

学 位 論 文 題 名

ネダプラチンの Na^+ , K^+ -ATPase 活性阻害と
ヒト腎由来近位尿細管細胞に対する作用

学位論文内容の要旨

【目的】

プラチナ系抗がん剤が誘発する腎毒性の詳細な機構はまだ不明であるが、 Na^+ , K^+ -ATPase 活性の抑制が腎臓における近位尿細管の機能変化に関与するとされている。プラチナ系抗がん剤であるネダプラチン (NDP) はシスプラチンより抗がん作用が強く、腎毒性は少ないとされているものの、臨床で用いる場合は水分負荷が必要であり、腎障害は主な副作用のひとつとしてあげられている。しかし、NDP の腎毒性に関する詳細な報告は少なく、 Na^+ , K^+ -ATPase に対する作用については報告が見られない。そこで、NDP による腎毒性の機構とその予防法を明らかにすることを目的として、NDP による Na^+ , K^+ -ATPase 活性阻害とヒト腎由来近位尿細管細胞に対する作用について検討した。

【方法】

1. NDP によるブタ腎 Na^+ , K^+ -ATPase 活性阻害

1) ブタ腎 Na^+ , K^+ -ATPase 活性と NDP による阻害の測定

ブタ腎臓より精製した Na^+ , K^+ -ATPase を含む反応液に、種々の濃度の NDP を添加し、その後 ATP を加えて反応を行ったのち、酵素反応の結果生じた無機リン酸を定量した。

2) NDP 存在下で抑制された Na^+ , K^+ -ATPase 活性の含硫化合物による回復の測定

同様に酵素を含み NDP 濃度が 2mM となる反応液をブレインキュベーションした後に、含硫化合物である 2-メルカプトエタノール、ジチオスレイトール、グルタチオンあるいはジエチルジチオカルバメートを加え、その後、ATP を加え反応を行った。以後の操作は上記に従った。

2. NDP のヒト腎由来近位尿細管細胞(HRPTE cell)に対する作用

1) NDP の HRPTE cell に対する作用の評価

HRPTE cell と腎上皮細胞用増殖培地は Bio Whittaker 社より購入した。細胞を種々の濃度の NDP を添加した培地で培養し、その後、細胞を超音波破碎し、そのホモジェネートを用いてタンパク質量、 Na^+ , K^+ -ATPase 活性、酸性ホス

ファクターゼ活性を測定した。

2) NDP 存在下の HRPTE cell に対する 2ME の作用

細胞を 20 μ M の NDP と同時に種々の濃度の 2ME を添加した培地で培養した。以後の操作は上記に従った。

3) HRPTE cell の生存度に対する NDP と 2ME の作用

細胞を種々の濃度の NDP と 2ME を加えた培養液で培養した。Lumi Tech 社より購入した ViaLight HS を用いて、培養液中の ATP を測定した。

4) NDP による HRPTE cell のアポトーシスの検出

20 および 200 μ M の NDP を含んだ培養液で細胞を培養した。回収細胞から DNA 断片を抽出し、アガロースゲル電気泳動した後、DNA ラダーを検出した。

【結果】

1. NDP のブタ腎 Na^+ , K^+ -ATPase 活性に対する作用

1) NDP によるブタ腎 Na^+ , K^+ -ATPase 活性阻害

NDP はその濃度とプレインキュベーション時間に依存して Na^+ , K^+ -ATPase 活性を阻害した。

2) NDP 存在下の Na^+ , K^+ -ATPase 活性の含硫化合物による回復

2mM の NDP を添加後 120 分で活性は約 40% まで低下したが、この時点で、2ME を添加すると、 Na^+ , K^+ -ATPase 活性は添加した 2ME の濃度と時間に依存して活性化された。他の含硫化合物を用いた実験でも、その添加濃度に依存して ATPase 活性を回復した。しかし、その活性回復の程度は 2ME でもっとも高かった。

2. NDP の HRPTE cell に対する作用

1) 細胞増殖および酵素活性の抑制

NDP 濃度に依存した細胞の増殖抑制が光学顕微鏡下で観察され、回収細胞から求めたタンパク質量も、NDP 濃度に依存して減少した。

Na^+ , K^+ -ATPase 活性は、総活性および一定タンパク質量あたりの活性すなわち比活性のいずれも NDP 濃度に依存して低下した。さらに酸性ホスファターゼの総活性と比活性は、どちらも NDP 濃度に依存して低下したが、比活性の低下は Na^+ , K^+ -ATPase 活性の場合より軽度であった。

2) NDP 存在下のタンパク質量および酵素活性の低下に対する 2ME の回復作用

臨床血漿濃度と言われる 20 μ M の NDP と同時に種々濃度の 2ME を添加して細胞を培養したところ、2ME を 20 μ M 添加した際にタンパク質量は有意に増加した。 Na^+ , K^+ -ATPase 活性および酸性ホスファターゼ活性も、20 μ M の 2ME を添加した際に総活性が有意に増加し、比活性も軽度に増加した。

3) NDP 存在下の HRPTE cell の生存度と 2ME の効果

NDP 濃度に依存した細胞死が観察された。NDP 濃度が 20 μ M 以下では、細胞は 80% 以上の生存度であったが、80 μ M 以上の濃度ではほぼ 100% 死滅した。

20 μ M の NDP と同時に種々の濃度の 2ME を添加した際の生存度は 150 μ M

以下で増加し、 $10\mu\text{M}$ では約 150%と最大であった。また $600\mu\text{M}$ 以上では NDP 単独より生存度は低下した。

4) NDP による HRPTE cell のアポトーシス

NDP 非存在下あるいは $20\mu\text{M}$ NDP 存在下では DNA ラダーは観察されなかったが、 $200\mu\text{M}$ では観察され、細胞死にアポトーシスが関与することが示された。

【考察】

1. NDP によるブタ腎 Na^+ , K^+ -ATPase 活性阻害と含硫化合物による回復

近位尿細管の機能は、腎における糸球体濾過量の約 75%を再吸収することであり、この再吸収は Na^+ , K^+ -ATPase が近位尿細管細胞においてナトリウムを輸送することにより生じる浸透圧の変化により受動的に行われている。この Na^+ , K^+ -ATPase の近位尿細管における重要な機能を考えると、NDP が引き起こす Na^+ , K^+ -ATPase 活性の阻害が腎毒性の原因のひとつになりうると推測される。

含硫化合物はその添加濃度に依存して NDP によって阻害されたブタ腎 Na^+ , K^+ -ATPase 活性を可逆的に回復した。これらの薬物は Na^+ , K^+ -ATPase 活性を回復することにより NDP の腎毒性を軽減できる可能性を持つことを示唆している。

2. NDP の HRPTE cell に対する作用と 2ME の効果

1) NDP による細胞死とその機構

NDP 存在下での細胞増殖の抑制は、回収した培養細胞のタンパク質量の減少および生存度試験の結果から NDP による細胞死であると確認された。また、DNA ラダー検出の結果、高濃度の NDP による細胞死の機構にアポトーシスが関与していることが示唆された。

2) NDP による HRPTE cell の酵素活性阻害と 2ME の保護効果

細胞死を引き起こす濃度の NDP による酵素活性の低下には、細胞死による細胞数の減少以外に、NDP による直接的な酵素活性の抑制も関与しているものと考えられる。

至適濃度の 2ME は NDP 存在下での酵素活性の低下を抑制することができるのみならず、細胞死も抑制した。これらの結果は、2ME は酵素活性を保護することによって、NDP の近位尿細管細胞に対する毒性を軽減できる可能性を示唆する。

しかし、NDP は、酵素などタンパク質に対すると同時に DNA に対してもクロスリンク作用などを示し、これら両者の結果が総合的な腎毒性発現機構であると考えられる。そのため、より詳細な腎毒性機構の解明には、更なる研究が必要である。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 福 田 博

副 査 教 授 鈴 木 邦 明

副 査 教 授 田 村 正 人

学 位 論 文 題 名

ネダプラチンの Na^+ , K^+ -ATPase 活性阻害と ヒト腎由来近位尿細管細胞に対する作用

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。論文提出者は研究内容を明快に説明した。

論文の概要は以下の通りである。

【目的】ネダプラチン(NDP)による腎毒性の機構とその予防法を明らかにすることを目的として、 Na^+ , K^+ -ATPase活性阻害とヒト腎由来近位尿細管細胞(HRPTE cell)に対する作用について検討した。

【方法】

1. NDPによるブタ腎 Na^+ , K^+ -ATPase活性阻害

1) 活性阻害の測定

ブタ腎臓より精製した Na^+ , K^+ -ATPaseを含む反応液に、NDPを添加し、その後ATPを加えて反応を行ったのち、酵素反応の結果生じた無機リン酸を定量した。

2) 含硫化合物による活性回復の測定

同様に酵素を含みNDP濃度が2mMとなる反応液をブレインキュベーションした後に、含硫化合物である2-メルカプトエタノール(2ME)、ジチオスレイトール、グルタチオンあるいはジエチルジチオカルバメートを加え、その後、ATPを加え反応を行った。以後の操作は上記に従った。

2. NDPの HRPTE cellに対する作用

1) HRPTE cellを種々の濃度のNDPを添加した培地で培養し、そのタンパク質量、 Na^+ , K^+ -ATPaseと酸性ホスファターゼ活性を測定した。

2) 細胞を20 μM のNDPと同時に種々の濃度の2MEを添加した培地で培養した。以後の操作は上記に従った。

3) 細胞を種々の濃度のNDPと2MEを加えた培養液で培養し、そのATPを測定した。

4) 20および200 μM のNDPを含んだ培養液で細胞を培養した。回収細胞からDNA断片を抽出し、アガロースゲル電気泳動した後、DNAラダーを検出した。

【結果と考察】

1. NDPのブタ腎 Na^+ , K^+ -ATPase活性に対する作用

- 1) NDPはその濃度とプレインキュベーション時間に依存して Na^+ , K^+ -ATPase活性を阻害した。
- 2) NDPにより低下した酵素活性は2MEを添加後、2MEの濃度と時間に依存して活性化された。他の含硫化合物を用いた実験でも同様の結果であったが、その酵素活性の回復の程度は2MEがもっとも高かった。

2. NDPのHRPTE cellに対する作用

- 1) NDP濃度に依存した細胞の増殖抑制が光学顕微鏡下で観察され、回収細胞から求めたタンパク質量も、NDP濃度に依存して減少した。

Na^+ , K^+ -ATPaseおよび酸性ホスファターゼは、総活性および一定タンパク質量あたりの活性すなわち比活性のいずれもNDP濃度に依存して低下した。

- 2) $20\text{ }\mu\text{M}$ NDPと同時に2MEを $20\text{ }\mu\text{M}$ 添加した培養の際にタンパク質量は有意に増加した。酵素活性の上昇も同様であった。

- 3) NDP存在下のHRPTE cellの生存度は、NDP濃度に依存し低下した。 $20\text{ }\mu\text{M}$ のNDPと同時に2MEを添加した際のHRPTE cellの生存度は2ME $150\text{ }\mu\text{M}$ 以下で増加し、 $10\text{ }\mu\text{M}$ では約150%と最大であった。

- 4) NDP非存在下あるいは $20\text{ }\mu\text{M}$ NDP存在下ではDNAラダーは観察されなかったが、 $200\text{ }\mu\text{M}$ では観察され、高濃度のNDPによる細胞死にアポトーシスの関与が示唆された。

NDPによる酵素活性の低下には、細胞死による細胞数の減少以外に、NDPによる直接的な酵素活性の抑制が関与しているものと考えられ、それにより引き起こされる近位尿細管の機能変化が腎毒性の機構の一つになりうると推測された。また、2MEが酵素活性を保護することによって、NDPの近位尿細管細胞に対する毒性を軽減する可能性が示唆された。

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種々の質問がされた。

実験法に関して

- 1) 精製 Na^+ , K^+ -ATPase活性阻害の回復の実験で含硫化合物をNDPの後から入れる理由やATPを加えるタイミングについて

実験結果に関して

- 2) 精製 Na^+ , K^+ -ATPaseに対する実験において、NDPによる活性阻害が時間依存で起こる理由やその活性回復の程度が含硫化合物の種類で異なる理由について
- 3) HRPTE cellを用いた実験において、NDPや2MEによりタンパク質量や酵素活性の変化が起こる主因ならびにNDPの細胞への移行経路と作用について

臨床的な事項として

- 4) 臨床で用いられているプラチナ系抗がん剤の各々の特徴、腎毒性軽減に用いられている薬剤ならびに2MEを臨床応用するにあたっての問題点について
- 5) 本実験の今後の展望について

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、本論文内容が高く評価されるとともに、本論文提出者は、本研究を中心に広い知識を有し、博士（歯学）を授与するに値するものと判定された。