

学 位 論 文 題 名

Inhibition of Na^+, K^+ -ATPase by cisplatin
and its recovery by 2-mercaptoethanol
in human squamous-cell carcinoma cells

（抗癌剤シスプラチンによるヒト培養扁平上皮癌細胞の
 Na^+, K^+ -ATPase 活性阻害および 2-mercaptoethanol による回復）

学位論文内容の要旨

【緒言】

cisplatin(以下CDDPと略す)は、現在まで、頭頸部癌をはじめ様々な癌の治療に広く用いられてきている抗癌剤の一つである。このCDDPと Na^+, K^+ -ATPaseとの関係についてはこれまでに様々な報告があり、大きく次の三つの点で重要であると考えられている。第一に、CDDPの細胞内への輸送に関連して、 Na^+, K^+ -ATPaseは直接あるいは間接的にCDDPの細胞内への輸送に関与しているという点であり、第二に、CDDPと5-Fluorouracil(以下5-FUと略す)の併用療法に関連して、CDDPが癌細胞の Na^+, K^+ -ATPaseを阻害して5-FUの抗腫瘍効果を増強する可能性があるという点であり、そして第三に、CDDPの腎毒性に関連して、CDDPが腎の Na^+, K^+ -ATPaseを阻害し、これが腎毒性の原因のとなっている可能性があるという点である。この様に、一方では取り込みに関与しているという報告があり、他方ではそのものにより阻害されるという報告があるなど、CDDPと Na^+, K^+ -ATPaseとの関係については様々に報告されているが、その詳細については未だ明確にはされていない。そこで今回、特に不明な点が多く、詳細な解析がなされていない、CDDPによる Na^+, K^+ -ATPase阻害機構について、ヒト培養歯肉癌細胞株（Ca9-22細胞）より部分精製した Na^+, K^+ -ATPaseを用いて、その解明を試みた。

【材料と方法】

CDDPによる Na^+, K^+ -ATPase阻害を詳細に解析するには、 Na^+, K^+ -ATPaseの精製が必要であると考え、通法に従い培養したヒト歯肉癌細胞株、Ca9-22細胞の膜分画をJørgensenの方法に従ってSDS処理し、glycerol密度勾配遠心により Na^+, K^+ -ATPaseを部分精製して、その酵素的性質を調べた。得られた至適酵素活性条件を用い、ATPを基質として、 Na^+, K^+ -ATPase 活性と部分反応である Na^+ -ATPase活性を、pNPPを基質として K^+ 依存性pNPPase活性を測定し、さらに ^{32}P でラベルしたATPを用いて、 Na^+, K^+ -ATPaseのリン酸化反応中間体(EP)形成量を測定し、CDDPの阻害効果を調べた。

【結果】

Ca9-22細胞の膜分画から比活性 $1.2\sim 1.5 \mu\text{mol of Pi}/\text{mg protein}/\text{min}$ (37°C の酵素標品を得た。活性の回収率は約84%で、全ATPase活性の70%以上が Ouabain 感受性、すなわち Na^+, K^+ -ATPase活性であった。酵素活性に必須なりガンドに対する親和性を調べたところ、 40 mM Na^+ ($K_{0.5}=5 \text{ mM}$)、 8 mM K^+ (0.5 mM)、 6 mM Mg^{2+} (1.6 mM)、 5 mM ATP (0.4 mM)で活性は飽和し、至適pHは7.2~7.5であった。

はじめにCDDP濃度と阻害との関係について検討を行った。まず、CDDP濃度を最大1mMまで変化させ、 37°C で、30分間、 Na^+, K^+ -ATPaseとpreincubationした後、ATPase活性を測定した。30分間のCDDP処理では、CDDPは Na^+, K^+ -ATPase活性を濃度依存的に阻害し、その変化は2相性を呈した。この結果より、CDDPによる Na^+, K^+ -ATPase活性の阻害は濃度のみでなく、反応時間も強く影響する可能性が示唆されたので、次に反応時間との関係についての解析を行った。

CDDPとの反応時間を0~180minまで変えてpreincubationした後、ATPase活性を測定したところ、 Na^+, K^+ -ATPase活性はCDDPとのpreincubation時間に依存して阻害されることが示された。特に、30分間のpreincubationでは差のみられなかった $100 \mu\text{M}$ 以下でもこの傾向が示されたことより、CDDPの Na^+, K^+ -ATPase活性阻害作用を解析する際、その濃度だけでなく、反応時間も考慮に入れる必要があることが明らかとなった。

次に、CDDPが Na^+, K^+ -ATPase反応機構のどの段階を阻害するのかをより詳細に解析するために、部分反応である Na^+ -ATPase活性と K^+ 依存性pNPPase活性について、CDDPによる阻害を検討した。 Na^+ -ATPaseと K^+ 依存性pNPPaseはともにCDDPにより、濃度と時間の両方に依存して阻害されたが、 Na^+ -ATPaseの方が K^+ 依存性pNPPaseに比べて、より低濃度のCDDPで阻害された。この結果より、CDDPは Na^+ の関与する前半の部分、リン酸化反応中間体 (EP) 形成に作用することにより、活性を阻害することが示唆されたので、次にEP形成に対するCDDPの効果を調べた。

EP形成量はCDDP濃度に依存して阻害され、 Na^+, K^+ -ATPase活性に対するCDDPの濃度依存的阻害に、類似した結果を示した。次に、EP形成量に与える、CDDPのpreincubation時間の影響について検討したところ、同じ濃度のCDDPでも、EP形成量はCDDPを添加してからの時間に依存して減少し、 Na^+, K^+ -ATPase活性の、CDDPとの反応時間に依存した低下と同様の傾向を示した。

また、CDDPはglutathion (GSH)やMetallothioneinなどのSH基と結合するという報告があり、一方、 Na^+, K^+ -ATPaseは活性中心付近に、SH基を持つシステイン残基が存在し、それが酵素活性に重要な役割を果たしていることが判っている。そこで、CDDPが、 Na^+, K^+ -ATPaseの活性中心付近のシステイン残基に結合することにより、その酵素活性を阻害するのではないかと予想し、それを確認するための実験を行った。実験にはSH基の保護剤として2-mercaptoethanolを用いた。まずCDDPと Na^+, K^+ -ATPaseをpreincubationする時に、あらかじめ、 4mM 、 8mM の2-mercaptoethanolを加えておくと、活性が保護されることが解った。

そこで次に、CDDPがつくことによって活性が阻害された Na^+, K^+ -ATPaseに、2-mercaptoethanolを加えることでCDDPが解離され、 Na^+, K^+ -

ATPaseが再活性化するか調べるための実験を行った。500 μ MのCDDPを添加して120分たつと、活性は約20%低下し、更にincubationを続けると、時間に依存して活性は減少していった。そこで、この120分たったところで、4mMあるいは8mMの2-mercaptoethanolを添加すると活性は時間に依存してほぼ100%近く回復した。

【考察】

CDDPによる阻害が、濃度と反応時間の両方に依存することは、CDDPの水の中で起こる構造変化と密接な関係があると考えられた。Zwellingらによれば、CDDPのもつcis位の2個のCl(クロライド)が、一つずつ、順次、H₂O(水)に置き換わることにより細胞毒性をもつようになることが解っており、これをaquationと呼ぶが、この変化は非常にゆっくりと進むことが報告されている。今回の濃度と時間の両方に依存した阻害、特に時間の因子に関しては、このことが深く関与していると考えられた。

また、CDDPの細胞内への輸送に関しては、今回の結果と過去の報告とを併せて考えると、CDDPはNa⁺,K⁺-ATPaseが間接的に重要な役割を果たして細胞内に取り込まれるが、Na⁺,K⁺-ATPaseそのものをCDDPが阻害し、このことがCDDPの殺細胞効果に、臨床的にマイナスの影響を与えている可能性があると考えられた。

CDDPによるNa⁺,K⁺-ATPaseの活性阻害機構については、EP形成量とNa⁺,K⁺-ATPase活性がともに、CDDP濃度と反応時間の両方に依存して阻害されること、およびNa⁺-ATPaseの方がK⁺依存性pNPPaseに比べてより阻害されやすいことから、CDDPはNa⁺,K⁺-ATPase反応機構の中で前半の部分、EP形成を阻害することによってNa⁺,K⁺-ATPase活性を阻害するということが示唆された。

また、直接的な証明は得られていないが、CDDPにより阻害されたNa⁺,K⁺-ATPase活性は、SH基の保護剤である2-mercaptoethanolにより、ほぼ100%活性が回復したこと、Na⁺,K⁺-ATPaseでは、酵素の活性中心付近にSH基が存在し、それが酵素活性に重要な役割を果たしていること、そしてCDDPがSH基に親和性が高いという過去の報告とを併せて考えると、CDDPによるNa⁺,K⁺-ATPase阻害は可逆的であり、CDDPはNa⁺,K⁺-ATPaseの活性中心付近のシステイン残基に結合することにより、その酵素活性を阻害すると考えられ、2-mercaptoethanolは、酵素の活性中心付近のシステイン残基からCDDPを解離させることにより、阻害されたNa⁺,K⁺-ATPaseを再活性化できる可能性が示唆された。そして、SH基を持つglutathion(GSH)やmetallothioneinにより腎毒性が軽減されることはよく知られているが、そのメカニズムの一つは、今回示した機構と同じ機構で説明できるものと考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 福 田 博

副 査 教 授 松 本 章

副 査 教 授 久保木 芳 徳

学 位 論 文 題 名

Inhibition of Na^+, K^+ -ATPase by cisplatin and its recovery by 2-mercaptoethanol in human squamous-cell carcinoma cells

(抗癌剤シスプラチンによるヒト培養扁平上皮癌細胞の
 Na^+, K^+ -ATPase 活性阻害および 2-mercaptoethanol による回復)

審査は審査担当者が全員一堂に会して行われた。まず、論文提出者に研究内容の説明を求めた。論文提出者は以下のような研究の概要を明快に説明した。

cisplatin (以下CDDPと略す) は頭頸部癌をはじめ様々な癌の治療に用いられてきている最も重要で効果的な抗癌剤のひとつである。このCDDPと Na^+, K^+ -ATPaseとの関係についてはこれまでに様々な報告があり、大きく次の3つの点で重要な関係であると考えられている。第一に、CDDPの細胞内への輸送に関連して、 Na^+, K^+ -ATPaseは直接あるいは間接的にCDDPの細胞内への輸送に関与しているという点であり、第二にCDDPと5-FUの併用療法に関連して、CDDPが癌細胞の Na^+, K^+ -ATPaseを阻害して5-FUの抗腫瘍効果を増強する可能性があるという点であり、そして第三に、CDDPの腎毒性に関連して、CDDPが腎の Na^+, K^+ -ATPaseを阻害し、これが腎毒性の原因となっている可能性があるという点である。この様に、一方では Na^+, K^+ -ATPaseはCDDPの取り込みに関与しているという報告があり、他方では Na^+, K^+ -ATPaseはCDDPにより阻害されるという報告があるなど、両者の関係については様々な報告のされかたをしており、その詳細については未だ明確ではない。そこで今回、特に不明な点が多い、CDDPによる Na^+, K^+ -ATPase阻害機構について、ヒト培養歯肉癌細胞株 (Ca9-22細胞) より部分精製した Na^+, K^+ -ATPaseを用いてその解明を試みた。

【結果】

① Ca9-22細胞の膜分画から、比活性 $1.2 \sim 1.5 \mu\text{mol of Pi} / \text{mg protein} / \text{min}$ (37°C) の酵素標品を得た。活性の回収率は約84%で、全ATPase活性の70%以上が Ouabain 感受性、すなわち Na^+, K^+ -ATPaseであった。酵素活性に必須なりガ

ンドに対する親和性を調べたところ、40 mM Na^+ ($K_{0.5}=5$ mM)、8 mM K^+ (0.5 mM)、6 mM Mg^{2+} (1.6 mM)、5 mM ATP (0.4 mM)で活性は飽和し、至適pHは7.2~7.5であった。

②CDDPは Na^+ , K^+ -ATPase活性を濃度と時間の両方に依存して阻害した。

③ Na^+ -ATPaseと K^+ -pNPPaseはともにCDDPにより、濃度と時間の両方に依存して阻害されたが、 Na^+ -ATPaseの方が K^+ -pNPPaseに比べて、より低濃度のCDDPで阻害された。

④EP形成量はCDDPの濃度と時間の両方に依存して阻害された。

⑤CDDPにより阻害された Na^+ , K^+ -ATPase活性は、SH基の保護剤である2-mercaptoethanolにより、ほぼ100%活性が回復した。 Na^+ , K^+ -ATPaseでは、酵素の活性中心付近にSH基が存在し、それが酵素活性に重要な役割を果たしていること、およびCDDPがSH基に親和性が高いという過去の報告とを併せて考えると、この活性の回復は、 Na^+ , K^+ -ATPaseのSH基に結合したCDDPを、2-mercaptoethanolが解離させた結果生じた可能性がある。

【結論】CDDPは、歯肉癌細胞株(Ca9-22細胞)の Na^+ , K^+ -ATPaseを、濃度と時間の両方に依存して阻害することが示され、その阻害の機構には、 Na^+ , K^+ -ATPaseのSH基にCDDPが結合することによる、リン酸化中間体(EP)形成の阻害が深く関与していることが示唆された。また、この阻害は可逆的であることが示唆された。

以上が提出論文の概要である。

続いて、口頭による試問が行われた。

まず、研究方法に関する詳細が問われた後、研究結果とその考察に関して質問された。濃度依存性と時間依存性について。CDDPの Na^+ , K^+ -ATPase活性に及ぼす効果が濃度依存性を示す図の中で、その曲線が二相性を示す現象をどのように解釈するか。また、結合部位がSH基なのかどうかなど様々な質問があった。さらに、本研究の今後の発展性、臨床応用などについても質問された。

これらの質問に対して論文提出者は明快かつ適切に説明、回答し、本研究について、その意味を十分理解すると共に、関連領域についても多くの文献等の検索をし、広い学識を有していることが確認された。

また、とくに、CDDPによる Na^+ , K^+ -ATPase活性阻害を2-mercaptoethanolを使って保護、あるいは回復させるという手法により、明快な実験結果を引き出している点が高く評価された。その後、久保木副査によって口腔生物学全般にわたる見識を問う論述試験が行われたが、提出者は優れた成績を示した。

以上より、本論文提出者は博士（歯学）の学位授与に値するものと判定された。