が細胞膜に影響を及ぼしhorse radish peroxidaseの取り込みを阻害したという報告があり、PC10-B3においてK14の著減が細胞膜成分に影響を与えCDDP蓄積量を低下させた可能性がある。

2) K14の著減がCDDP-DNA架橋の減少をひきおこす；

keratinはCDDP-DNA架橋に結合し、核内でkeratin-CDDP-DNA複合体を形成することが報告されている。PC10においてK14-CDDP-DNA複合体が形成され毒性に働く場合、PC10-B3及びPC10-E5では、K14の著減によりkeratin-CDDP-DNA複合体の量が減少した結果、CDDP耐性になったという可能性も考えられる。

今後、K14の著減が直接CDDP耐性機構に関与するかをみるため、PC10-B3およびPC10-E5にK14遺伝子に移入してCDDP感受性に戻るか検討すべきと考えられる。

結 語

1. ヒト肺扁平上皮癌細胞株から、CDDP耐性株PC10-B3 およびPC10-E5 を樹立した。PC10-B3 の耐性度は約11倍、PC10-E5 の耐性度は約20倍だった。
2. PC10-B3 はCDDP誘導体であるCBDCA および254-S に対して交叉耐性を示したが、doxorubicin およびetoposide には示さなかった。
3. PC10-B3 における細胞内CDDP蓄積量は、PC10に比べ約1/5 ～1/8 に低下していた。
4. 2次元電気泳動による解析で、PC10に対しPC10-B3 とPC10-E5で共通してタンパク質スポットMW50kD, pI5.3 (50kD-5.3)の著しい減少がみられた。
5. ペプチドマッピングにより、50kD-5.3は50kD, type I keratin (K14) と同定された。
6. PC10をRAで処理したところ、K14 の減少に伴ってCDDPに対し4.0 倍耐性になった。

以上から、PC10-B3 およびPC10-E5 におけるCDDP耐性には、細胞内CDDP蓄積量低下のほか、K14 の著減も重要な因子となっていることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 川 上 義 和

副 査 教 授 石 橋 輝 雄

副 査 教 授 葛 巻 暹

CDDP は種々の癌治療に用いられている薬剤であるが、耐性細胞の出現により有効性が失われることがある。この耐性機構を追求することを目的とした。

耐性株はヒト肺扁平上皮細胞株 PC10の培養液中の CDDP 濃度を段階的に上げ、CDDP 耐性サブクローン PC10-B3 及び PC10-E5 を樹立した。CDDP 耐性は MIT アッセイにより薬剤反応曲線を作り確認した。

両株は IC50 でみると、CDDP に対し、それぞれ11.4倍、19.9倍耐性だった。PC10-B3 は、CDDP 誘導体の CBDCA と254-S に対しそれぞれ4.7倍、7.1倍の交叉耐性を示したが、doxorubicin, etoposide に耐性はなかった。

細胞内 CDDP 蓄積量を原子吸光法により測定すると、PC10-B3 では PC10 に比べ、約 1/5 から 1/8 に低下していた。

両耐性株とも MW50KD, pI5.3 の著しい減少と MW50KD, pI4.9 の増加がみられ、PC10-E5 ではさらに MW58KD, pI5.8 の新たな出現がみられた。この50KD, 5.3よりえられた5つのペプチド断片のアミノ酸配列は、合計63残基のうち60残基が50KD, type I ケラチンに一致した。レチノイック酸に PC10 を持続接触させると、96時間以降 type I ケラチンが PC10-B3 に近いレベルまで減少し、CDDP に対し 4 倍耐性となった。

以上の結果は、PC10-B3 と PC10-E5 の CDDP 耐性には細胞内 CDDP 蓄積量の低下のほかケラチン14の著減も重要なことを示している。

口頭発表に際し、石橋教授、葛巻教授、牧田教授、長嶋教授から詳細に御質問があったが、申請者は概ね妥当に答えたと思う。

また、石橋教授、葛巻教授には個別に審査を受け、合格との返事をいただいている。

以上、本研究は肺扁平上皮癌の CDDP 耐性機構の一部を明らかにしたもので、博士の学位に相当するものと認めた。