

学 位 論 文 題 名

ヒト培養歯肉癌細胞株（Ca 9-22細胞）の  
Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase の部分精製とその性質および  
抗癌剤 cis-diamminedichloroplatinum（Ⅱ）による  
その活性阻害と回復

学位論文内容の要旨

抗癌剤であるcis-diamminedichloroplatinum（Ⅱ）（シスプラチン）とNa<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPaseに関してはすでに多くの報告があり、それらをまとめると、シスプラチンによるNa<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase活性の阻害は、大きく3つの点から抗癌作用に関連している。1つはシスプラチンの細胞内への輸送にNa<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPaseが関与しているということである。2つ目はバイオケミカルモジュレーションであり、シスプラチンによるNa<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase活性の阻害は癌細胞内のメチオニン量を減少させ、結果として5-フルオロウラシルの効果を増強するというものである。3つ目はNa<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPaseは腎臓においてナトリウムと水の再吸収に関与していることから、シスプラチンによる腎毒性にNa<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPaseの阻害が関与している可能性である。このようにシスプラチンとNa<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPaseの関連は重要であり、また多くの研究にもかかわらずシスプラチンによるNa<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase活性阻害機構を初めとして、不明な点が多い。

そこで、本研究では癌細胞のNa<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPaseに対するシスプラチンの作用を詳細に検討し、癌細胞のNa<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPaseと正常細胞のNa<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPaseを比較する目的のために、まずヒト口腔扁平上皮癌細胞株(Ca9-22細胞)より簡便でかつ精製度の高いNa<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPaseの部分精製法を確立し、ついでこのNa<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase標品の性質を調べ、さらにこの標品を用いてシスプラチンのNa<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase活性阻害機構と、活性阻害を軽減する薬物について検討した。

材料と方法

ヒト培養歯肉癌細胞株(Ca9-22細胞)を通法に従い、40ディッシュ（直径10センチメートル）で培養した。細胞は培養開始約4日後にコンフルエントになり、4ディッシュを継代培養に用い、残り36ディッシュはコンフルエント後4日目に細胞を回収した。これを順次6～8回繰り返し、216～288ディッシュ分の細胞を一回の部分精製に用いた。回収したCa9-22細胞を氷中にて超音波破碎処理を行いホモジネートを得て、ホモジネートを遠心し膜分画として回収した。Ca9-22細胞の膜分画

の最適なドデシル硫酸ナトリウム (SDS) による可溶化の条件を決定するために、種々の濃度のSDSが膜分画の $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase活性に与える影響を調べた。1 mgのタンパク質あたり0.25 mgのSDSで処理して得られた酵素が、活性の回収率も高く、最大の比活性を示した。SDS処理した膜分画を、Jørgensenの方法の変法であるPostらの方法に従って蔗糖密度勾配遠心を行い、 $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase活性のある白濁したバンドと沈渣を得た。酵素活性測定は、酵素反応の結果生じた無機リン酸をChiffletらの方法に従って定量した。

## 結果

上記の方法によってCa9-22細胞の膜分画から80%以上の回収率で比活性5倍の $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPaseを部分精製した。得られた標品の酵素化学的性質を調べたところ、 $\text{Na}^+$ に対する親和性が変化している可能性が示された。そこで $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPaseのリン酸化中間体形成の $\text{Na}^+$ 濃度依存性を調べたところヒト口腔扁平上皮癌細胞株 (Ca9-22, H S C - 3細胞) およびヒト類上皮癌細胞株KB細胞と腎臓の $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPaseとの間に $\text{Na}^+$ に対する親和性の差はなく、腎臓や脳などの精製度が高い $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPaseと同様の性質を示した。

得られた標品を用いて、シスプラチンによる $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase活性の阻害機構と、活性阻害を軽減する薬物について検討した。その結果、シスプラチンは濃度のみならず時間にも依存して $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase活性を阻害した。活性の阻害はチオール化合物である2-メルカプトエタノール (2-ME), ダイチオスレイトール (DTT), グルタチオンを添加すると経時的に回復し、2-ME とグルタチオンでは添加後2時間で20%、DTTでは完全に回復した。

次に $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPaseの分子構造変化がシスプラチンによる $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase活性の阻害に影響するか否かを確かめる目的で、シスプラチンによる活性阻害に対する $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、ATPの影響を調べた。 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、ATP非存在下では、酵素活性は4時間後には完全に阻害されたが、ATP単独添加により20%、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ の単独、あるいは両者を同時に添加することにより約40%の活性が残存した。

## 考察

精製に用いた方法は、基本的にはJørgensenが犬の腎臓から $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPaseを精製するのに用いて成功した、ATP存在下で酵素の活性中心を保護しながらSDSで酵素を可溶化して精製する方法である。この方法のポイントは酵素のタンパク質量に対するSDSの比率であり、Ca9-22細胞の場合は腎臓と比べて半分のSDS濃度において最適な精製標品が得られた。この結果はCa9-22細胞以外にも培養細胞を用いて $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPaseを簡便でかつ高い精製度で精製を行う上で、有用な結果である。

歯肉癌細胞から得られた $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPaseが正常な臓器から得られた酵素とその性質に違いがあるか否かを調べることを目的として、酵素の基本的な性質を調べた今回の結果からは、癌細胞と正常細胞の $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPaseの性質の違いは観察されなかった。

チオール化合物がシスプラチンによる $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase活性の阻害を直接保護しうることを示し、シスプラチンによる腎毒性を軽減する方法とその機構を考える上で興味深い結果を得た。

$\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPaseのコンフォーメーションが存在する $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、ATPなどのリガンドによって異なることはよく知られている。シスプラチンによる $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase阻害の時間経過は存在するリガンドによって異なったことより、シスプラチンが $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPaseの活性中心付近のチオール残基に結合するのなら、そのチオール残基近傍の構造が $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、ATPなどの存在によってシスプラチンが結合しにくい構造に変化する可能性があり、シスプラチンの $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPaseへの結合モデルを考える上で興味深い結果が得られた。

## 結論

1. ヒト培養歯肉癌細胞株(Ca9-22細胞)からシスプラチンの阻害作用を詳細に解析するのに十分な精製度の $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPaseを簡便に部分精製する方法を確立した。
2. 得られた標品の性質を調べた結果からは、癌細胞株と腎臓の $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPaseには性質の違いはみられなかった。
3. 精製した標品を用いて、2-ME, グルタチオン, DTTなどのチオール化合物はシスプラチンによる $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase活性阻害を可逆的に回復しうることに、 $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPaseのコンフォーメーションの変化がシスプラチンによる活性の阻害に影響することを明らかにした。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 福 田 博

副 査 教 授 向 後 隆 男

副 査 教 授 松 本 章

## 学 位 論 文 題 名

### ヒト培養歯肉癌細胞株（Ca 9-22細胞）の Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase の部分精製とその性質および 抗癌剤 cis-diamminedichloroplatinum（Ⅱ）による その活性阻害と回復

審査は、審査担当者全員が一堂に会し、口頭にて行った。まず、論文提出者に研究の概要の説明を求めた。論文の概要は以下の通りである。

抗癌剤シスプラチンとNa<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPaseに関して多くの報告があり、シスプラチンによるNa<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase活性阻害は、シスプラチンの細胞内への輸送やバイオケミカルモジュレーションおよびシスプラチンによる腎毒性と、大きく3つの点から抗癌作用に関連する。シスプラチンとNa<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPaseの関連は重要であり、多くの研究がなされているが不明な点が多い。本研究では癌細胞のNa<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPaseに対するシスプラチンの作用を詳細に検討するために、まずヒト口腔扁平上皮癌細胞株(Ca9-22細胞)より簡便でかつ精製度の高いNa<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPaseの部分精製法を確立し、標品の性質を調べ、シスプラチンのNa<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase活性阻害機構と、活性阻害を軽減する薬物について検討した。

#### 方法および結果

ヒト培養歯肉癌細胞株(Ca9-22細胞)を通法に従い培養し、膜分画を得た。Ca9-22細胞の膜分画の最適なドデシル硫酸ナトリウム（SDS）による可溶化条件を決定した。SDS処理した膜分画から高回収率でNa<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPaseを部分精製し、比活性は5倍増加した。酵素化学的性質を調べた結果、他の癌細胞も含めて腎臓のNa<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPaseとの差はみられなかった。シスプラチンによるNa<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase活性の阻害機構と、活性阻害を軽減する薬物について検討した。シスプラチンは濃度のみならず時間にも依存して活性を阻害した。活性阻害はチオール化合物である2-メルカプトエタノール（2-ME）、ダイチオスレイトール（DTT）、グルタチオンを添加すると経時的に回復した。次にNa<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPaseの分子構造変化がシスプラチンによる活性阻害に影響するか否かを確かめるため、シスプラチンによる活性阻害に対するNa<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>、ATPの影響を

調べた。 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、ATP非存在下では、酵素活性は4時間後には完全に阻害されたが、ATP単独添加により20%、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ の単独、あるいは両者を同時に添加することによって約40%の活性が残存した。

#### 考察および結論

精製に用いた方法は、ATP存在下で酵素の活性中心を保護しながら、SDSで酵素を可溶化して精製する方法である。この方法のポイントはSDSの濃度である。細胞の場合には低濃度のSDS処理でよいことが分かり、培養細胞の $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ -ATPaseの精製を行う上で、有用な結果が得られた。今回の結果からは、癌細胞と正常細胞の $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ -ATPaseの性質の違いはないと考えられる。チオール化合物がシスプラチンによる活性阻害を直接保護しうることを示し、シスプラチンによる腎毒性を軽減する方法とその機構を考える上で興味深い結果を得た。シスプラチンによる活性阻害の時間経過は存在するリガンドによって異なり、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ -ATPaseの活性中心付近のシステイン残基近傍の構造がシスプラチンが結合しにくい構造に変化する可能性があり、シスプラチンの $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ -ATPaseへの結合モデルを考える上で興味深い結果が得られた。

1. ヒト培養骨肉癌細胞株からシスプラチンの阻害作用を詳細に解析するのに十分な精製度の $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ -ATPaseを簡便に部分精製する方法を確立した。
2. 癌細胞株と腎臓の $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ -ATPaseには性質の違いはみられなかった。
3. DTT、2-ME、グルタチオンなどのチオール化合物はシスプラチンによる $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ -ATPase活性阻害を可逆的に回復しうることを、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ -ATPaseの分子構造の変化がシスプラチンによる活性阻害に影響すると考えられた。

続いて、審査担当者から本研究およびその関連事項について、以下のような種々の質問がされた。

- 1) 実験方法に関して、
    - (1) 本研究で使用した $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ -ATPase標品と従来の研究に使用されていた標品とはどんな点で違うのか？
    - (2) 工夫した点
  - 2) 実験結果に関して、
    - (1) 図表などに関する詳細
    - (2) 腎で、Naのみに差があることについて
  - 3) 本研究の独創性、本研究の今後の発展性および臨床応用について
  - 4) その他 ATPaseの分子構造の変化についてなど
- これらの質問に対して、論文提出者はそれぞれ明快に回答した。

以上より、本論文提出者が、本論文を中心に広い知識を有することが確認された。また、本論文は、研究の方向性および臨床との関連性がはっきりしており、さらに、現時点での問題点、今後の発展性が明確であることも高く評価された。

したがって、本論文の提出者が博士（歯学）を授与するに値するものと判定された。