

学位論文題名

Intra-cellular Accumulation of Thallium as a
Marker of Cisplatin Cytotoxicity
-An Application of Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry-

(シスプラチン感受性の評価法としての細胞内タリウム取り
込みに関する研究 - ICP 質量分析装置を用いての検討 -)

学位論文内容の要旨

I 背景と目的

タリウム-201 (^{201}Tl) シンチグラフィは各種悪性腫瘍の検出、特に甲状腺癌、肺癌の検出に優れており、その腫瘍細胞への取り込みのメカニズムはNa-K ATPaseを介すると考えられている。腫瘍細胞における細胞膜のNa-K ATPase活性は種々の作用を持ち、細胞膜のNa-K ATPase活性が腫瘍の転移能と関係があるとの報告がある。また、細胞内へのシスプラチン(CDDP)取り込みにはNa-K ATPaseが必要であり、一方、腫瘍細胞のCDDP取り込み低下がCDDP耐性の大きな要因の一つであることから、Na-K ATPaseはCDDP耐性に関与している可能性がある。これらを基に、我々は既に ^{201}Tl シンチグラフィを行った肺腺癌患者において、原発巣のタリウム取り込みが増大している症例では、有意にリンパ節転移陽性であること (Takekawa H, et al. Br. J. Cancer, 1994; 70: 315-318)、肺小細胞癌患者において、 ^{201}Tl の腫瘍内取り込み量とCDDPを含むプラチナ化合物による化学療法の治療効果とが相関したこと (Tokuchi Y, et al. Br. J. Cancer, 1998; 77: 1363-1368)を報告した。本研究では*in-vitro*における腫瘍細胞のタリウムとCDDPの取り込み量の基礎的検討をおこなった。すなわち、非小細胞肺癌培養細胞株を用いて、タリウムとCDDPの取り込み量をICP質量分析装置(ICP-MS)を使用して測定し、それぞれの取り込み量の相関の有無、さらに取り込み量とCDDP感受性の相関を検討した。

II 対象と方法

使用した非小細胞肺癌培養細胞株は、腺癌5種(A549、PC-3、RERF-LC-MS、RERF-LC-OK、VMRC-LCD)、扁平上皮癌3種(EBC-1、LK-2、PC-10)である。対数増殖期にある各細胞株 5.0×10^6 個をシャーレに播種し、 $10 \mu\text{g/ml}$ のCDDPもしくは $20 \mu\text{g/ml}$ のThallium chlorideを含んだ培養液にて1時間培養した後、Rubber scraperにて細胞を剥離し、PBSにて2回細胞を洗浄、ペレットを 0.1N HNO_3 にて加熱酸分解し滅菌蒸留水を加え試料を作成した。ICP-MS (SPQ6500, SEIKO Co. LTD.)による細胞内プラチナ、もしくはタリウム濃度の測定では、プラチナ、タリウムのstandard solutionを用い4点(0, 10, 50, $100 \mu\text{g/ml}$)にて検量線を作成し、試料内のプラチナ、タリウム

濃度を直接測定した。尚、各細胞のCDDPに対する感受性はXTT assay を用い、 IC_{50} (50% inhibitory concentration)にて算出した。蛋白定量はBicinchoninic acid assayを用いた。CDDP取り込み、タリウム取り込み、CDDP感受性それぞれの相関は回帰係数の検定を行い、 $p < 0.05$ を有意とした。

III 結果

薬剤感受性は、いずれの細胞株もCDDPの IC_{50} は $2.8 \mu M$ から $21.8 \mu M$ の範囲内であった。ICP-MSの検量線は相関係数がいずれも0.999と直線性は良好であり。細胞内CDDP、タリウムの測定は、一回の検量線作成にて全ての細胞株の濃度が迅速に測定可能であった。細胞内CDDP及びタリウムを測定した結果、細胞株間のCDDP、タリウム取り込み量に差違をみとめた。CDDP取り込みとタリウム取り込みの間には有意な相関はなかったが、CDDP取り込みとCDDP IC_{50} ($r=0.731$, $p < 0.05$)、またタリウム取り込みとCDDP IC_{50} ($r=0.714$, $p < 0.05$)の間には有意な逆相関をみとめた。

IV 考案

CDDPは種々の固形腫瘍において抗腫瘍効果を示すが、腫瘍細胞のCDDP自然耐性、獲得耐性はその治療において大きな障害となる。今回我々は非小細胞肺癌培養細胞株を用い、*in-vitro*においてのタリウム取り込みとCDDP感受性を検討したが、その取り込み量の測定に比較的新しい測定機器であるICP-MSを用いた。現在まで細胞内CDDP濃度、タリウム濃度の測定には原子吸光法、ラジオアイソトープ標識したCDDP、タリウムを使用するのが一般的であった。しかしながら原子吸光法はその測定にかなりの時間を要し、ラジオアイソトープは測定者の被爆の危険性を有するというデメリットをそれぞれ抱えている。ICP-MSは試料中に含まれる各種元素を $10^{-12}g/ml$ (ppt)から $10^{-6}g/ml$ (ppm)まで同時に測定可能であり、試料中に含まれる濃度レベルの大きく異なる元素を希釈を繰り返すことなく一点検量線法で一度に定量可能である。本研究ではICP-MSを使用することにより、迅速、且つ正確、安全に細胞内CDDP、タリウム濃度の測定が可能となった。実際の測定の結果、細胞内CDDP取り込みとタリウム取り込みに関しては、以前に行った臨床研究から相関があることが予想されたが、有意な相関は得られず、その理由として細胞内CDDP、タリウムの代謝経路の違いによることが示唆された。一方、細胞内CDDP取り込みとCDDP感受性は有意な相関をみとめ、細胞内タリウム取り込みとCDDP感受性についても有意な相関をみとめたものの、その相関はいずれも比較的弱いものであった。今回使用した8種の細胞株のCDDP耐性度に大きな差異がなかったことが、その要因の一つと思われるが、弱いながらもタリウムの細胞内取り込みとCDDP感受性に相関を認めたことより、 ^{201}Tl の細胞内取り込みを反映している ^{201}Tl シンチグラフィがCDDP感受性の予測に利用できる可能性が示唆された。本研究の成績は非小細胞肺癌患者の ^{201}Tl シンチグラフィが腫瘍の存在診断のみならず、患者のCDDP感受性の予見、non-responderに対するCDDP治療回避や治療中の耐性獲得の予見に応用可能であることが明らかになった。

V 結語

非小細胞肺癌培養細胞株において、細胞内タリウム取り込みはシスプラチン感受性の指標となりうる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 細 川 真澄男

副 査 教 授 玉 木 長 良

副 査 教 授 川 上 義 和

学 位 論 文 題 名

Intra-cellular Accumulation of Thallium as a Marker of Cisplatin Cytotoxicity -An Application of Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry-

(シスプラチン感受性の評価法としての細胞内タリウム取り
込みに関する研究 - ICP 質量分析装置を用いての検討 -)

タリウム-201(^{201}Tl)シンチグラフィは各種悪性腫瘍の検出に優れており、その腫瘍細胞への取り込みのメカニズムはNa-K ATPaseを介すると考えられている。また、細胞内へのシスプラチン(CDDP)取り込みにもNa-K ATPaseが必要であり、腫瘍細胞のCDDP取り込み低下がCDDP耐性の大きな要因の一つであることから、癌細胞におけるNa-K ATPase活性はCDDP感受性にも関与している可能性がある。そこで、申請者は、非小細胞肺癌培養細胞株のタリウムとCDDPとの取り込み量の相関の有無、さらにそれら取り込み量とCDDP感受性との相関と検索し、 ^{201}Tl シンチグラフィの成績からCDDP感受性を推察する可能性を検討した。

実験に使用した非小細胞肺癌培養細胞株は、腺癌5種(A549, PC-3, RERF-LC-MS, RERF-LC-OK, VMRC-LCD)、扁平上皮癌3種(EBC-1, LK-2, PC-10)である。対数増殖期にある各細胞株 5.0×10^6 個をシャーレに播種し、 $10 \mu\text{g/ml}$ のCDDPもしくは $20 \mu\text{g/ml}$ のThallium chlorideを含んだ培養液にて1時間培養した後、Rubber scraperにて剥離した細胞の加熱分解試料を作成した。ICP-MS (SPQ6500, SEIKO Co. LTD.)による細胞内プラチナ、もしくはタリウム濃度の測定では、プラチナ、タリウムのstandard solutionを用い4点(0, 10, 50, $100 \mu\text{g/ml}$)にて検量線を作成し、試料内のプラチナ、タリウムを直接測定した。また、各細胞のCDDPに対する感受性はXTT assayを用いて検索した。

実験の結果、薬剤感受性すなわち用いた細胞株のCDDPの IC_{50} は $2.8 \mu\text{M}$ から $21.8 \mu\text{M}$ の範囲内であった。細胞株間のCDDP、タリウム取り込み量に差異があり、CDDP取り込みとタリウム取り込みの間には有意な相関はなかったが、CDDP取り込みとCDDP IC_{50}

($r=0.731$, $p<0.05$)、またタリウム取り込みとCDDP IC_{50} ($r=0.714$, $p<0.05$)の間には有意な逆相関をみとめた。すなわちCDDP感受性はCDDP細胞内取り込みのみならずタリウム取り込みともよく相関した。その相関はいずれも比較的弱いものであったが、 ^{201}Tl の細胞内取り込みを反映している ^{201}Tl シンチグラフィがCDDP感受性の予測に利用できる可能性が示唆された。本研究の成績は非小細胞肺癌患者の ^{201}Tl シンチグラフィが腫瘍の診断のみならず、その患者の癌細胞のCDDP感受性を予見し、non-responderに対してのCDDP治療回避や治療中の耐性獲得の予見に応用可能であることを明らかにしている。

公開発表にあたり、副査玉木長良教授より1) タリウム取り込みとCDDP取り込みが相関しないことに対する考えられる理由、2) 細胞内タリウム取り込みの時間的経過を検討する必要性、3) タリウム取り込みと薬剤排泄機構であるP-glycoprotein発現との関係などについて、主査細川真澄男教授より、1) CDDP細胞内取り込み推察するのに ^{201}Tl シンチグラフィでなければならない理由、2) 直接CDDP感受性検査と ^{201}Tl チグラフィ検査とどちらが実際には簡便で、判定はしやすいか、3) タリウム取り込みの高い癌でもCDDPにて治療が困難なものがある理由など、副査川上義和教授より1) ^{201}Tl シンチグラフィあるはタリウム細胞取り込み時間的差異を利用することにより腫瘍病変と非腫瘍性病変を鑑別できる可能性、2) タリウムとCDDPの排泄機構の違い、3) 本研究成果を実際に臨床応用する可能性などについて質問があったが、申請者は永年の実験経験に基づき適切な回答をなし得た。最後に、フロアの国立札幌病院磯部博士、副査玉木教授がそれぞれ専門の立場より、本研究のさらなる進展を望むコメントがあり公開発表を締めくくった。

本研究は、非小細胞肺癌におけるシスプラチンCDDP感受性が、 ^{201}Tl シンチグラフィの検査により推察できる可能性を明らかにしたものであり、さらに、個々の患者で、 ^{201}Tl シンチグラフィの成績とCDDPによる治療成績、あるいは摘出した癌細胞のCDDP感受性とを照合することにより、臨床応用が可能となり、CDDPによる化学療法の成績の向上させうることが期待される。

審査員一同は、これらの研究成果を高く評価し、申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。