

学位論文題名

DIFFERENTIAL Na^+ , K^+ - ATPase ACTIVITY
AND CISPLATIN SENSITIVITY BETWEEN
TRANSFORMANTS INDUCED BY H - *ras*
AND THOSE INDUCED BY K - *ras*.

(H - *ras* 癌遺伝子と K - *ras* 癌遺伝子による形質変換細胞
における Na^+ , K^+ - ATPase 活性とシスプラチン感受性)

学位論文内容の要旨

研究目的

シスプラチンは、泌尿器科領域の腫瘍を含め種々の癌の化学療法に広く用いられ、有効な抗癌剤の一つと考えられている。しかし治療初期には有効であっても経過とともに無効となる症例があり、臨床的に問題となってきた。近年、シスプラチン耐性機構の一つとして、H-*ras*癌遺伝子の関与が指摘されている。しかし、K-*ras*癌遺伝子もH-*ras*癌遺伝子と同様にシスプラチン耐性に関与するかどうか、またこれら*ras*癌遺伝子の発現がどのような機序でシスプラチン耐性を誘導するのか、という点は不明であった。そこで、H-*ras*, K-*ras*癌遺伝子により癌化したマウス線維芽細胞を用い、シスプラチン感受性及び耐性に関わると考えられている因子を検討することにより、シスプラチン耐性現象における*ras*癌遺伝子の役割を明らかにした。

対象及び方法

マウス線維芽細胞株NIH/3T3、ヒト活性化c-H-*ras*癌遺伝子(EJ)により腫瘍化したNIH/3T3であるEJ-NIH/3T3、v-H-*ras*癌遺伝子を含むHarveyマウス肉腫ウイルス欠損株により腫瘍化したNIH/3T3(Ha8-21)、v-K-*ras*癌遺伝子を含むKirstenマウス肉腫ウイルス欠損株により腫瘍化したNIH/3T3(DT)、およびrat活性化c-K-*ras*癌遺伝子により腫瘍化したNIH/3T3細胞株(1,8DNP2-2-5)を対象とした。各細胞株のシスプラチン感受性は、clonogenic assayにより検討した。対数増殖期の細胞を0-20 μM のシスプラチン中で1時間培養し、細胞数を調整した後、6-well plateにまき、7-12日後、生細胞を染色固定し50細胞以上のコロニーを数えた。また対数増殖期の細胞を用い、各細胞株の細胞内メタロチオネイン(MT)濃度、細胞内グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)活性、細胞膜 Na^+ , K^+ ATPase活性を測定した。細胞内プラチナ濃度測定には、原子吸光度計を用い、DNA polymerase β の発現はnorthern blot法により検討した。

なお、検定にはDunnettの多重比較検定法を用い、危険率5%で有意差ありとした。

結果

- (1)H-*ras*, K-*ras*癌遺伝子発現細胞株のシスプラチン感受性：H-*ras*癌遺伝子発現細胞株であるEJ-NIH/3T3、Ha8-21は、その親株NIH/3T3に比べ、各々4.1倍、2.4倍シスプラチンに耐性であった($p < 0.01$)。一方K-*ras*癌遺伝子発現細胞株であるDTや1,8DNP 2-2-5は、NIH/3T3との間でシスプラチン感受性に差を認めなかった
- (2)細胞内MT濃度：H-*ras*癌遺伝子発現細胞株、EJ-NIH/3T3、Ha8-21はNIH/3T3に比べ各々3.7倍、3.9倍($p < 0.01$)MT濃度の増加を認めたが、K-*ras*癌遺伝子発現細胞株のうち1,8DNP 2-2-5もまた3.5倍増加していた($p < 0.01$)。一方、DTは、NIH/3T3と比べ差を認めなかった。
- (3)細胞内GST活性：H-*ras*癌遺伝子発現細胞株中、EJ-NIH/3T3はNIH/3T3に比べ細胞内GST活性の有意な亢進を認めた。一方、Ha8-21やK-*ras*癌遺伝子発現細胞株である1,8DNP 2-2-5、DTでは、NIH/3T3と比べ差を認めなかった。
- (4)DNA polymerase β の発現：H-*ras*発現細胞株は両者とも、NIH/3T3との間でその発現に差を認めなかった。
- (5)シスプラチン33 μ Mを投与した後の細胞内プラチナ濃度：H-*ras*癌遺伝子発現細胞株、EJ-NIH/3T3とHa8-21の細胞内プラチナ濃度は各々 0.54 ± 0.24 , 0.50 ± 0.23 ng/mg proteinであり、NIH/3T3の 1.77 ± 0.67 ng/mg proteinと比べ有意な減少を認めた。一方K-*ras*癌遺伝子発現細胞株である1,8DNP 2-2-5やDTでは、有意な減少を認めなかった。
- (6)細胞膜 Na^+ , K^+ ATPase活性：EJ-NIH/3T3とHa8-21の細胞膜分画の Na^+ , K^+ ATPase活性は各々 2.37 ± 1.12 , 1.85 ± 1.04 mg Pi/min/mg proteinであり、NIH/3T3の 3.87 ± 2.66 mg Pi/min/mg proteinと比べ有意な減少を認めた。1,8DNP 2-2-5やDTでは、有意な減少を認めなかった。

考案

今回の検討からH-*ras*癌遺伝子により癌化したNIH/3T3細胞株は、親株であるNIH/3T3よりシスプラチンに耐性であるのに対し、K-*ras*発現細胞はNIH/3T3と比べ、シスプラチンに対する感受性に差がなく、H-*ras*癌遺伝子と異なり、K-*ras*癌遺伝子はシスプラチン耐性に関与しないことが示された。一般にH-*ras*癌遺伝子とK-*ras*癌遺伝子は機能的にほぼ相同の蛋白質、*ras* p21をコードし、細胞内情報伝達系の異常を生じることで細胞を癌化すると考えられている。しかし近年、H-*ras*癌遺伝子によりコードされた*ras* p21とK-*ras*癌遺伝子によりコードされた*ras* p21の間でC-末端のアミノ酸配列に差があること、またTPAによる*c-fos*遺伝子の誘導に差があることが示され、必ずしもH-*ras*癌遺伝子とK-*ras*癌遺伝子が同じ機能を有していないと考えられてきている。そこでH-*ras*癌遺伝子とK-*ras*癌遺伝子発現細胞株を用い、シスプラチン耐性に関係していると考えられている因子に差があるかどうか検討した。その結果、細胞内解毒系であるMTやGST、またDNA修復酵素であるDNA polymerase β では、*ras*癌遺伝子発現細胞株間のシスプラチンに対する感受性の差を説明し得なかった。これに対し、シスプラチンに耐性を示したH-*ras*発現細胞株は、いずれもシスプラチン処理後の細胞内プラチナ濃度の有意な低下を示したが、K-*ras*発現細胞株ではその低下を認めなかった。この事実は、H-*ras*癌遺伝子が関与するシスプラチン耐性においても、他のシスプラチン耐性株同様、取込みの差がシスプラチン耐性に係わる重要な因子と考えられた。さらにシスプラチンの取込みに係わると考えられている細胞膜 Na^+ , K^+ ATPase活性の低下をH-*ras*癌遺伝子発現細胞株両株で認めた一方、K-*ras*癌遺伝子発現細胞株では認めず、この差がシスプラチンの取込みの差、さらにシスプラチン感受性の差を説明をするものと考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 細 川 眞 澄 男
副 査 教 授 長 嶋 和 郎
副 査 教 授 小 柳 知 彦

学 位 論 文 題 名

DIFFERENTIAL Na^+ , K^+ - ATPase ACTIVITY AND CISPLATIN SENSITIVITY BETWEEN TRANSFORMANTS INDUCED BY H - *ras* AND THOSE INDUCED BY K - *ras*.

(H - *ras* 癌遺伝子と K - *ras* 癌遺伝子による形質変換細胞
における Na^+ , K^+ - ATPase 活性とシスプラチン感受性)

シスプラチンは、泌尿器科領域の腫瘍を含め種々の癌の化学療法に広く用いられ、有効な抗癌剤の一つと考えられている。しかし治療初期には有効であっても経過とともに無効となる症例があり、臨床的に問題となってきている。近年、シスプラチン耐性機構の一つとして、H-*ras*癌遺伝子の関与が指摘されている。しかし、K-*ras*癌遺伝子もH-*ras*癌遺伝子と同様にシスプラチン耐性に関与するかどうか、またこれら*ras*癌遺伝子の発現がどのような機序でシスプラチン耐性を誘導するのか、という点は不明であった。そこで、H-*ras*, K-*ras*癌遺伝子により癌化したマウス線維芽細胞を用い、シスプラチン感受性及び耐性に関わると考えられている因子を検討することにより、シスプラチン耐性現象における*ras*癌遺伝子の役割を明らかにした。

マウス線維芽細胞株NIH/3T3、ヒト活性化c-H-*ras*癌遺伝子(EJ)により腫瘍化したNIH/3T3であるEJ-NIH/3T3、v-H-*ras*癌遺伝子を含むHarveyマウス肉腫ウイルス欠損株により腫瘍化したNIH/3T3(Ha8-21)、v-K-*ras*癌遺伝子を含むKirstenマウス肉腫ウイルス欠損株により腫瘍化したNIH/3T3(DT)、およびrat活性化c-K-*ras*癌遺伝子により腫瘍化したNIH/3T3細胞株(1,8DNP2-2-5)を対象とした。各細胞株のシスプラチン感受性は、clonogenic assayにより検討した。対数増殖期の細胞を0-20 μM のシスプラチン中で1時間培養し、細胞数を調整した後、6-well plateにまき、7-12日後、生細胞を染色固定し50細胞以上のコロニーを数えた。また対数増殖期の細胞を用い、各細胞株の細胞内メタロチオネイン(MT)濃度、細胞内グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)活性、細胞膜 Na^+ , K^+ ATPase活性を測定した。細胞内プラチナ濃度測定には、原子吸光度計を用い、DNA polymerase β の発現はnorthern blot法により検討した。

H-*ras*, K-*ras*癌遺伝子発現細胞株のシスプラチン感受性につき検討した結果、H-*ras*癌遺伝子発現細胞株であるEJ-NIH/3T3、Ha8-21は、その親株NIH/3T3に比べ、各々4.1倍、2.4倍シスプラチンに耐性であった($p < 0.01$)。一方K-*ras*癌遺伝子発現細胞であ

るDTや1,8DNP2-2-5は、NIH/3T3との間でシスプラチン感受性に差を認めなかった。この結果より、H-ras癌遺伝子と異なり、K-ras癌遺伝子はシスプラチン耐性に関与しないことが示された。そこでこれらras癌遺伝子発現細胞株を用い、シスプラチン耐性に関係していると考えられている因子に差があるかどうか検討した。その結果、細胞内解毒系であるメトキシフェンやグルタチオン-S-トランスフェラーゼ、またDNA修復酵素であるDNAポリメラーゼ β では、ras癌遺伝子発現細胞株間のシスプラチンに対する感受性の差を説明し得なかった。これに対し、シスプラチンに耐性を示したH-ras発現細胞株は、いずれも33 μ Mのシスプラチンを投与した後の細胞内プラチナ濃度が各々0.54 \pm 0.24, 0.50 \pm 0.23ng/mg proteinであり、NIH/3T3の1.77 \pm 0.67ng/mg proteinと比べ有意な減少を認めたが、K-ras発現細胞株ではその低下を認めなかった。さらにシスプラチンの取込みに係わると考えられている細胞膜Na⁺,K⁺ATPase活性の低下をH-ras癌遺伝子発現細胞株で認めたが、K-ras癌遺伝子発現細胞株では認めなかった。

以上の結果よりras癌遺伝子によりもたらされるシスプラチンに対する耐性は、H-ras癌遺伝子に特異的であり、その機序としてこの遺伝子により癌化した細胞株では細胞膜Na⁺,K⁺ATPase活性の低下がみられ、それにより細胞内へのシスプラチンの取込みが減少しているためと考えられた。

公開発表は約20名の聴衆の前で行われ、細川教授より①H-ras癌遺伝子の発現によりシスプラチン耐性が発現することは示されたが、逆に一般的なシスプラチン耐性癌細胞株ではH-ras癌遺伝子の発現亢進、変異はみられるか、②3種類のras癌遺伝子(H-,K-,N-)で機能に差があるとすればどのような機序でもたらされるか、小柳教授より臨床例においても、肺、リンパ節、原発巣でシスプラチンに対する反応性に差があるが、これはH-ras癌遺伝子発現の異常によりもたらされたものかどうか、長嶋教授より①親株を他の細胞株にかえて、H-ras癌遺伝子、K-ras癌遺伝子を導入してもこのようにシスプラチン感受性に差がでるのかどうか、②H-ras癌遺伝子発現異常の程度とNa⁺,K⁺ATPase活性の間には相関性があるかどうか、という点に関して質問があった。また衛生学齋藤教授より、細胞内のシスプラチン濃度が低下しているH-ras癌遺伝子発現細胞株で、細胞内メトキシフェン濃度の増加はみられたかどうか、第一内科磯部助手よりシスプラチンの細胞内から外への排出機構は検討したかどうか、という点に関し質問があり、発表者はおおむね妥当な回答を行った。

審査員一同は、本研究においてras癌遺伝子間での機能の差を明らかにした点、およびH-ras癌遺伝子発現とNa⁺,K⁺ATPase活性の低下を明らかにしたという点での独自性、先進性さらに臨床への応用の可能性を示した成果を高く評価し、博士(医学)の学位に値するものと判定した。