

論文要旨

Isolation and characterization of arsenite resistant human epidermoid carcinoma KB cells

〔 ヒト類表皮がん KB 細胞亜硫酸耐性株の樹立
及びその解析 〕

立和田 得志

【序論および目的】

近年、亜硫酸は急性前骨髄性白血病に対して治療効果が示された。他の固形癌に対しても新規の抗がん剤として期待されており、食道癌や前立腺癌などで効果が示されている。しかし、亜硫酸も他の抗がん剤と同様に、薬剤耐性により治療効果が制限されている。我々は、ヒト類表皮がん KB3-1 より亜硫酸耐性株 KAS を樹立し、亜硫酸の耐性機序について解析した。

【材料および方法】

1. KB-3-1 の培地に亜硫酸を低濃度 ($5\mu\text{M}$) より添加して選択し KAS を樹立した。
2. 親株と耐性株の亜硫酸の感受性検査を MTT assay にて測定した。他に、アンチモン・CDDP・VCR・ADM・paclitaxel の感受性検査も行った。
3. 親株と耐性株の亜硫酸の細胞内蓄積及び細胞外への排出を、原子吸光度計を用い測定した。
4. 亜硫酸の耐性に関与していると報告のある ABC トランスポーター (p 糖蛋白・MRP1・MRP2) について、蛋白及び mRNA レベルで発現解析を行った。
5. 耐性克服薬 (MRP1 阻害薬・GSH 合成酵素阻害薬) を用い、薬剤感受性検査及び蓄積実験を行った。また、細胞内の GSH 濃度を測定し耐性への関与について解析した。

【結 果】

1. KAS は親株に比較し、亜硫酸に対して 22 倍の耐性を認めた。また、他の抗がん剤にも耐性を認める多剤耐性株であった。
2. KAS は親株に比較し、亜硫酸を ATP 依存性に細胞外へ排出することにより細胞内の蓄積が減少していた。
3. KAS は親株に比較し、MRP1 の発現上昇が認められた。p 糖蛋白・MRP2 の明らかな発現の上昇は認められなかった。
4. GSH 合成阻害剤 BSO でほぼ完全に耐性は克服された。また、MRP1 阻害剤は部分的に耐性を克服した。
5. KAS では親株に比較し細胞内 GSH 濃度は約 3 倍上昇していた。また、BSO により KAS の亜硫酸の細胞内蓄積は上昇した。

【結論及び考察】

KAS の亜硫酸耐性機序として、細胞内の GSH 濃度の上昇及び亜硫酸の能動的細胞外排出が考えられた。p 糖蛋白・MRP1・MRP2 と異なる亜硫酸排出ポンプの存在が示唆された。

論文審査の要旨

報告番号	医研第 661 号	氏名	立和田 得志
審査委員	主査	小澤 政之	
	副査	米澤 傑	有馬 直道

Isolation and characterization of arsenite resistant human epidermoid carcinoma KB cells

(ヒト鼻咽腔細胞癌 KB 細胞亜ヒ酸耐性株の樹立及びその解析)

近年、亜ヒ酸は急性前骨髄性白血病に対して治療効果が示された。他の固形癌に対しても新規の抗癌剤として期待されており、食道癌や前立腺癌細胞株などで効果が示されている。しかし、亜ヒ酸も他の抗癌剤と同様に、薬剤耐性により治療効果が制限されている。本研究は、ヒト鼻咽腔細胞癌 (KB-3-1) より亜ヒ酸耐性株 (KAS) を樹立し、亜ヒ酸の耐性機序について解析することを目的とした。

KB-3-1 の培地に亜ヒ酸を低濃度(5 μ M)より添加して選択し KAS を樹立した。MTT assay にて KAS は KB-3-1 に比較して 22 倍の亜ヒ酸耐性を認め、他の抗癌剤にも交差耐性を認める多剤耐性株であった。KB-3-1 と KAS の亜ヒ酸の細胞内蓄積及び細胞外排出を原子吸光度計を用い測定したところ、KAS は KB-3-1 に比較し亜ヒ酸を ATP 依存性に細胞外へ排出することにより細胞内の蓄積が減少していた。

KAS において過去に報告のある ABC トランスポーター (P-糖蛋白・MRP1・MRP2) について、蛋白及び転写レベルで発現解析を行ったところ、P-糖蛋白・MRP2 の発現上昇は認められなかった。親株に比較し MRP1 の発現の上昇は若干認められたが、ポジティブコントロールとしておいた MRP1 強制発現株 (KB/MRP1) と比べその発現は軽度であった。KB/MRP1 は KB-3-1 に対しわずか 1.6 倍の亜ヒ酸耐性を認めるのみで、KAS の亜ヒ酸耐性機序においては MRP1 は部分的にしか関与していないと考えられた。耐性克服薬を用いた薬剤感受性検査では、GSH 合成阻害剤 buthionine sulfoximine (BSO) でほぼ完全に耐性は克服されたが、MRP1 特異的阻害剤では部分的にしか耐性は克服されなかった。細胞内の GSH 濃度を測定したところ、KAS では親株に比べ約 3 倍に上昇していた。また BSO により GSH の産生を抑えると亜ヒ酸の耐性は克服されるため、GSH の増加は亜ヒ酸耐性の機序の一つと思われた。さらに耐性克服薬を用いた蓄積実験では、BSO と複数の薬剤排出ポンプ阻害剤である PAK-104P にて、KAS の亜ヒ酸蓄積は親株と同程度まで上昇した。

以上より、KAS の亜ヒ酸耐性機序として、細胞内の GSH 濃度の上昇及び亜ヒ酸の能動的細胞外排出が考えられた。また、P-糖蛋白・MRP1・MRP2 と異なる亜ヒ酸排出ポンプの存在も示唆された。

本研究は、亜ヒ酸耐性機序の一部を解明し、亜ヒ酸を用いた今後の癌化学療法に大きく寄与する可能性がある。よって、本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	医研第 661 号	氏名	立和田 得志
審査委員	主査	小澤 政之	
	副査	米澤 傑	有馬 直道
<p>主査および副査の3名は、平成19年6月19日、学位請求者立和田 得志 君に対して、論文の内容について質疑応答を行うと共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。</p>			
<p>質問1) 亜ヒ酸の抗腫瘍効果の機序は？</p>			
<p>回答) 直接ミトコンドリアをターゲットにしてアポトーシスを起こすと言われているが、その詳細な機序は現在のところ解明されていない。</p>			
<p>質問2) 亜ヒ酸耐性株 (KAS) は 15 μM の亜ヒ酸で樹立している。蓄積実験は 80 μM とかなり高濃度の亜ヒ酸を用いているが、薬剤毒性による細胞死は問題とならないのか？</p>			
<p>回答) 親株の亜ヒ酸の IC_{50} は約 15 μM なので、最終的にほとんどの細胞は細胞死を起こすと思われるが、KAS の IC_{50} は 335 μM なので、細胞死は一部のみを起こると思われる。ただし、蓄積実験は亜ヒ酸を添加後2時間で解析を行っており、実験結果に細胞死の影響はほとんどないと考えられる。</p>			
<p>質問3) 排出実験を行う際に、親株と KAS では初期の亜ヒ酸の取り込みに大きな差があるのではないのか？</p>			
<p>回答) 亜ヒ酸を取り込ませる際には、ジニトロフェノール添加かつグルコース非添加培地を使用することにより、ミトコンドリアでの ATP の産生を抑え薬剤排出ポンプ機能を停止させた。そのため排出実験を始める時点での亜ヒ酸の細胞内の蓄積は親株と KAS の間に大きな差は認められなかった。</p>			
<p>質問4) 親株においてグルタチオン合成阻害剤である BSO を添加し蓄積実験を行った際に、BSO を添加していない時よりも細胞内の蓄積が減少しているのはなぜか？</p>			
<p>回答) BSO を添加によりグルタチオンの産生が抑制されるため、理論上は亜ヒ酸の細胞内蓄積は少なくとも減少することはないはずだが、本データは再現性が確認された。原因については他の機序が考えられ、今後さらなる検討が必要である。</p>			
<p>質問5) BSO や PAK-104 を KAS に添加した場合、亜ヒ酸の細胞内蓄積は同程度に上昇するのに、BSO の方が PAK-104P より耐性克服効果が大きいのはなぜか？</p>			
<p>回答) KAS の亜ヒ酸耐性の機序として、細胞内のグルタチオンの産生亢進と、亜ヒ酸を細胞外に排出するポンプにより細胞内蓄積が減少していると考えられる。グルタチオンの産生亢進が主な耐性機序であり、亜ヒ酸排出ポンプの役割は耐性機序のごく一部でしかないものと思われる。</p>			
<p>質問6) BSO を添加することによって、KAS の亜ヒ酸の細胞内の蓄積が上昇しているのはなぜか？</p>			
<p>回答) 亜ヒ酸とグルタチオンの抱合体を排出するポンプが存在するためと考えている。</p>			
<p>質問7) KAS は亜ヒ酸を 5 μM から添加濃度をあげ樹立しているが、selection されて耐性となったのか、それとも全体的に少しずつ細胞に変化がおきて耐性になっていったのか？</p>			
<p>回答) selection されて耐性になっていった可能性が高いと思われる。一般的に耐性株を樹立するとき、通常大部分の細胞が死んで、生き残った細胞が増殖する。過去の多剤耐性株の分離と解析の結果から考えると、耐性の形質を獲得した細胞だけが生き残っていると思われる。</p>			

- 質問 8) KAS において耐性克服薬 MK571 や ONO-1078 よりも PAK-104P が耐性を克服しているのはなぜか？
- 回答) leukotriene D4 (LTD4) 受容体拮抗阻害剤 MK571 と ONO-1078 は、multidrug resistance protein 1 (MRP1) の特異的阻害剤である。ピリジン誘導体 PAK-104P は、p 糖蛋白や MRP1 など複数のポンプ機能を阻害するが、その作用機序は未だ解明されておらず、KAS で発現していると思われる未知の亜ヒ酸排出ポンプの機能も阻害している可能性がある。
- 質問 9) 耐性克服薬を使用した実験で、BSO を 10 μ M で使用した理由は？
- 回答) BSO の最大無毒性濃度を確認したところ 100 μ M であった。実際 BSO 添加してみると、10 μ M で耐性克服効果があったので、その濃度で実験を行った。
- 質問 10) KAS を樹立するにあたり、亜ヒ酸の添加する濃度を少しずつ、しかも非常にゆっくりと上げているのには理由があるのか？
- 回答) 添加する亜ヒ酸の濃度を急に上げると、薬剤毒性により細胞継代が不可能であった。時間をかけて少しずつ亜ヒ酸の濃度を上げるにより耐性株を樹立することが可能となった。
- 質問 11) 排出実験において、ジニトロフェノールを添加した条件でも、親株・KAS とともに亜ヒ酸の細胞内の蓄積が減少しているのはなぜか？
- 回答) 完全には ATP の産生が抑えられていない可能性と、亜ヒ酸の能動的排出ポンプ以外の ATP に依存しない受動的な細胞外への排出の可能性を考えている。
- 質問 12) 今回の亜ヒ酸耐性株を樹立するにあたり、KB-3-1 を使用したのはなぜか？
- 回答) KB-3-1 は抗癌剤に対し非常に感受性が高く、細胞の増殖も速いうえに培養が容易であったことに加え MRP1 強制発現株なども KB-3-1 から樹立されており、解析に有用であったため。

以上の結果から、3 名の審査委員は本人が大学院博士課程修了者としての学力・識見を十分に具備しているものと判断し、博士（医学）の学位を与えるに足る資格を有するものと認めた。