

Cisplatin Resistance Mechanisms in Small Cell Lung Cancer Cell Line, N231/CDDP

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8350

小細胞肺癌培養細胞株 N231/CDDP における シスプラチン耐性機構の検討

金沢大学医学部内科学第三講座 (主任: 松田 保教授)

笠原 寿 郎

(平成3年8月16日受付)

小細胞肺癌化学療法における最大の問題点は抗癌剤, 特にシスプラチンに対する耐性である。しかしながら小細胞肺癌におけるシスプラチン耐性機構の検討は少ない。そこで本研究では小細胞肺癌培養細胞株 N231 とシスプラチン耐性株 N231/CDDP を用い, そのシスプラチン耐性機構を検討した。シスプラチン耐性株 N231/CDDP は親株の N231 に比較し, シスプラチンに対して4倍耐性を示した。シスプラチンの細胞内集積量は親株と耐性株の間に有意差を認めなかった。細胞内グルタチオン含量は親株, 耐性株間で有意差はなかった。塩化カドニウムに対しては交差耐性を示さなかったことよりメタロチオネインはこれらの耐性機構に関与していないと考えられた。細胞内グルタチオン S-トランフェラーゼ活性は, 耐性株である N231/CDDP で親株の4倍に上昇していた。グルタチオン S-トランフェラーゼの阻害剤であるエタクリン酸で処理した後, 感受性試験を行った実験ではそれぞれの細胞株で, シスプラチンに対する感受性の亢進がエタクリン酸の容量依存性に認められたが, 耐性を完全には克服できなかった。本研究の成績から, グルタチオン S-トランフェラーゼが N231/CDDP の感受性を規定する重要な因子であろうと考えられるが, シスプラチン耐性機構の全てを説明できない。

Key words 小細胞肺癌, シスプラチン耐性機構, グルタチオン S-トランフェラーゼ

シスプラチンは現在, 臨床上利用されているもっとも有効な抗癌剤である。その有効性は頭頸部癌¹⁾, 胃癌, 大腸癌等の消化器癌^{2,3)}, 睾丸腫瘍⁴⁾, 卵巣癌⁵⁾, そして肺癌⁶⁾で認められている。特に小細胞肺癌においては, シスプラチンを含む併用療法が高い奏効率を得ている⁷⁾。Roth ら⁸⁾はシスプラチン, エトポシドの併用療法で, 奏効率58%であったと報告している。また Tamura ら⁹⁾は未治療の小細胞肺癌に対して, シスプラチン, エトポシドの2剤とエンドキサン, アドリアマイシン, ビンクリスチンの交替化学療法で, 76.4%と高い奏効率を得たと報告している。しかしながら, その生存率は低く, 生存期間の中央値は前述の Roth ら⁸⁾, Tamura ら⁹⁾の報告では, それぞれ39週間, 10カ

月と長期生存は得られていない。これはいったんは強力な化学療法を行い腫瘍が縮小または消失しても, 短期間のうちに再発し, 再発の際は化学療法に対して治療抵抗性となるいわゆる薬剤耐性が小細胞肺癌化学療法上の大きな問題であり, 長期生存率の低い原因であると考えられる¹⁰⁾。小細胞肺癌化学療法の中心となるシスプラチンの感受性および耐性機序を解析することは, 薬剤耐性の克服ならびに新薬開発に不可欠である。

シスプラチンの耐性機構は多くの要素が関与していると考えられており, 生体内, 試験管内での検討の報告がなされている。シスプラチン耐性機構の中で重要と考えられている要素には, 薬剤の細胞内蓄積の減

Abbreviations: BSO, D, L-buthionine-R, S-sulfoximine; CDDP, *cis*-diamminedichloroplatinum (II); IC₅₀, drug concentration inhibiting cell growth by 50%; GSH, glutathione; GST, glutathione S-transferase; MT, metallothionein, PBS; phosphate-buffered saline; RR, relative resistance

少、細胞内解毒機構の亢進、核内での DNA 傷害の減少とその修復の亢進がある¹¹⁾。Bungo ら¹²⁾は肺腺癌細胞株 PC-9 とそのシスプラチン耐性細胞株 PC-9/0.5 を用いた研究で、シスプラチンの細胞内蓄積量が、耐性株 PC-9/0.5 で親株の PC-9 に比べ5分の1に減少しており、細胞内蓄積量の減少が耐性機構の主因であると報告している。また Kawai ら¹³⁾はマウスのリンパ腫細胞株とそのシスプラチン耐性株を用い、シスプラチンの細胞内取り込みがその耐性と相関して減少していることを示しシスプラチン耐性における薬剤の細胞内蓄積量の変化の重要性を指摘した。

細胞内解毒機構も重要な要素である。Fujiwara ら¹⁴⁾はシスプラチン耐性非小細胞肺癌細胞株 (PC-9/CDDP, 28倍耐性) で、細胞内非蛋白性チオールであるグルタチオン (glutathione, GSH) が約5倍に上昇していると報告した。しかしながら彼らの報告では、GSHの阻害剤である D, L-ブチオニン-R, L-スルフォキシミン (D, L-buthionine-R, S-sulfoximine, BSO) を用い GSH 産生を阻害した状態でも PC-9/CDDP は親株の PC-9 に比べ、21倍耐性で、他の要素の耐性への関与を推測している。グルタチオン S-トランスフェラーゼ (glutathione S-transferase, GST) はアルキル化剤の耐性に関与している¹⁵⁾とされるが、前述の Fujiwara らの報告では、親株、耐性株で GST 活性およびそのサブユニットの酵素量に差を認めていない。また Nakagawa ら¹⁶⁾の GST- π 発現ベクターを導入した NIH3T3 細胞を用いた報告では、アドリアマイシンと放射線に対する感受性は減少したが、シスプラチンに対する感受性が変化せず、GST のシスプラチンに対する感受性への関与は否定的であるとした。これらの結果は GST のシスプラチン耐性における役割が重要でないことを示唆するものである。メタロチオネイン (metallothionein, MT) は細胞内の主要な蛋白性チオールであり、重金属や各種の抗癌剤の解毒機構の重要な因子である¹⁷⁾。Andrews ら¹⁸⁾はカドミウム耐性卵巣癌細胞株が、シスプラチンに交差耐性を示し、且つ MT の上昇していたことを報告し、その重要性を指摘した。

シスプラチンをはじめとし多くの抗癌剤は DNA に傷害を与えることによりその細胞毒性を発揮する¹⁹⁾。シスプラチンによる DNA 傷害形式には、DNA 鎖間架橋、DNA 鎖内架橋、DNA 蛋白架橋が知られている。これらのうちシスプラチンの細胞毒性には DNA 鎖間架橋、DNA 鎖内架橋が重要と考えられている¹⁹⁾。これらの DNA 障害の修復能亢進は薬剤耐性機構の重要な要素であろう。前述の Bungo ら¹²⁾はシスプラチン

による DNA 鎖間架橋をアルカリ溶出法を用いて検討し、耐性株 PC-9/0.5 で DNA 鎖間架橋が減少していたがその修復能には差がなく DNA 鎖間架橋修復の耐性への関与は否定的であると推測した。一方 Eastman ら¹⁹⁾はシスプラチンの誘導体である ³[H]-*cis*-dichloro (ethylenediamine) platinum (II) を用い DNA とプラチナの付加体の形成とその減少率を L1210 とそのシスプラチン耐性細胞で検討し、DNA-platinum 付加体の減少率は耐性株で親株の約3倍早く DNA-platinum 付加体の減少、即ち DNA 傷害の修復がシスプラチン耐性機構に関与していることを示した。しかしながらシスプラチンの DNA 傷害の修復機構そのものがまだ明確にされておらず¹⁹⁾、その耐性への関与は今後の検討課題であろう。

小細胞肺癌培養株におけるシスプラチン耐性機構を検討した報告は少なく、Hospers ら²⁰⁾が小細胞肺癌細胞株 GLC4 およびそのシスプラチン耐性株 GLC4-CDDP3, GLC4-CDDP11 (それぞれ3倍, 11倍) を樹立し細胞内 GSH 含量が耐性と相関していることを報告しているにすぎない。今回著者は、ヒト小細胞肺癌細胞株と、そのシスプラチン耐性株を用い耐性機構の検討を行った。

材料および方法

I. 試 薬

RPMI1640 およびリン酸緩衝液 (phosphate-buffered saline, pH 7.4, PBS) はニッスイ薬品工業より購入した。牛胎児血清は Immuno-Biochemical Laboratories (東京) より購入した。シスプラチン (*cis*-diamminedichloroplatinum (II), CDDP) はブリストル・マイヤーズスクイブ株式会社 (東京) より供与を受けた。塩化カドミウム, GSH, エタクリン酸, 1-クロロ-2,4-ジニトロベンゼン は Sigma (St. Louis, MO, USA) より購入した。

II. 細胞株

ヒト小細胞肺癌株 N231 は米国国立癌研究所で樹立されたもので、国立がんセンター下里博士より供与された。この N231 のシスプラチン耐性株は以下の様にして得た。シスプラチンを 0.05 μ g/ml 加えた細胞培養液中に 5×10^5 /ml の濃度の N231 を加え培養、継代した。N231 と同様な状態で継代可能となった後、培養液中のシスプラチン濃度を上昇し、最終的には 0.2 μ g/ml のシスプラチンを含む培養液で継代可能となった細胞を得た。更にこの細胞を96穴のプレートに、各穴100個となるように希釈した耐性株を蒔き更に培養し、増殖の程度の良いものを選別した。この耐

性株を N231/0.2²³とし、更に N231/0.2 を、シスプラチン 0.2 μ g/ml を含む培養液中で 1 年間培養し、N231/CDDP を樹立した。実験に用いた耐性細胞株は少なくとも一カ月間はシスプラチンを除いた培養液で培養したものを用いた。

III. 感受性試験

N231 および N231/CDDP の薬剤感受性は増殖阻害試験²²⁾にて求めた。即ち対数増殖期にある細胞を 1500 回転、5 分間遠心することにより回収し、新鮮な培養液にて浮遊した。細胞浮遊液の一部を取り、クーラーカウンター (Microcellcounter CC-108) で細胞数を測定し、 4×10^5 /ml となるように細胞浮遊液を調整した。24 穴のプレートに細胞浮遊液を各穴ごとに 1 ml ずつ加え、更に薬剤の希釈液を各穴毎に 1 ml 加え 37 °C、5% CO₂ の条件で一週間培養した。一週間培養後、細胞を回収し 1500 回転、5 分間遠心した後細胞のペレットにトリプシン-EDTA 溶液を加え、細胞を単一とし細胞数を測定した。薬剤を加えなかったものをコントロールとし、コントロールを 100% としてそれぞれの薬剤を加えた穴の細胞数を % で表し増殖阻害率とした。グラフ縦軸を増殖阻害率、横軸を薬剤濃度としグラフより 50% 増殖阻害濃度 (IC₅₀) を求め、感受性の指標とした。感受性試験はすべて 3 回以上行った。薬剤耐性の指標として、相対耐性度 (relative resistance, RR) を以下の式より求めた。

$$RR = \text{耐性株の IC}_{50} / \text{親株の IC}_{50}$$

エタクリン酸を併用した実験では、エタクリン酸を 100% エタノールに溶解、希釈し、細胞浮遊液に加えた。コントロールにはエタノールのみを加えた。

IV. 細胞内シスプラチン蓄積量の定量

細胞内シスプラチン蓄積量は原子吸光法で定量した¹⁹⁾。それぞれ対数増殖期にある細胞を、 4×10^7 個ポイントとし、シスプラチン 5 μ g/ml の濃度で接触させ、3 時間、6 時間培養した。細胞を回収し 2000 回転、10 分間遠心し上清を捨て、ペレットに氷冷した PBS を加え、洗浄した。この操作を 2 度繰り返し、細胞のペレットを得た。細胞のペレットを計測まで -80 °C で保存した。保存した細胞に硝酸を加え、80 °C、5 時間インキュベートし細胞を破壊した。その後細胞内プラチナ含量をジエチルジチオカルバミン酸ナトリウムでキレート化しクロロフォルムにて抽出した。抽出したプラチナは原子吸光計 (日立モデル Z-7000, 東京) にて定量し、細胞内プラチナ含量を算出した。

V. 細胞内 GSH 含量

細胞内 GSH 含量は Griffith の方法に準じて行った²³⁾。対数増殖期にある細胞を氷冷した PBS にて 2 度

洗浄した後、細胞のペレットにリン酸 EDTA 溶液 (125mMKH₂PO₄/K₂HPO₄, pH 7.5+6.3mM EDTA) を 300 μ l 加え、ソニケーター (Branson sonifier 450) にて細胞を破壊した。これに 5-スルフォサリチル酸 (東京化成, 東京) 12% 溶液を加え、攪拌した後、室温で 3 時間放置した。放置後 15000 回転で 15 分間冷却遠心し (4 °C)、上清を集めた。この上清を GSH 含量測定に用いた。すなわち吸光度測定用のキュベットに 0.3mM β -Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (還元型) 溶液 700 μ l, 6 mM 5-5'-ジチオ-ビス-2-ニトロベンゾゼン酸溶液 100 μ l, 上清 100 μ l, 500mM リン酸緩衝液 (pH 7.5) 100 μ l を加え、更に 2 時間室温放置した。この反応液にグルタチオンリダクターゼ 0.5 単位加え、吸光度 (波長 412nm) を測定した。GSH の標準曲線より細胞の GSH を定量した。さらに蛋白濃度を Lowry 法にて求め、蛋白質当たりの GSH 含量を算出した。

VI. 細胞内 GST 活性の測定

細胞内 GST 活性は Habig らの方法に基づき検討した²⁴⁾。GSH 定量の際と同様に対数増殖期にある細胞を集め、1 M リン酸緩衝液 300 μ l を加え、ソニケートした。これを 15000 回転、10 分間冷却遠心 (4 °C) し上清を集めた。この上清を酵素溶液とし 1 mM GSH, 1 mM 1-クロロ-2,4-ジニトロベンゼンを加え時間あたりの吸光²⁵⁾ (340nm) を測定し活性を求めた。GSH 含量定量の際と同様に、蛋白量当たりの GST 活性を求めた。

成 績

I. 肺癌培養細胞株の性状および薬剤感受性

実験に用いた小細胞肺癌培養細胞株 N231 とそのシスプラチン耐性株 N231/CDDP の性状を比較した。平均倍加時間はそれぞれ 26.2 \pm 4.2 時間, 28.7 \pm 2.9 時間で、有意差は認められなかった。

シスプラチン感受性を増殖阻害試験で検討した。図 1 に増殖阻害曲線を示す。IC₅₀ はそれぞれ 0.144 \pm 0.05 μ g/ml, 0.575 \pm 0.06 μ g/ml で、RR は 4.0 であった。即ち、N231/CDDP は N231 に比較し、4 倍耐性であった。同様にして行った、塩化カドミウムに対する感受性の結果を図 2 に示す。塩化カドニウムに対する IC₅₀ はそれぞれ 1.91 \pm 0.02 μ g/ml, 2.08 \pm 0.35 μ g/ml で、N231, N231/CDDP の間で有意差はなかった。

II. 細胞内シスプラチン蓄積量の検討

図 2 にシスプラチンの細胞内蓄積量の経時的変化を示す。シスプラチンの接触濃度 (5 μ g/ml) は原子吸

光法の測定感度以上のプラチナ濃度を得るために設定した。3時間、6時間での細胞内蓄積量は N231, N231/CDDP で有意差はなかった。即ち細胞内のシスプラチン蓄積量の変化は親株、耐性株間で認められなかった。

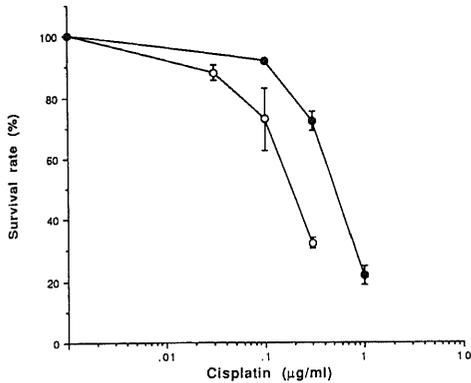


Fig. 1. Growth inhibition of N231 and N231/CDDP by cisplatin. Twenty four-well tissue culture plates were set up each containing 4×10^5 cells. Drugs were added to each dish at appropriate concentrations. After incubation for 7 days, the cells were counted by Microcellcounter CC-108. All assays were conducted using continuous drug exposure. Each experiment was performed in triplicate and each experiment was done at least 3 independent times. ○, N231; ●, N231/CDDP.

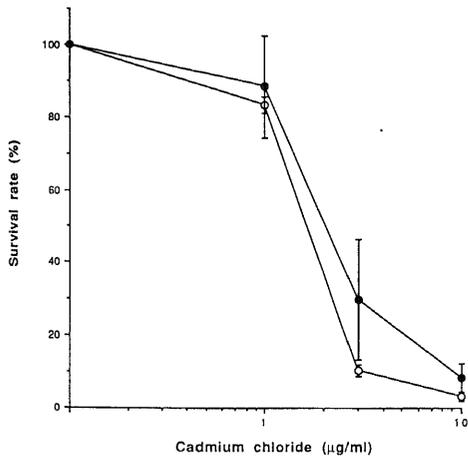


Fig. 2. Growth inhibition of N231 and N231/CDDP by cadmium chloride. All assays were conducted using continuous drug exposure. Each experiment was performed in triplicate and each experiment was done at least 3 independent times. ○, N231; ●, N231/CDDP.

III. 細胞内 GSH 含量, GST 活性

細胞内 GSH 含量と, GST 活性を測定した結果を表 1 に示す。細胞内 GSH 含量は N231 で 15.5 ± 1.3 nmol/mg protein, N231/CDDP で 20.1 ± 1.0 nmol/mg protein であり, N231/CDDP で高い傾向を示したが有意差はなかった ($P=0.573$)。ところが GST 活性は, N231/CDDP では 80.2 ± 1.9 nmol/min/mg protein, N231 では 19.1 ± 5.1 nmol/min/mg protein であり, N231/CDDP で, 約 4 倍の高値を示した。これは N231/CDDP の CDDP に対する耐性度とほぼ一致するものである。そこで GST 活性がシスプラチンに対する感受性に与える影響について検討する目的

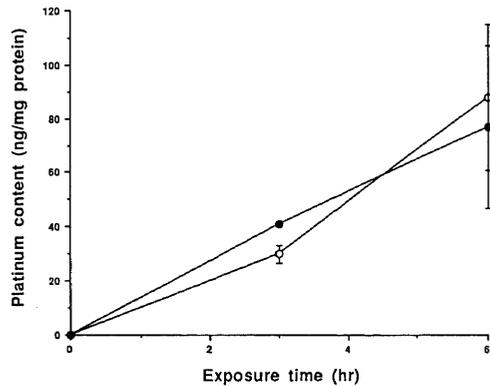


Fig. 3. Accumulation of cisplatin in sensitive and resistant N231 cell lines. All cells were treated with $5 \mu\text{g/ml}$ of cisplatin for 3 or 6 hr. Platinum content incorporated into N231 and N231/CDDP cells was determined by atomic absorption method. ○, N231; ●, N231/CDDP.

Table 1. Detoxification mechanisms of N231 cell lines

	N231	N231/CDDP
Relative resistance ^a	1	4
GSH content (nmol/mg protein)	15.5 ± 1.3^b	20.1 ± 1.0
GST activity (nmol/min/mg protein)	19.1 ± 5.1	80.2 ± 1.9^c

- a: Relative resistance value was calculated by the following formula: (IC50 value of resistant cells) / (IC50 value of parental cells).
- b: Each value is the mean \pm SD of the three independent experiments.
- c: $p < 0.001$ compared to value for N231 by unpaired Student's t-test.

で、GSTの阻害剤であるエタクリン酸を併用し感受性試験を行った。感受性試験の際には、エタクリン酸単独では細胞毒性を示さない濃度(0.1 μ g/ml, 1.0 μ g/ml)を用いた。0.1 μ g/mlのエタクリン酸処理した細胞で測定したGST活性はN231で 2.1 ± 0.2 nmol/min/mg protein, N231/CDDPで 14.2 ± 2.9 nmol/min/mg proteinであった(表2)。エタクリン酸処理の際の感受性試験の結果を表2に示す。N231, N231/CDDP, いずれの細胞株でもシスプラチンに対する感受性はエタクリン酸の用量依存性に亢進し、IC₅₀値はN231では、 0.044 ± 0.01 μ g/ml(エタクリン酸処理0.1 μ g/ml), 0.036 ± 0.07 μ g/ml(同1.0 μ g/ml), N231/CDDPでは、 0.202 ± 0.08 μ g/ml(同0.1 μ g/ml), 0.170 ± 0.04 μ g/ml(同1.0 μ g/ml)と、それぞれ低下した。しかし、RRはエタクリン酸処理した際でもそれぞれ4.6, 4.7であり、エタクリン酸を処理しない場合と比較し変化がなかった。

考 察

今日の小細胞肺癌化学療法における最大の問題点は薬剤耐性であろう。シスプラチンを含む強力な化学療法を行うことにより、過半数の症例で著効または有効な結果が得られるようになったが、短期間のうちに再発し化学療法に対して抵抗性を示す¹⁰⁾。短期間に再発するのは腫瘍中の治療抵抗性、即ち薬剤耐性のクローンが初回治療の際残存し、化学療法による影響がなくなって増殖するとも考えられる(自然耐性)。また化学療法がストレスとなって細胞自体に何らかの変化が生じ耐性を獲得するとも考えられる(獲得耐性)。小細胞肺癌においてはその臨床上の知見から獲得耐性が主であろうと考えられる¹⁰⁾。この耐性機構を解析することは薬剤耐性の克服ならびに新薬の開発にも重要である

と考えられる。今回、著者は、未治療の小細胞肺癌患者より樹立された細胞株N231とそのシスプラチン耐性株を用い、シスプラチンに対する獲得耐性の際の生化学的变化について検討した。シスプラチン耐性株N231/CDDPは親株であるN231とほぼ同等の平均倍加時間を有しており生化学的な検討にも適していると考えられる。

シスプラチンに対する感受性の差、即ち耐性は4.0倍であり、過去のシスプラチン耐性株の報告と比較するとやや低いと考えられるが(7倍から100倍)¹²⁾²⁶⁾²⁷⁾、臨床上の薬剤耐性は感受性で数倍であろうと考えられるので¹¹⁾、この細胞株での検討は価値があると思われる。

まずシスプラチンの細胞内蓄積量を原子吸光法にて検討した。細胞内蓄積量の変化は薬剤耐性のもっとも重要な要素である。各種のアドリアマイシン耐性においては、MDR-1遺伝子にcodeされるP-糖蛋白による薬剤の排泄促進が耐性の主たる機構と報告されている²⁸⁾。このMDR-1遺伝子の発現は、アドリアマイシン耐性株のみならずエトポシド耐性株、ピンクリスチン耐性株²⁹⁾においても認められ、生体内、試験管内のいずれにおいても、多剤耐性を誘導する²⁹⁾。しかしながら現在まで、このP-糖蛋白による薬剤排泄の亢進がシスプラチンに対する耐性の主たる機構であるとしている報告はない。しかしシスプラチン耐性株のほとんどは細胞内蓄積量の減少を示している¹¹⁾。小細胞肺癌の検討では、Hospersら³⁰⁾がGLC4, GLC4/CDDP3, GLC4/CDDP11でシスプラチンの細胞内蓄積量を検討しいずれの耐性株でも細胞内蓄積量に変化は認められなかったとしている。また著者ら³⁰⁾も小細胞肺癌株H69, H69/CDDP0.2, H69/CDDPを用い、^{186m}Pt CDDPの細胞内蓄積を検討したが、その取込量、細胞

Table 2. Modification of sensitivity by ethacrynic acid

		N231	N231/CDDP
GST activity	EA (-)	19.1 \pm 5.1	80.2 \pm 1.9
	EA ^a (0.1 μ g/ml) ^b	2.1 \pm 0.2	14.2 \pm 2.9
IC ₅₀ value to cisplatin	EA (-)	0.144 \pm 0.06	0.575 \pm 0.06
	EA (0.1 μ g/ml)	0.044 \pm 0.01	0.202 \pm 0.08
	EA (1.0 μ g/ml) ^c	0.036 \pm 0.07	0.170 \pm 0.04
Relative resistance	EA (-)	1	4.0
	EA (0.1 μ g/ml)	1	4.6
	EA (1.0 μ g/ml)	1	4.7

a: Ethacrynic acid.

b: Cells were treated with 0.1 μ g of ethacrynic acid per ml.

c: Cells were treated with 1.0 μ g of ethacrynic acid per ml.

外への排泄量に有意差を認めなかった。今回の著者の検討でも、3時間ではシスプラチン細胞内蓄積量が N231/CDDP で低い傾向を示したが、6時間では有意差は無く、細胞内蓄積量の変化は、耐性に関与しないと考えられた。以上の事実より、小細胞肺癌においては薬剤の細胞内蓄積量の変化のシスプラチン耐性機構における役割は少ないと推察される。

細胞内解毒機構は薬剤耐性因子として重要である。なかでも GSH は特に重要であり、各種の抗癌剤の感受性を規定すると考えられている。GSH は細胞内チオールの主たるものであり、親電子性中心をもつ化合物と結合することが知られている¹¹⁾。アルキル化剤に対する耐性株では GSH の上昇が報告されている¹⁵⁾。これと同様に、マウス白血病細胞株 L1210 等のシスプラチン耐性株でも GSH の上昇が報告されている²⁰⁾。またヒト卵巣癌²¹⁾、頭頸部癌²²⁾、非小細胞肺癌¹⁴⁾でも GSH の上昇が報告されている。Russo ら²³⁾はヒト肺線維芽細胞で 2-オキシアゾリデン-4-カルボキシレートにより GSH を 50% 上昇させたところシスプラチンに対し 1.4 倍耐性になったと報告している。さらに Hamilton ら²⁴⁾は GSH の合成阻害剤である BSO を用い、細胞内 GSH 含量を減少させるとシスプラチンに対する耐性が克服されたと報告している。これらの報告はシスプラチン耐性における GSH の重要性を示すものであるが、BSO を用いた場合でもシスプラチンに対する感受性が完全に回復したとの報告は少なく、むしろ BSO は耐性を完全には克服できないとしている報告が多い¹⁴⁾。小細胞肺癌細胞株の報告では前述の Hospers ら²⁵⁾は耐性度と相関して細胞内 GSH 含量の上昇を報告しているが、著者ら³⁰⁾は GSH 含量に差を認めなかったことを報告している。今回の検討でも細胞内 GSH 含量は N231 と N231/CDDP 間で有意差を認めず、細胞内 GSH 含量の変化は CDDP 耐性に関与していないと考えられた。

MT は、分子量 6000-7000 の蛋白で、システインを約 30% 含み、細胞内の蛋白性チオールの主となるものである¹⁷⁾。MT はカドミウム、亜鉛等の重金属の解毒に深く関わっていることは証明されているが、シスプラチン耐性機構に果たす役割については定説はないと言ってよさそう。Schilder ら³⁰⁾の卵巣癌細胞株を用いた検討ではシスプラチンに対する感受性と MT mRNA の発現の程度は相関しなかったと報告している。一方、著者ら³⁰⁾の検討ではシスプラチンに対する感受性と MT 含量及び MT mRNA 発現量は相関したことを見出している。また Kelley ら³¹⁾はマウス C127 細胞株に、ヒト MT 遺伝子をトランスフェクト

しその親株との感受性を比較した結果、シスプラチン、メルファラン、クロラムブシルで、耐性を示したと報告している。Naganuma ら³²⁾は次硝酸ビスマスの前処置で MT を誘導した結果、シスプラチンの腎毒性が軽減されたと報告している。以上のように MT 含量はシスプラチンの解毒に重要で、シスプラチン耐性を誘導すると考えられる。今回の著者の検討では MT 含量は定量していないが、塩化カドミウムに対して交叉耐性を示さなかったことは、N231/CDDP のシスプラチン耐性機構に MT が関与していないことを示唆する所見であると考えられる。

GST は GSH の還元反応を触媒する酵素であるが、他にも多様な機能をもつ多能酵素として注目された。特に GST- π は近年アドリアマイシンによる多剤耐性ヒト乳癌株において化学発癌物質に対して交差耐性を示すと共に GST- π が過剰発現されていることが報告されている³⁷⁾。また P-糖蛋白による多剤耐性細胞株においても GST- π の上昇は認められている³⁸⁾。GST- α の上昇は各種のアルキル化剤耐性株で認められている³⁹⁾。Nakagawa ら⁴⁰⁾は小細胞肺癌株 6 株、非小細胞肺癌株 4 株で、シスプラチンに対する感受性と、GST 活性を検討し、シスプラチンに対する感受性が GST 活性により規定されている可能性を示唆した。GST の発現遺伝子のトランスフェクションの報告は 3 つあり、Nakagawa ら¹⁹⁾、Moscow ら⁴¹⁾はシスプラチンに対する感受性は変化しなかったとしているが、Miyazaki ら⁴²⁾の報告では GST の上昇を示した細胞株でシスプラチンに耐性を示したとしている。今回の著者の検討では GST 活性は N231/CDDP で 4 倍に増加していた。この増加率はシスプラチンの耐性度とほぼ同一で、GST 活性の上昇がシスプラチン耐性を誘導した可能性が示唆される。しかしながらエタクリン酸を併用し、GST 活性を阻害した状態でも表 2 に示した様に RR は 4.6、4.7 であり、エタクリン酸を併用しない場合とほぼ同様であった。また N231 のエタクリン酸処理しない場合のシスプラチンに対する感受性と、N231/CDDP のエタクリン酸処理した場合の CDDP に対する感受性を比較してみると、N231/CDDP のエタクリン酸処理した場合の IC₅₀ が依然とした高く、耐性は完全には克服されなかったと考えられる。エタクリン酸処理した N231/CDDP の GST 活性はエタクリン酸処理をしなかった N231 のそれよりも低い値を示していた。N231/CDDP は、エタクリン酸処理により N231 より低い GST 活性でありながら、シスプラチンに対して耐性だったことは、GST 活性は薬剤耐性機構の全てではない可能性もあるが、

N231 及び N231/CDDP におけるシスプラチンに対する感受性を規定する因子であると考えられる。

今回の検討ではシスプラチンによる DNA 障害の差については検討しなかった。シスプラチンによる DNA 障害は前述のごとく、DNA 鎖間架橋、DNA 鎖内架橋、DNA 蛋白架橋の3種類の形態が考えられているが、そのうちのどれがシスプラチンの細胞毒性にもっとも重要であるか、目下検討中である。現在までの報告では、DNA-Platinum 付加体の減少率の低下は報告されているが、シスプラチンによる DNA 障害の明確な修復機構は解明されていない。著者の実験系でもさらなる検討が必要であると考えられる。

今回の著者の検討では N231/CDDP のシスプラチン耐性機構としてもっとも重要な要素として、GST 活性が考えられた。これは Miyazaki ら⁴⁾のトランスフェクションの実験の成績とも合わせ GST の重要性を示すものである。シスプラチンの細胞内蓄積量には変化が見られず、他の報告も考慮に入れると小細胞肺癌のシスプラチン耐性機構には、細胞内蓄積量は関与していないと考えられた。このことは小細胞肺癌以外の癌でシスプラチンの細胞内蓄積量の変化が重要であることと一線を画すると考えられる。また GSH 含量、MT 含量もシスプラチン耐性機構に関与していないと考えられた。今後今回の知見を基に、シスプラチンの治療成績を向上させ、長期生存を得るため、GST 活性阻害剤であるエタクリン酸の併用の臨床応用を行うべく、その前段階としての動物実験等を行う必要があると考えられた。

結 論

シスプラチンに対する獲得耐性の機構を検討するため N231/CDDP を樹立し以下の結論を得た。

1. N231/CDDP は N231 に比べシスプラチンに対して4倍耐性であった。

2. 親株、耐性株でシスプラチンの細胞内蓄積量に差はなかった。

3. GSH の細胞内含量には両細胞株で差はなかった。

4. MT の耐性に対する関与は塩化カドミウムに対して交差耐性を示さなかったことより否定的であった。

5. GST は N231/CDDP で4.2倍高値だったがエタクリン酸を用い GST 活性を阻害しても耐性は克服できなかった。

以上の結果より N231/CDDP において、GST はシスプラチンの感受性を規定する因子ではあるが、耐性

機構の全てを説明できない。

謝 辞

稿を終えるにあたり、当研究のご指導、ご校閲を賜りました松田保教授に深く感謝の意を表します。またシスプラチン耐性株に関する検討の機会を頂いた国立がんセンター研究所薬効試験部、西條長宏部長、藤原康弘研究員に心から感謝いたします。

文 献

- 1) Clavel, M., Cognetti, F., Dondion, P., Wilders, J., Rosso, R., Rossi, A., Gifnoux, B., Van Rymenant, M., Cortes-Funes, H., Dalesio, O., Kirkpatrick, A. & Rozenweig, M.: Combination chemotherapy with methotrexate, bleomycin and vincristine with or without cisplatin in advanced squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer*, **60**, 1173-1177 (1987).
- 2) Einhorn, L. H. & Williams, S. D.: Current concepts in cancer. The role of cis-platinum in solid tumor therapy. *N. Engl. J. Med.*, **300**, 289-291 (1979).
- 3) Loehrer, P. J., Turner, S. Sr., Kubils, P., Hui, S., Carrea, J., Ansari, R., Stephans, D., Woodburn, R. & Meyer, S.: A randomized trial of fluorouracil versus fluorouracil plus cisplatin in the treatment of metastatic colorectal cancer: A hoosier oncology group trial. *J. Clin. Oncol.*, **6**, 642-648 (1988).
- 4) Einhorn, L. H. & Donohue, J.: Cis-diamminedichloroplatinum, vinblastine and bleomycin combination therapy in disseminated testicular cancer. *Ann. Int. Med.*, **87**, 293-298 (1977).
- 5) Ozols, R. F., Oschega, Y., Meyers, C. E. & Young, R. C.: High-dose cisplatin in hypertonic saline in refractory ovarian cancer. *J. Clin. Oncol.*, **3**, 1246-1250 (1985).
- 6) Cavalli, F., Goldhirsch, A., Siegenthaler, P., Kaplan, G. & Beer, M.: Phase II study with cis-dichlorodiammine platinum (II) in small cell anaplastic carcinoma. *Eur. J. Cancer*, **16**, 617-621 (1980).
- 7) Chabner, B. A. & Collins, J. M.: *Cancer Chemotherapy: Principle and Practice* p465-490, J. B. Lippincott Company, Philadelphia, 1989.
- 8) Roth, B. J., Johoson, D. H. & Greco, F. A.: A phase III trial of etoposide and cisplatin

versus cyclophosphamide, doxorubicin and vincristine versus alternation of the two therapies for the patients with extensive small cell lung cancer. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.*, **8**, 225 (1989).

9) Tamura, T., Fukuoka, M., Furuse, K., Ikegami, H., Saijo, N. & Suemasu, K.: Japanese multicenter randomized trial: cyclophosphamide/adriamycin/vincristine (CAV) versus cisplatin/etoposide (PVP) versus CAV alternating with PVP in patients with small cell lung cancer. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.*, **8**, 220 (1989).

10) 田村友秀, 西條長宏: 各臓器癌の化学療法, f. 小細胞肺癌. *Current Review 癌化学療法1990-91* (鶴尾隆, 西條長宏編), 304-314 頁, 中外医学社, 東京, 1990.

11) Andrews, P. A. & Howell, S. B.: Cellular pharmacology of cisplatin: Perspectives on mechanisms of acquired resistance. *Cancer Cells*, **2**, 35-43 (1990).

12) Bungo, M., Fujiwara, Y., Kasahara, K., Nakagawa, K., Ohe, Y., Sasaki, Y., Irino, S. & Saijo, N.: Decreased accumulation as a mechanism of resistance to cis-diamminedichloroplatinum (II) in human non-small cell lung cancer cell lines: relation to DNA damage and repair. *Cancer Res.*, **50**, 2549-2553 (1990).

13) Kawai, K., Kamatani, N., Georges, E. & Ling, V.: Identification of a membrane glycoprotein overexpressed in murine lymphoma sublines resistant to cis-diamminedichloroplatinum (II). *J. Biol. Chem.*, **265**, 13137-13142 (1990).

14) Fujiwara, Y., Sugimoto, Y., Kasahara, K., Bungo, M., Yamakido, M., Tew, K. D. & Saijo, N.: Determinant of drug response in a cisplatin resistant human lung cancer cell line. *Jpn. J. Cancer Res.*, **81**, 527-535 (1990).

15) Tew, K. D., Bomber, A. M. & Hoffman, S. J.: Ethacrynic acid and piroprost as enhancer of cytotoxicity in drug resistant & sensitive cell lines. *Cancer Res.*, **48**, 3622-3625 (1988).

16) Nakagawa, K., Saijo, N., Tsuchida, S., Sakai, M., Tsunokasa, Y., Yokota, J., Muramatsu, M., Sato, K., Terada, M. & Tew, K. D.: Glutathione-S-transferase π as a determinant of drug resistance in transfectant cell lines. *J. Biol. Chem.*, **265**, 4296-4301 (1990).

17) Basu, A. & Lazo, J. S.: A hypothesis regarding the prospective role of metallothionein against the toxicity of DNA intercalating drugs. *Toxicol. Lett.*, **50**, 123-125 (1990).

18) Andrews, P. A., Murphy, M. P. & Howell, S. B.: Metallothionein mediated cisplatin resistance in human ovarian carcinoma cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **241**, 1813-1815 (1987).

19) Eastman, A. & Schulte, N.: Enhanced DNA repair as a mechanism of resistance to cis-diamminedichloroplatinum (II). *Biochemistry*, **27**, 4730-4734 (1988).

20) Hospers, G. A. P., Meuer, C., De Leu, I., Uges, D. R. A., Mulder, N. H. & De Vris, E. G. E.: A study of human small-cell lung cancer carcinoma (hSCLC) cell lines with different sensitivities to direct revalent mechanisms of cisplatin (CDDP) resistance. *Int. J. Cancer*, **46**, 138-144 (1990).

21) Hong, W. S., Saijo, N., Sasaki, Y., Minato, K., Nakano, H., Nakagawa, K., Fujiwara, Y., Nomera, M. & Twentymann, P. R.: Establishment and characterization of cisplatin resistant sublines of human lung cancer cell lines. *Int. J. Cancer*, **41**, 462-467 (1988).

22) Twentymann, P. R., Fox, N. E., Wright, K. A. & Blechen, N. M.: Derivation & preliminary characterization of adriamycin resistant lines of human lung cancer cell. *Br. J. Cancer*, **53**, 529-537 (1986).

23) Griffith, O. W.: Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal. Biochem.*, **106**, 207-212 (1980).

24) Habig, W. H., Pabst, M. J. & Jakoby, W. B.: Glutathione-S-transferases, the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.*, **249**, 7130-7139 (1974).

25) Teicher, B. A., Holden, S. A., Kelley, M. J., Shea, T. C., Cuucci, C. A., Rosowsky, A., Henner, W. D. & Frei, E. III: Characterization of a human squamous cell carcinoma cell line resistant to cis-diamminedichloroplatinum (II). *Cancer Res.*, **47**, 388-393 (1987).

26) Richon, V. M., Schulte, N. & Eastman, A.: Accumulation of cis-diamminedichloroplatinum (II) in murine leukemia L1210 cells in vitro. *Cancer*

- Res., 48, 9-13 (1988).
- 27) Schilder, R. J., Hall, L., Handel, L. M., Fojo, A. T., Monks, A., Young, R. C., Ozols, R. H. & Hamilton, T. C.: Metallothionein gene overexpression in human ovarian cancer cell lines. Proc. Am. Assoc. Cancer Res., 30, 525 (1989).
- 28) Bradley, G., Juranka, P. F. & Ling, V.: Mechanism of multidrug resistance. Biochem. Biophys. Acta, 948, 87-128 (1988).
- 29) Edicott, J. A. & Ling, V.: The biochemistry of P-glycoprotein mediated multidrug resistance. Annu. Rev. Biochem., 58, 137-171 (1989).
- 30) Kasahara, K., Fujiwara, Y., Nishio, K., Ohmori, T., Sugimoto, Y., Komiya, K., Matsuda, T. & Saijo, N.: Metallothionein content correlates with the sensitivity of human small cell lung cancer cell lines to cisplatin. Cancer Res., 51, 3237-3242 (1991).
- 31) Andrews, P. A., Murphy, M. P. & Howell, S. B.: Characterization of cisplatin-resistant COLO3-16 human ovarian carcinoma cells. Eur. J. Cancer Clin. Oncol., 36, 1955-1964 (1989).
- 32) Russo, A., Degraff, W., Friedmen, N. & Mitchell, J. B.: Selective modulation of glutathione levels in human normal versus tumor cells and subsequent differential response to chemotherapy drugs. Cancer Res., 46, 2845-2848 (1986).
- 33) Hamilton, T. C., Winker, M. A., Loule, K. G., Batlst, G., Behrens, B. G., Tsuruo, T., Grouthger, K. R., McKoy, W. M., Young, R. C. & Ozols, R. F.: Augmentation of adrimycin, melphalan, and cisplatin cytotoxicity in drug-resistant and sensitive human ovarian carcinoma cell lines by buthionine sulfoximine mediated glutathione depletion. Biochem. Pharmacol., 34, 2583-2586 (1985).
- 34) Schilder, R. J., Hall, L., Monks, A., Handel, I. M., Fornace, A. J. Jr., Ozols, R. F., Fojo, A. T. & Hamilton, T. C.: Metallothionein gene expression and resistance to cisplatin in human ovarian cancer. Int. J. Cancer, 45, 416-422 (1990).
- 35) Kelley, S. I., Basu, A., Teicher, B. A., Hacker, M. P., Hamer, D. H. & Lazo, J. S.: Overexpression of metallothionein confer resistance to anticancer drugs. Science, 241, 1813-1815 (1988).
- 36) Naganuma, A., Satoh, M. & Imura, N.: Prevention of lethal and renal toxicity of cis-diamminedichloroplatinum (II) by induction of metallothionein synthesis without compromising its antitumor activity in mice. Cancer Res., 47, 983-987 (1987).
- 37) 中川和彦, 西條長宏: 薬剤耐性因子としての Glutathione S-transferase π . 組織培養, 16, 235-239 (1990).
- 38) Ratist, G., Tulpule, A., Sinha, B. K., Katki, A. G., Myers, C. E. & Cowan, K. H.: Overexpression of a novel anionic glutathione transeferase in multidrug-resistant human breast cancer cells. J. Biol. Chem., 261, 15544-15549 (1986).
- 39) Cecil, B. P.: Glutathione S-transferase: gene structure, regulation, and biological function. Annu. Rev. Biochem., 58, 743-764 (1989).
- 40) Nakagawa, K., Yokota, J., Wafa, Y., Sasaki, Y., Fujiwara, Y., Sasaki, M., Muramatsu, M., Terasaki, T., Tsunokawa, Y., Terada, M. & Saijo, N.: Levels of glutathione S-transferase π mRNA in human lung cancer cell lines correlate with the resistance to cisplatin and carboplatin. Jpn. J. Cancer Res., 79, 301-304 (1988).
- 41) Moscow, J. S., Townsend, A. J. & Cowan, K. H.: Elevation of π class glutathione S-transferase activity in human breast cancer cells by transfection of the GST- π gene and its effect on sensitivity to toxins. Mol. Pharmacol., 36, 22-28 (1989).
- 42) Miyazaki, M., Kohno, K., Saburi, Y., Matsuno, K., Ono, M., Kuwano, M., Tsuchida, S., Sato, K., Sasaki, M. & Muramatsu, M.: Drug resistance to cis-diamminedichloroplatinum (II) in chinese hamster ovary cell lines transfected with glutathione S-transferase PI gene. Biochem. Biophys. Res. Commun., 166, 1358-1364 (1990).

