

口腔扁平上皮癌細胞のシスプラチン感受性における

Na, K-ATPase の役割とシスプラチンによる

Na, K-ATPase 活性阻害

学位論文内容の要旨

【目的】白金系抗癌剤であるシスプラチンは精巣、卵巣、子宮、肺、頭頸部などのヒトの悪性腫瘍の治療に有効であるが、シスプラチンに対する耐性の形成や、腎毒性が投与の規制因子となる。動物細胞の形質膜に存在して、ATPの加水分解エネルギーを用いて Na^+ と K^+ の能動輸送を行う酵素であるNa, K-ATPaseは、シスプラチンの細胞内への輸送に関与しているとされる。シスプラチンによるNa, K-ATPaseの阻害は、抗腫瘍効果と腎毒性の両者に関係すると考えられている。本研究は、白金系抗癌剤であるシスプラチンに対する癌細胞の耐性化におけるNa, K-ATPaseの役割と、シスプラチンのNa, K-ATPase活性抑制機構を調べることを目的に行った。

【材料および方法】研究にはHSC-2、HSC-3、HSC-4、Ca9-22、BHYおよびTYSの6種類の口腔扁平上皮癌細胞を使用し、細胞内のATP含量を指標に生存細胞数を推定することによってシスプラチンに対する感受性を比較した。Na, K-ATPaseとCu-ATPase活性は、ATPの加水分解から生じた無機リンをChifflet法により定量して測定した。Na, K-ATPase、Cu-ATPaseおよびP-glycoproteinの発現をウエスタンブロッティングにより検出した。細胞内のシスプラチン量はICP発光分光分析により白金量を定量して測定した。また、ウサギ脳からPostらの方法によりNa, K-ATPaseを精製して、シスプラチンと白金による活性阻害の実験に用いた。

【結果と考察】1) 6種類の口腔扁平上皮癌細胞をコンフルエントに達するまで培養したところで、各種濃度のシスプラチンを24時間添加した後に生存細胞を検出した。各細胞の生存数はシスプラチン濃度に依存して減少したが、HSC-3がもっとも低濃度で、BHYが高濃度で生存細胞が減少した。同様に1 mMのシスプラチン存在下での生存細胞数減少の時間経過を調べたところ、HSC-3で最も短

に対して最も感受性が高く、BHY は最も低かったので、以後の実験にはこの2種の細胞を使用した。2) HSC-3 と BHY 細胞の培養液に種々濃度のシスプラチンを添加して3時間後の細胞内シスプラチン蓄積量を測定した。両細胞内へのシスプラチン蓄積量はシスプラチン濃度に依存して増加したが、1 mM のシスプラチン存在下では、HSC-3 細胞内への蓄積量は BHY 細胞に比べて約3倍多かった。細胞からのシスプラチンの排出量を調べるために、1 mM のシスプラチン存在下で3時間シスプラチンを蓄積させた後に細胞を洗い、その後の細胞内シスプラチン量の経時変化を調べたが、両細胞において差は見られなかった。このことから、両細胞のシスプラチン感受性の違いは、細胞内への蓄積量の違いによるものと推定された。3) シスプラチンの細胞内への輸送には、Na, K-ATPase、Cu-ATPase あるいは P-glycoprotein が関与するとの報告がある。そこで、両細胞から調整したミクロソーム中の Na, K-ATPase 活性と Cu-ATPase 活性を測定した。その結果、HSC-3 細胞の Na, K-ATPase 活性は BHY に比べて約3倍高かったが、両細胞の Cu-ATPase 活性には違いが見られなかった。また、両細胞内への Cu^{2+} の取り込み量を比較したが差は見られなかった。これらの結果は、両細胞へのシスプラチンの取り込みに、Na, K-ATPase が関与することを示唆する。4) そこで、両細胞を Na, K-ATPase の特異的阻害剤であるウアバインで処理した後に細胞内へのシスプラチン蓄積の濃度依存性を調べたところ、HSC-3 細胞ではウアバイン非添加の10分の1程度に、BHY 細胞でも3分の1程度に細胞内へのシスプラチンの蓄積量は減少した。5) 次に、両細胞の Na, K-ATPase、Cu-ATPase あるいは P-glycoprotein のタンパク質の発現量を比較した。その結果、Na, K-ATPase の α 及び β サブユニット、Cu-ATPase である ATP7A 及び 7B の発現量は、いずれも HSC-3 細胞において BHY よりも多かった。P-glycoprotein は、両細胞ともほとんど発現していなかった。以上の結果は、口腔扁平上皮癌細胞のシスプラチンに対する感受性に Na, K-ATPase による細胞内へのシスプラチン輸送が関与していることを示唆する。

一方、シスプラチンが Na, K-ATPase 活性を抑制することもよく知られているが、その阻害の機構には不明な点も多いため、ウサギの脳から精製した Na, K-ATPase を用いて活性阻害実験を行った。1) Na, K-ATPase とシスプラチンのプレインキュベーション時間を一定にして活性低下のシスプラチン濃度依存性を 37°C で調べると、Na, K-ATPase 活性はシスプラチンの濃度に依存して低下した。2) シスプラチンの濃度を一定にして、Na, K-ATPase 活性とシスプラチンとのプレインキュベーション時間との関係を 37°C で調べると、活性はプレインキュベーション時間に依存して低下した。3) Na, K-ATPase 活性のシスプラチン濃度依存性の実験を氷上で行うと、シスプラチンによる活性阻害の程度は 37°C で行った実験の約 50% であった。4) シスプラチンが抗腫瘍効果を示すためには、シスプラチン分子の水和が重要であるとされている。そこで、シスプラチンによる Na, K-ATPase 活性阻害のプレインキュベーション時間依存性が、シスプラ

チン分子の水和に要する時間を反映するのか、あるいは、シスプラチン分子の Na, K-ATPase への結合に要する時間を反映するのかを調べることを目的として、シスプラチンのみを水溶液としてからの時間を変えて処理してから、Na, K-ATPase 活性の阻害実験を行った。その結果、水和時間の長短は活性の阻害の程度には影響しなかった。以上の結果から、シスプラチンはウサギ脳の Na, K-ATPase 活性を濃度、作用時間及び作用温度に依存して阻害した。また、作用時間に対する依存性はシスプラチンの水和による時間経過によるものではなかった。5) シスプラチンによる酵素タンパク質の阻害には、タンパク質の SH 基に対する結合が重要であるとの報告があることから、Na, K-ATPase 活性の阻害に対する 2-メルカプトエタノール (2-ME) の効果を調べたところ、2-ME 存在下では、シスプラチンによる活性阻害の 75%程度が保護された。6) Na, K-ATPase 活性は微量の重金属イオンにより阻害されるため、塩化白金の Na, K-ATPase 活性に対する作用を調べた。塩化白金はシスプラチンに比べてより低い濃度で Na, K-ATPase 活性を阻害し、この活性阻害に対する 2-ME による保護効果は見られなかった。以上の結果は、シスプラチンと白金は異なる機構により Na, K-ATPase に結合して活性を抑制することを示唆する。

【結論】Na, K-ATPase は細胞内へのシスプラチン輸送に関与して、口腔扁平上皮癌細胞のシスプラチン感受性を調節する。一方で、シスプラチンはその濃度、プレインキュベーション時間及び温度に依存して Na, K-ATPase 活性を阻害する。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 鈴 木 邦 明

副 査 教 授 北 川 善 政

副 査 教 授 田 村 正 人

学 位 論 文 題 名

口腔扁平上皮癌細胞のシスプラチン感受性における

Na, K-ATPase の役割とシスプラチンによる

Na, K-ATPase 活性阻害

審査は、全審査委員出席のもと行い、まず学位申請者に対して提出論文の内容の説明を求めた。学位申請者からは以下の内容の論述がなされた。

白金系抗癌剤であるシスプラチンに対する癌細胞の耐性化における Na, K-ATPase の役割と、シスプラチンの Na, K-ATPase 活性抑制機構を調べることを目的に本研究を行った。

研究には HSC-2、HSC-3、HSC-4、Ca9-22、BHY および TYS の 6 種類の口腔扁平上皮癌細胞を使用し、細胞内の ATP 含量を指標に生存細胞数を推定することによってシスプラチンに対する感受性を比較した。Na, K-ATPase と Cu-ATPase 活性を Chifflet 法により測定した。Na, K-ATPase、Cu-ATPase および P-glycoprotein の発現をウエスタンブロッティングにより検出した。細胞内のシスプラチン量は ICP 発光分光分析により白金量を定量して測定した。また、ウサギ脳から Na, K-ATPase を精製して、シスプラチンと白金による活性阻害の実験に用いた。

以下のような結果を得た。1) 6 種類の口腔扁平上皮癌細胞の生存数はシスプラチン濃度に依存して減少したが、HSC-3 がもっとも低濃度で、BHY が高濃度で生存細胞が減少した。同様に生存細胞数減少の時間経過を調べたところ、HSC-3 で最も短時間で、BHY では長時間で細胞数が減少した。HSC-3 がシスプラチンに対して最も感受性が高く、BHY は最も低かったので、以後の実験にはこの 2 種の細胞を使用した。2) HSC-3 と BHY 細胞の細胞内シスプラチン蓄積量はシスプラチン濃度に依存して増加し、HSC-3 細胞内への蓄積量は BHY 細胞に比べて約 3 倍多かった。細胞からのシスプラチンの排出量の経時変化は両細胞において差

は見られず、両細胞のシスプラチン感受性の違いは、細胞内への蓄積量の違いによるものと推定された。3) HSC-3 細胞から調整したミクロソーム中の Na, K-ATPase 活性は BHY に比べて約 3 倍高かったが、Cu-ATPase 活性には違いが見られなかった。4) Na, K-ATPase の特異的阻害剤であるウアバイン存在下では、HSC-3 細胞内へのシスプラチン蓄積量は非存在下の 10 分の 1、BHY 細胞でも 3 分の 1 程度に減少した。5) Na, K-ATPase と Cu-ATPase の発現量は HSC-3 細胞において BHY よりも多かった。P-glycoprotein は両細胞ともほとんど発現していなかった。これらの結果から、口腔扁平上皮癌細胞のシスプラチンに対する感受性には Na, K-ATPase による細胞内へのシスプラチン輸送が関与していると考えた。

ウサギの脳から精製した Na, K-ATPase を用いて活性阻害実験を行った。1) シスプラチンはウサギ脳の Na, K-ATPase 活性を濃度、作用時間及び作用温度に依存して阻害した。また、作用時間に対する依存性はシスプラチンの水和による時間経過によるものではなかった。2) 2-メルカプトエタノール (2-ME) 存在下では、シスプラチンによる活性阻害の 75%程度が保護された。3) 塩化白金はシスプラチンに比べてより低い濃度で Na, K-ATPase 活性を阻害し、この活性阻害に対する 2-ME による保護効果は見られなかった。

以上の結果をまとめると、Na, K-ATPase は細胞内へのシスプラチン輸送に関与して、口腔扁平上皮癌細胞のシスプラチン感受性を調節する。一方で、シスプラチンはその濃度、プレインキュベーション時間及び温度に依存して Na, K-ATPase 活性を阻害する。

以上の論述に引き続き、各審査委員より提出論文の内容ならびにそれに関連のある学術について口頭により質疑および試問が行われた。主な試問内容としては、本研究目的および結果とシスプラチンの抗癌作用および腎毒性、シスプラチンの細胞内動態における Na, K-ATPase および Cu-ATPase の役割、シスプラチンの活性型への代謝過程、シスプラチンの腎毒性軽減のための臨床応用、研究に用いた6種類の口腔扁平上皮癌細胞との関連性などがあり広範囲にわたった。いずれの質問に対しても学位申請者から適切かつ明快な回答が得られた。また、今後の研究の方向性と将来の展望などについても明確な方針が示された。

本論文の内容は高いレベルにあり、今後のこの分野の研究の発展に大きく寄与するものと考えられた。加えて、試問の結果より学位申請者は専攻分野の専門領域のみならず関連分野についても十分な学識を有していることが認められた。従って、学位申請者は、博士(歯学)の学位を授与されるのにふさわしいと認められた。