

学位論文題名

The effects of platinum-containing anti-cancer drugs
on Na^+ , K^+ -ATPase activity in pig kidney and
human renal proximal tubule epithelial cells

(白金含有抗癌剤がブタ腎 Na^+ , K^+ -ATPase 活性および
ヒト腎由来近位尿細管細胞に及ぼす影響)

学位論文内容の要旨

【目的】白金含有抗癌剤による腎 Na^+ , K^+ -ATPase 活性阻害と腎毒性発現との関連を明らかにする事を目的に、ヒト腎由来近位尿細管細胞(HRPTE cell)とブタ腎臓から精製した Na^+ , K^+ -ATPase を用いて阻害様式の詳細な検討や、各種薬剤による活性阻害からの回復効果や Na^+ , K^+ -ATPase 分子構造変化の影響などについて検討した。

【材料と方法】 Na^+ , K^+ -ATPase はブタ腎髄質外帯部より調整したミクロソームを DOC および NaI 処理して精製した。また N-エチルマレイミド (NEM) 処理酵素の調整は Nagai らの方法に準じた。 Na^+ , K^+ -ATPase 活性測定は ATP の加水分解により生じた無機リンを Chifflet 法により測定した。

実験は以下に関して行なった。

- 1) HRPTE cell に種々の濃度の白金含有抗癌剤 (シスプラチン, ネダプラチン, カルボプラチン) を添加して培養し, 細胞の生存度を評価した。
- 2) 前述の白金含有抗癌剤が精製腎 Na^+ , K^+ -ATPase 活性に与える影響について調べた。
- 3) シスプラチンによる Na^+ , K^+ -ATPase 活性阻害がチオール化合物などにより回復するか否かについて 2-メルカプトエタノール (2-ME), 還元型グルタチオン(GSH), 酸化型グルタチオン (GSSG), システイン (Cys), チオ硫酸ナトリウム(STS), 硫酸ナトリウム (Na_2SO_4), フォスフォマイシン (FOM) を用いて調べた。
- 4) Na^+ , K^+ -ATPase 活性の回復実験の結果から, シスプラチンによる活性阻害は Na^+ , K^+ -ATPase のチオール基への直接的な化学結合により生じることが示唆された。そこで NEM 処理により Na^+ , K^+ -ATPase 活性中心近傍

のチオール基を保護し、シスプラチンによる活性阻害への影響を調べた。

- 5) 前述の NEM 処理 Na^+, K^+ -ATPase に対するシスプラチンによる阻害の結果から、 Na^+, K^+ -ATPase の分子構造変化がシスプラチンの感受性に影響を与えることが推察された。 Na^+, K^+ -ATPase はナトリウム結合型とカリウム結合型での構造が明らかに異なる事が知られている。そこで Na^+, K^+ -ATPase の構造変化とシスプラチンによる活性阻害の関連を検討するため、ナトリウムイオンとカリウムイオンの影響について調べた。

【結果】

- 1) 3種の白金含有抗癌剤は濃度依存性に HRPTE cell の生存細胞数を減少させ、その程度はシスプラチン、ネダプラチン、カルボプラチンの順に強かった。
- 2) シスプラチン、ネダプラチン、カルボプラチンは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。その強さは、シスプラチン、ネダプラチン、カルボプラチンの順であり、HRPTE cell の生存数を減少させる強さの順序と一致した。
- 3) シスプラチンにより低下した Na^+, K^+ -ATPase 活性はチオール基を持つ 2-ME, Cys, GSH, STS の添加により、程度の差はあるものの、その濃度とインキュベーション時間に依存して回復が認められた。一方 GSSG, Na_2SO_4 , FOM ではシスプラチンによって阻害された活性は回復しなかった。
- 4) シスプラチンによる NEM 処理 Na^+, K^+ -ATPase の活性阻害は、シスプラチン 0.5 mM 存在下では NEM 未処理酵素の方が NEM 処理酵素より強く、シスプラチン 2.0 mM 存在下では逆に NEM 処理酵素の方が阻害は強かった。
- 5) ナトリウムとカリウム非存在下の Na^+, K^+ -ATPase 活性は 0.5 mM のシスプラチン存在下で 180 分インキュベーションすると 5%以下に低下した。しかしカリウム 16 mM のみでは 40%，ナトリウム 160 mM のみ、あるいはナトリウム 160 mM とカリウム 16 mM 存在下では 50%にそれぞれ活性は低下した。

【考察】白金含有抗癌剤の投与量規制因子は腎毒性であるが、その詳細は必ずしも明確ではない。 Na^+, K^+ -ATPase は腎で重要な働きをしていること、シスプラチンが Na^+, K^+ -ATPase 活性を阻害することから、白金含有抗癌剤による腎 Na^+, K^+ -ATPase 活性阻害が腎毒性に関与している可能性があると考え、本研究をおこなった。まず HRPTE cell にシスプラチン、ネダプラチン、カルボプラチンが与える影響について検討し、さらにブタ腎から Na^+, K^+ -ATPase を精製して

詳細に検討した。その結果、三剤とも濃度に依存して生存細胞数を減少させ、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。その強さはシスプラチン、ネダプラチン、カルボプラチンの順であった。本実験結果は腎 Na^+, K^+ -ATPase の阻害が白金含有抗癌剤による腎毒性の機序の一因である事を示唆する。

臨床において腎毒性軽減目的にチオール基を持つ薬剤が使用されることから、シスプラチンにより阻害された Na^+, K^+ -ATPase 活性のチオール化合物による回復効果について検討した結果、チオール基をもつ 2-ME, Cys, GSH, STS により部分的に回復効果が認められた。その回復機序については明確にはできなかったが、チオール化合物はシスプラチンよりも Na^+, K^+ -ATPase のチオール基と高い親和性があり、酵素とシスプラチンとの結合を解離させて結合することで活性を回復している可能性が考えられた。そこで NEM 処理により Na^+, K^+ -ATPase の活性発現に必須とされる活性中心近傍のチオール基を保護してシスプラチンの影響を検討したが、シスプラチンによる活性阻害を効果的に保護することはなかった。これはシスプラチンの結合部位がわれわれの予想した結合部位と異なるためと考えられ、今後さらに検討する必要がある。しかし、NEM 処理の有無によるシスプラチンの感受性はシスプラチン濃度により異なっていたことから、NEM 処理により Na^+, K^+ -ATPase の分子構造に変化が生じてシスプラチンとの親和性に変化が生じたこと、さらにシスプラチンの結合部位が複数存在する可能性が示唆された。 Na^+, K^+ -ATPase の構造変化については広く研究されており、その特徴としてナトリウム結合型とカリウム結合型の構造は明らかに異なる事が知られている。そこで Na^+, K^+ -ATPase の構造変化とシスプラチンによる活性阻害の関連を検討するため、ナトリウムとカリウムイオンの影響について検討した。その結果、ナトリウムとカリウム非存在下では相対活性は著明に低下し、この条件での Na^+, K^+ -ATPase の分子構造はシスプラチンとの結合部位が広く露出する形になるためと考えられた。さらにシスプラチンの結合部位はカリウム結合型のほうがナトリウム結合型よりも露出することが示唆された。すなわち、シスプラチンの Na^+, K^+ -ATPase への結合には Na^+, K^+ -ATPase の分子構造変化が影響を与えることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 北 川 善 政

副 査 教 授 鈴 木 邦 明

副 査 教 授 田 村 正 人

学位論文題名

The effects of platinum-containing anti-cancer drugs on Na^+ , K^+ -ATPase activity in pig kidney and human renal proximal tubule epithelial cells

(白金含有抗癌剤がブタ腎 Na^+ , K^+ -ATPase 活性およびヒト腎由来近位尿細管細胞に及ぼす影響)

本研究は口腔癌をはじめとする固形癌治療に広く用いられている白金含有抗癌剤による腎毒性発現と腎 Na^+ , K^+ -ATPase 活性阻害との関連を検討する事を目的に、ヒト腎由来近位尿細管細胞(HRPTE cell)とブタ腎臓から精製した Na^+ , K^+ -ATPase を用いて白金含有抗癌剤による生存度への影響や酵素活性の阻害様式の詳細な検討、各種薬剤による活性阻害からの回復効果や Na^+ , K^+ -ATPase 分子構造変化の影響などについて検討したものである。

まず HRPTE cell に 3 種の白金含有抗癌剤を種々の濃度で添加して培養し、細胞生存度を評価したところ、臨床的な腎毒性の強さに一致してシスプラチン、ネダプラチン、カルボプラチンの順にほぼ濃度依存性に HRPTE cell の生存細胞数を減少させた。そこで腎精製 Na^+ , K^+ -ATPase を用いて活性への影響を調べたところ、3 剤とも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、その程度もシスプラチン、ネダプラチン、カルボプラチンの順であり、白金含有抗癌剤による Na^+ , K^+ -ATPase 活性の阻害が腎毒性の一因である可能性が示唆された。つぎにシスプラチンについて詳細に検討した。シスプラチンによる腎毒性はある種の含硫化合物により軽減されることが知られているため、シスプラチンにより低下した Na^+ , K^+ -ATPase 活性が回復するか否かを各種薬剤で検討したところ、程度の差はあるもののチオール基を持つ 2-ME, Cys, GSH などの添加によりその濃度とインキュベーション時間に依存して回復が認められた。一方、チオール基を持たない GSSG, Na_2SO_4 , FOM ではシスプラチンによって阻害された活性は回復しなかったことから、チオール化

合物は Na^+, K^+ -ATPase 活性の回復により腎毒性を軽減する可能性が示唆された。さらにシスプラチンの結合部位を検討するため NEM 処理 Na^+, K^+ -ATPase を用いて活性阻害の変化を調べたところ、NEM 処理による Na^+, K^+ -ATPase の分子構造に変化が生じてシスプラチンとの親和性に変化が生じたこと、さらに結合部位が複数存在する可能性を示唆する結果であった。そこでナトリウムとカリウム濃度を変化させて Na^+, K^+ -ATPase の分子構造変化との関連を検討したところ、カリウムよりナトリウムのほうが活性阻害に対する保護効果が高いことから、シスプラチンの Na^+, K^+ -ATPase への結合には Na^+, K^+ -ATPase の分子構造変化が影響を与えることが示唆された。

試問では、本論文の内容とその関連事項について質疑応答がなされたが、これらに対して学位申請者は本研究から得た知見と文献を引用して適切な回答を行い、本研究はもとより、専門および関連領域についても十分な学識と理解を有していることが認められた。

本研究は、現在口腔領域のみならず悪性腫瘍に頻用されている白金含有抗癌剤の腎毒性の作用機序解明とその予防に向けて、白金含有抗癌剤と腎 Na^+, K^+ -ATPase との関連を検討した極めて有意義な研究であると判断された。

以上より、審査委員は全員、本研究が学位論文に十分値し、申請者が博士（歯学）の学位に値するものと認められた。