

低酸素状態におけるヒト非小細胞肺癌細胞株のシスプラチン感受性の検討

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/2297/9415

低酸素状態におけるヒト非小細胞肺癌細胞株の シスプラチン感受性の検討

金沢大学医学部医学科内科学第三講座 (主任: 松田 保教授)

岩 佐 桂 一

シスプラチン (cis-diamminedichloroplatinum (II), CDDP) は、非小細胞肺癌の化学療法において最も重要な抗瘍薬である。しかしその治療成績は十分ではなく、その原因の一つに薬剤耐性が考えられる。本研究では、ヒト非小細胞肺癌培養細胞株を用い、酸素状態の差異における薬剤感受性とその規定因子について検討した。肺癌細胞株として、腺癌由来のPC-9とRERF-LC-MS、扁平上皮癌由来のEBC-1を用い検討したところ、CDDP感受性は正常酸素状態に比べて低酸素状態において有意に低下した。CDDPの誘導体であるカルボプラチン (cis-diamminecyclobutanedicarboxylate platinum (II)) に対する感受性も、正常酸素状態に比べて低酸素状態において有意に低下した。低酸素状態において薬剤感受性が低下した機序を検討する目的で、RERF-LC-MSとEBC-1を用いて細胞内プラチナ蓄積量を測定した。RERF-LC-MSの細胞内プラチナ蓄積量は、正常酸素状態と比較して低酸素状態において、CDDP曝露濃度50 μ Mでは40.4%、CDDP曝露濃度100 μ Mでは40.8%にそれぞれ有意に低下した。同様にEBC-1の細胞内プラチナ蓄積量は、正常酸素状態と比較して低酸素状態において、CDDP曝露濃度50 μ Mでは38.4%、CDDP曝露濃度100 μ Mでは35.9%に、それぞれ有意に低下した。さらに、細胞内プラチナ蓄積量を規定すると考えられる細胞膜ナトリウムイオン・カリウムイオン・アデノシントリホスファターゼ (Na^+ , K^+ -ATPase) 活性を ^{86}Rb 流入率を指標として測定したところ、RERF-LC-MSにおいて正常酸素状態では 0.51 ± 0.12 ng/mg 蛋白/分、低酸素状態では 0.27 ± 0.08 ng/mg 蛋白/分、EBC-1において正常酸素状態では 0.26 ± 0.04 ng/mg 蛋白/分、低酸素状態では 0.13 ± 0.06 ng/mg 蛋白/分であり、細胞膜 Na^+ , K^+ -ATPase活性は低酸素状態において有意に低下した。ヒト非小細胞肺癌細胞では低酸素状態においてCDDP感受性は有意に低く、この原因として低酸素状態下の Na^+ , K^+ -ATPase活性の低下による細胞内プラチナ蓄積量低下が関与していることが示された。非小細胞肺癌では腫瘍内部が低酸素状態に陥り、これによって抗瘍薬感受性が低下していることが示唆された。

Key words non-small cell lung cancer, cis-diamminedichloroplatinum (II), hypoxic condition, drug resistance, Na^+ , K^+ -ATPase

近年、本邦において肺癌は胃癌を抜いて男性の悪性腫瘍による死亡原因の第一位となった¹⁾。中でも非小細胞肺癌は肺癌の80%から90%を占めており、その60%以上は外科的切除不能の状態で見られる²⁾。手術適応とならない進行肺癌症例に対しては、抗瘍薬による化学療法や放射線治療あるいは両者の併用による治療が施行されている。シスプラチン (cis-diamminedichloroplatinum (II), CDDP) は非小細胞肺癌治療の中心となる抗瘍薬であり³⁾、今日広く臨床に用いられている。またカルボプラチン (cis-diamminecyclobutanedicarboxylate platinum (II), CBDCA) はCDDPと同じくプラチナ系抗瘍薬である。CBDCAの小細胞肺癌に対する奏効率は高いが、非小細胞肺癌に対する奏効率はCDDPと比べて低い。しかしCBDCAはCDDPと比べて腎毒性が少なく、また奏効率が低いにもかかわらず生存期間がCDDPと変わらない⁴⁾ことから、近年非小細胞

肺癌化学療法に用いられてきている。しかし、これらの抗瘍薬を含む多剤併用化学療法を行っても非小細胞肺癌に対する治療成績は未だに満足のものとはいえない。

癌化学療法の効果不十分である原因として薬剤耐性が挙げられる。薬剤耐性の解明とその克服が、抗瘍薬による癌化学療法の治療成績向上に重要であると考えられる。CDDPに対する癌細胞の薬剤耐性の機構として、細胞内蓄積機構^{5)~7)}、細胞内解毒機構^{8)~11)}、DNA障害修復機構^{5)12)~14)}などが報告されている。細胞内蓄積機構については細胞膜ナトリウムイオン・カリウムイオン・アデノシントリホスファターゼ (Na^+ , K^+ -ATPase) を介する能動輸送の低下⁶⁾⁷⁾が報告されている。細胞内解毒機構については、耐性細胞においてグルタチオン (glutathione, GSH)⁸⁾、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (glutathione-S-transferase)¹⁰⁾、メタロチオネイン (metallothionein)¹¹⁾が増加す

平成11年1月19日受付, 平成11年3月4日受理

Abbreviations: CBDCA, cis-diamminecyclobutanedicarboxylate platinum (II); CDDP, cis-diamminedichloroplatinum (II); DMSO, dimethylsulfoxide; FBS, fetal bovine serum; GSH, glutathione; HEPES, 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-

ると報告されており、これらの関与が指摘されている。DNA障害修復機構については、CDDPにより誘導されるDNA障害を認識するMSH2蛋白の減少が、CDDP耐性を誘導すると報告されている¹³⁾¹⁴⁾。

また、肺癌を含む多くの腫瘍は固形腫瘍であり、その内部は低酸素状態にあると報告されている^{15)~20)}。こうした低酸素状態においては癌細胞の抗癌薬や放射線に対する感受性が低下すると推定されている¹⁷⁾¹⁹⁾²¹⁾²²⁾が、その機序など詳細は不明である。さらに、ヒト非小細胞肺癌株における低酸素状態でのCDDP感受性についての報告はない。

以上の知見を踏まえ、本研究では正常酸素状態と低酸素状態におけるヒト非小細胞肺癌株のプラチナ系抗癌薬感受性、およびそれぞれの酸素状態における抗癌薬感受性規定因子について比較検討した。

材料および方法

I. 試薬

RPMI1640, リン酸緩衝液 (phosphate-buffered saline, PBS) (pH 7.4) およびペニシリン・ストレプトマイシン混合液 (10,000単位/ml) はニッスイ薬品工業 (東京) より購入した。牛胎児血清 (fetal bovine serum, FBS) は三光純薬 (東京) より購入した。CDDPおよびCBDCAはプリストル・マイヤーズ スクイブ株式会社 (東京) より供与を受けた。ジメチルスルフォキシド (dimethylsulfoxide, DMSO) と 2-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-パイパーアジニル]エタンスルホン酸 (2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic acid, HEPES) は和光純薬 (大阪) から、3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロマイド (3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT) と SDS は Sigma Chemical (St. Louis, USA) より購入した。⁸⁶RbClと液体シンチラント (ACS II) はアマシャム・ジャパン (東京) より購入した。

II. 細胞株とその培養

ヒト非小細胞肺癌由来の培養細胞株であるPC-9 (肺腺癌由来), RERF-LC-MS (肺腺癌由来) およびEBC-1 (肺扁平上皮癌由来) を用いた。PC-9は東京医科大学早田義博博士らによって肺腺癌の患者から樹立された細胞株で、同研究室より供与を受けた。またRERF-LC-MSとEBC-1の各細胞株は、理化学研究所細胞・遺伝子保存施設細胞銀行 (つくば) より購入した。細胞は10%FBSと1%ペニシリン・ストレプトマイシン混合液を加えたRPMI1640培養液を用いて、5%CO₂濃度、37℃の条件下に培養した。

III. 抗癌薬感受性試験

抗癌薬感受性は、Mosmannら²³⁾の方法に準じたBandoら^{24)~26)}の変法に従って、細胞増殖阻害試験によって評価した。すなわち、各細胞株を前述の培養液に浮遊し、 2.0×10^4 個/mlとなるように調整した。PC-9については96穴V底マルチプレート (Coster, Cambridge, USA) を、RERF-LC-MSとEBC-1については96穴平底マルチプレート (Falcon No.3072, Becton Dickinson and Co., Lincoln Park, USA) を用い、各ウェルに浮遊細胞数が2,000個ずつとなるように蒔き一晚培養した。低酸素状態は、グローブボックスに95%窒素と5%二酸化炭素の混合ガスを灌流

して作成した。低酸素群は抗癌薬曝露前に4時間グローブボックス内に静置した。CDDPは3, 10, 30, 100, 300 μ Mの各濃度となるように、またCBDCAは0.1, 0.3, 1, 3, 10mMの各濃度となるように加え、薬剤曝露時間を2時間とした。薬剤曝露終了まで低酸素群の操作はグローブボックス内にて行った。その後、プレートを1,500回転5分間遠心し、培養液で2回洗浄した。PC-9については、培養及び吸光度測定を容易にするため、さらに細胞浮遊液の半分を96穴平底マルチプレートに移した。96時間培養後、PBSに溶解した5 mg/ml MTT溶液を各ウェルに20 μ lずつ加え、37℃で4時間培養した。その後、1,500回転で5分間遠心して、上清を吸引し、各ウェルに200 μ lずつDMSOを加えて、形成されたホルマザン結晶を溶解した。5分間攪拌した後、自動吸光度計EAR 340AT (SLT, Vienna, Austria) を用いて、波長560nmにおける吸光度を波長660nmにおける値を対照として測定した。得られた吸光度から細胞生存曲線を描き、幾何学的に50%増殖阻害濃度 (inhibition of cell growth by 50%, IC₅₀) を求めて薬剤感受性の指標とした。感受性試験は全て3回以上行った。

IV. 細胞内プラチナ蓄積量の定量

RERF-LC-MSとEBC-1について、細胞内プラチナ蓄積量を測定した。対数増殖期にある各細胞株を 1.0×10^7 個/mlに調整し、組織培養皿 (Falcon No.3025, Becton Dickinson and Co.) に25 mlずつ注入して24時間培養した。上清を交換した後、低酸素群については前述のごとく抗癌薬曝露前に4時間低酸素状態に静置した。50 μ Mあるいは100 μ MとなるようにCDDPを添加して2時間培養した後、氷冷したPBSにて2回洗浄した。これらの細胞を回収してPBSに浮遊し、超音波破碎装置Branson sonifier 250 (Branson, Danbury, USA) を用いて破碎した。各検体のプラチナ濃度を原子吸光法を用いて測定した。

V. 細胞膜Na⁺, K⁺-ATPase 活性の定量

Rozengurtら²⁷⁾の方法とOhmoriら²⁸⁾の方法に準じ、単位時間あたりの⁸⁶RbClの細胞内流入量を指標として、細胞膜Na⁺, K⁺-ATPase 活性を定量した。RERF-LC-MSとEBC-1について各細胞株を 1.5×10^6 個/mlに調整し、HEPES緩衝液 (pH 7.4) (10mM ブドウ糖, 5mM KCl, 1mM MgCl₂, 1mM CaCl₂, 10mM HEPES, 123mM NaCl) に浮遊した。バイアル瓶V-30 (木村科学器械, 金沢) に細胞浮遊液を注入し、正常酸素状態、あるいは低酸素状態下に4時間静置した後密閉した。⁸⁶RbCl 1mCi/mlを加えて2, 5, 10分に細胞浮遊液を回収し、1,500回転5分間遠心し、PBSで2回洗浄した。5% SDSを添加して可溶化した各検体をACSIIにて溶解し、その放射活性をシンチレーションカウンター LSC700 (アロカ, 東京) を用いて測定した。37℃と4℃の二条件下で同時に測定を行い、その流入率の差をもって細胞膜Na⁺, K⁺-ATPase 活性とした。

VI. 蛋白質濃度の定量

各検体の蛋白質濃度は、BCAプロテインアッセイキット (Pierce, Rockford, USA) を用いて測定した。

VII. 統計学的分析

対応のないStudentのt検定を用いて2群間検定を行い、危険率5%未満の場合を有意差ありと判定した。数値は $\bar{x} \pm SD$ で表示した。

piperazinyl) ethane sulfonic acid; IC₅₀, inhibition of cell growth by 50%; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; PBS, phosphate-buffered saline

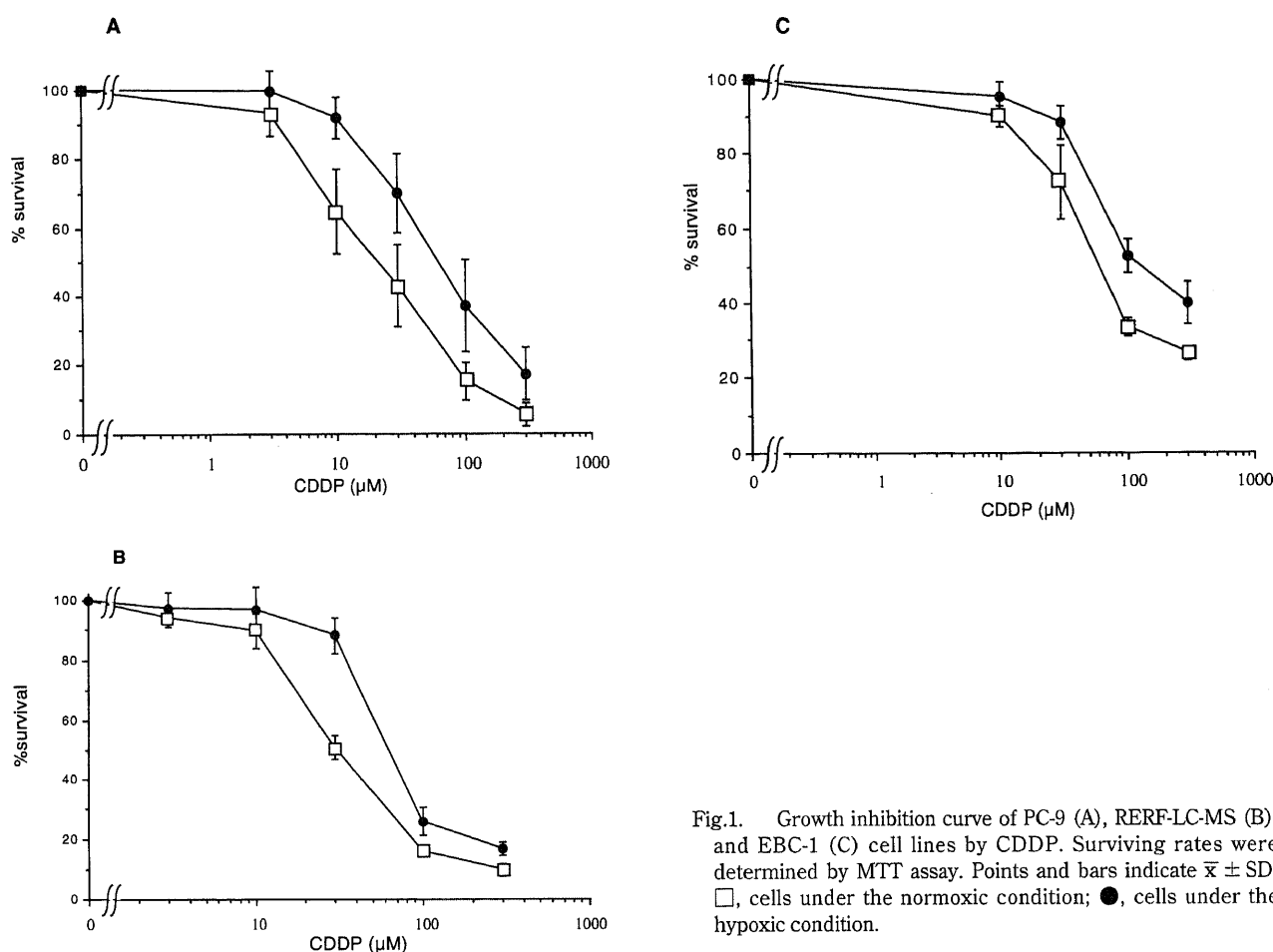


Fig.1. Growth inhibition curve of PC-9 (A), RERF-LC-MS (B), and EBC-1 (C) cell lines by CDDP. Surviving rates were determined by MTT assay. Points and bars indicate $\bar{x} \pm SD$. \square , cells under the normoxic condition; \bullet , cells under the hypoxic condition.

Table 1. Sensitivities of non-small cell lung cancer cell lines to CDDP under the normoxic or the hypoxic condition

Cell line	IC ₅₀ value (μM)	
	Normoxic condition	Hypoxic condition
PC-9	29.2 \pm 18.0 ^{a)}	95.7 \pm 34.8 ^{b)}
RERF-LC-MS	33.3 \pm 5.7	73.1 \pm 4.4 ^{b)}
EBC-1	67.6 \pm 9.3	148.7 \pm 41.0 ^{b)}

IC₅₀ value indicates drug concentration that inhibits 50% of cell growth.

a) Each value is $\bar{x} \pm SD$.

b) $p < 0.05$ compared with the normoxic condition analyzed by the unpaired Student's t-test.

成 績

I. 肺癌培養細胞株のシスプラチン感受性

MTT法による細胞増殖阻害試験により評価したシスプラチン感受性の成績を示す。細胞生存率曲線(図1)から求めたIC₅₀値(表1)は、PC-9では正常酸素状態において29.2 \pm 18.0 μM 、低酸素状態において95.7 \pm 34.8 μM 、RERF-LC-MSでは正常酸素状態において33.3 \pm 5.7 μM 、低酸素状態において73.1 \pm 4.4 μM 、EBC-1では正常酸素状態において67.6 \pm 9.3 μM 、低酸素

状態において148.7 \pm 41.0 μM であった。いずれの非小細胞肺癌株のIC₅₀値も、低酸素状態において有意に高値となった。すなわち、CDDP感受性は低酸素状態において有意に低下した。

CDDPと同じプラチナ系抗癌薬であるCBDCAについても、細胞生存率曲線(図2)を描き、IC₅₀値を求めた(表2)。PC-9では正常酸素状態において0.56 \pm 0.09mM、低酸素状態において1.17 \pm 0.23mM、RERF-LC-MSでは正常酸素状態において0.46 \pm 0.11mM、低酸素状態において0.72 \pm 0.11mM、EBC-1では正常酸素状態において0.76 \pm 0.16mM、低酸素状態において1.49 \pm 0.63mMであり、CBDCAの感受性も低酸素状態において有意に低下した。

II. 細胞内プラチナ蓄積量

RERF-LC-MSとEBC-1について、細胞内プラチナ蓄積量を測定した結果を示す(図3, 4)。RERF-LC-MSでは、CDDP曝露濃度50 μM において正常酸素状態が105.7 \pm 15.0ng/mg 蛋白、低酸素状態が42.7 \pm 4.9ng/mg 蛋白、CDDP曝露濃度100 μM において正常酸素状態が238.9 \pm 5.1ng/mg 蛋白、低酸素状態が97.4 \pm 14.8ng/mg 蛋白であった。EBC-1では、CDDP曝露濃度50 μM において正常酸素状態が38.5 \pm 8.4ng/mg 蛋白、低酸素状態が14.8 \pm 5.4ng/mg 蛋白、CDDP曝露濃度100 μM において正常酸素状態が100.7 \pm 13.6ng/mg 蛋白、低酸素状態が36.2 \pm 5.3ng/mg 蛋白であった。すなわち、CDDP曝露濃度が50 μM 、100 μM のいずれの場合においても、プラチナ蓄積量

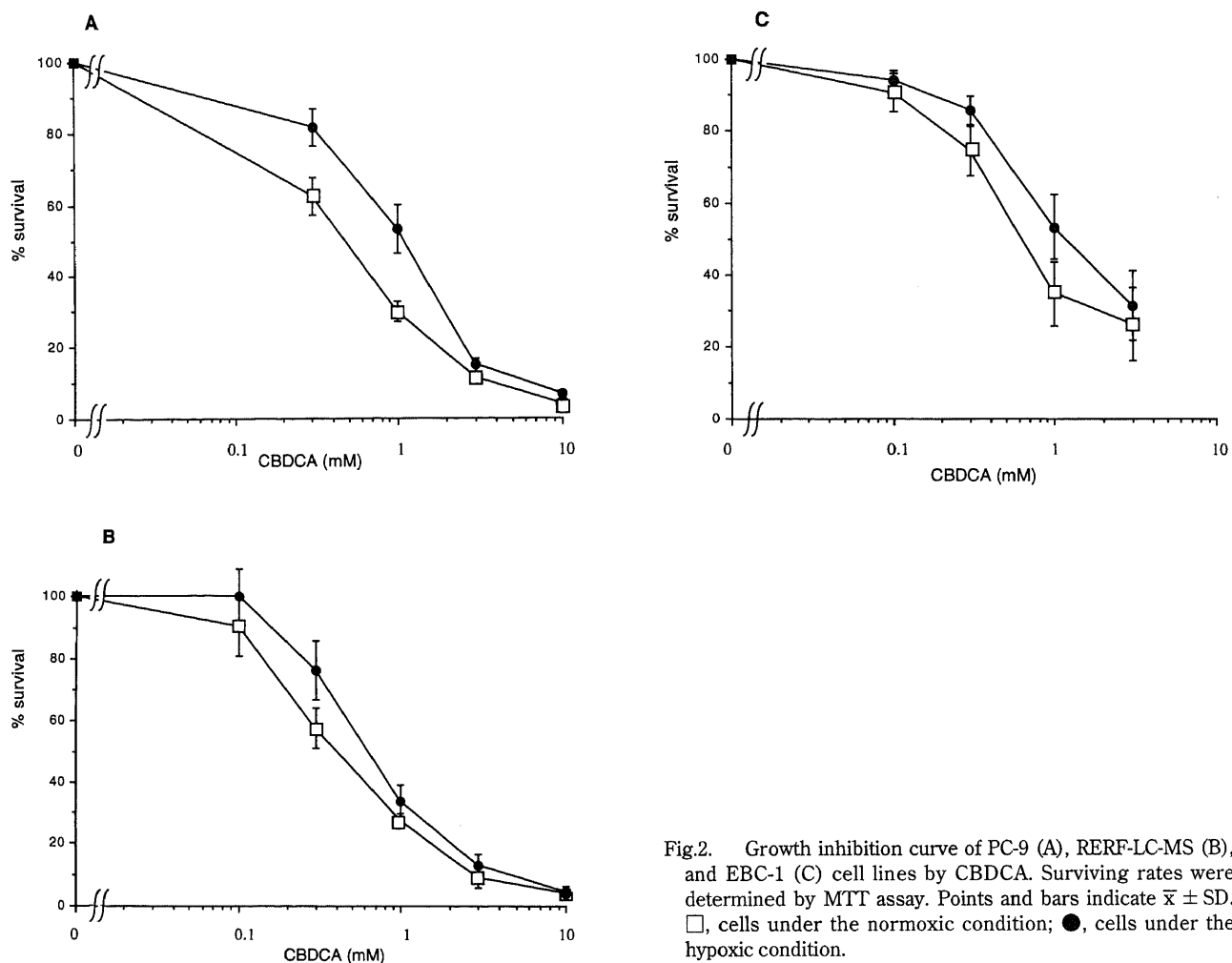


Fig.2. Growth inhibition curve of PC-9 (A), RERF-LC-MS (B), and EBC-1 (C) cell lines by CBDCA. Surviving rates were determined by MTT assay. Points and bars indicate $\bar{x} \pm SD$. \square , cells under the normoxic condition; \bullet , cells under the hypoxic condition.

Table 2. Sensitivities of non-small cell lung cancer cell lines to CBDCA under the normoxic or the hypoxic condition

Cell line	IC ₅₀ value (mM)	
	Normoxic condition	Hypoxic condition
PC-9	0.56 ± 0.09 ^{a)}	1.17 ± 0.23 ^{b)}
RERF-LC-MS	0.46 ± 0.11	0.72 ± 0.11 ^{b)}
EBC-1	0.76 ± 0.16	1.49 ± 0.63 ^{b)}

IC₅₀ value indicates drug concentration that inhibits 50% of cell growth.

a) Each value is $\bar{x} \pm SD$.

b) $p < 0.05$ compared with the normoxic condition analyzed by the unpaired Student's t-test.

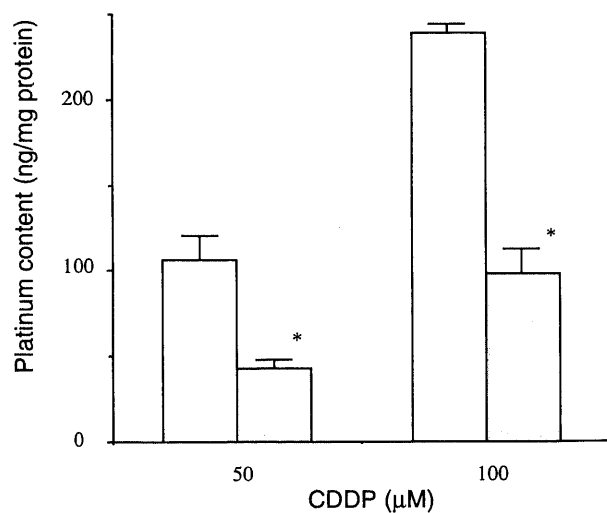


Fig.3. Platinum accumulation into RERF-LC-MS cells. Cells were treated with 50 μ M or 100 μ M of CDDP. The platinum contents were measured by atomic absorption spectrophotometry. Columns and bars indicate $\bar{x} \pm SD$. \square , cells under the normoxic condition; \blacksquare , cells under the hypoxic condition. * $p < 0.05$ compared with the normoxic condition analyzed by the unpaired Student's t-test.

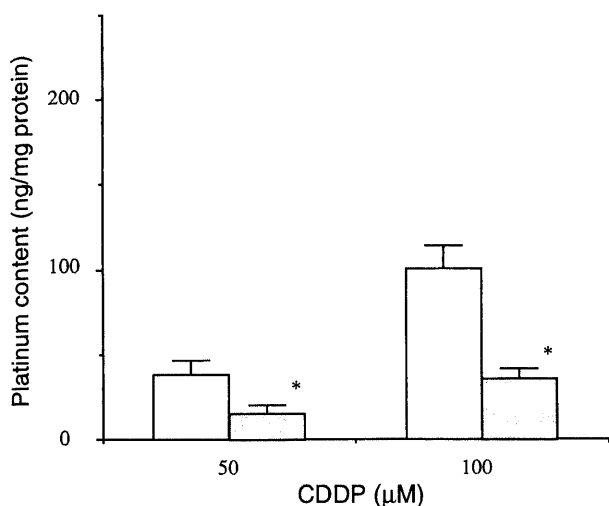


Fig. 4. Platinum accumulation into EBC-1 cells. Cells were treated with 50 μ M or 100 μ M of CDDP. The platinum contents were measured by atomic absorption spectrophotometry. Columns and bars indicate $\bar{x} \pm$ SD. □, cells under the normoxic condition; ■, cells under the hypoxic condition. * $p < 0.05$ compared with the normoxic condition analyzed by the unpaired Student's t-test.

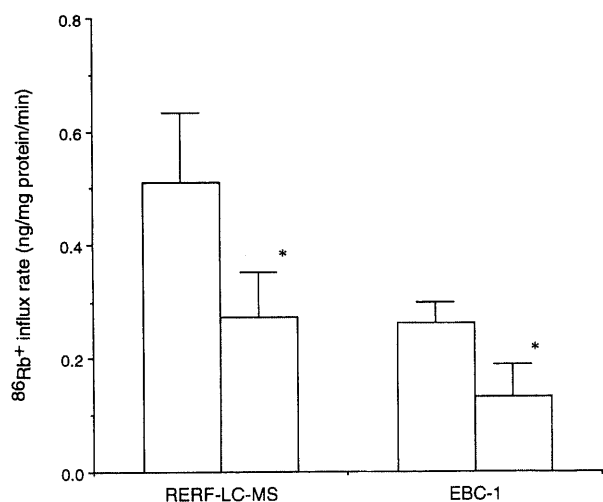


Fig. 5. ⁸⁶Rb⁺ influx to RERF-LC-MS cells or EBC-1 cells. ⁸⁶Rb⁺ influx was measured as a marker of Na⁺, K⁺-ATPase activity. Columns and bars indicate $\bar{x} \pm$ SD. □, cells under the normoxic condition; ■, cells under the hypoxic condition. * $p < 0.05$ compared with the normoxic condition analyzed by the unpaired Student's t-test.

は低酸素状態にて有意に低下し、この結果はRERF-LC-MS、EBC-1のいずれの細胞株においても同様であった。

Ⅲ. 細胞膜 Na⁺, K⁺-ATPase 活性

RERF-LC-MSとEBC-1について、⁸⁶RbCl流入率を指標として細胞膜Na⁺, K⁺-ATPase活性を定量した結果を示す(図5)。⁸⁶Rb流入率は、RERF-LC-MSにおいて正常酸素状態では0.51 ±

0.12ng/mg 蛋白/分、低酸素状態では0.27 ± 0.08ng/mg 蛋白/分、EBC-1において正常酸素状態では0.26 ± 0.04ng/mg 蛋白/分、低酸素状態では0.13 ± 0.06ng/mg 蛋白/分であり、細胞膜Na⁺, K⁺-ATPase活性はいずれの細胞株についても低酸素状態において有意に低下した。

考 察

切除不能非小細胞肺癌患者に対しては、CDDPをはじめとするプラチナ系抗腫瘍薬を中心とした抗腫瘍薬による化学療法が施行されている³⁾。しかしながらその奏効率は低く、単剤で用いた場合で9-19%、他剤との併用療法の場合で20-40%程度であり⁴⁾²⁸⁾~³⁰⁾、全く満足できるものとはいえない。この治療成績を改善するために、放射線治療の併用³¹⁾³²⁾や新規抗腫瘍薬の開発³²⁾など様々な新しい治療法が試みられている。一方、プラチナ系抗腫瘍薬の作用機序や耐性機序の解明は、この抗腫瘍薬をより効果的に使用するためにも重要な意義を持つと考えられる。

肺癌をはじめとする悪性腫瘍の多くは固形腫瘍である。固形腫瘍では、外側では血管新生が盛んで腫瘍の増大や浸潤に関与しているが、腫瘍が増大するにつれて内部では血管の表面積が減少して乏血状態となり、低酸素状態になると報告されている¹⁵⁾。その酸素分圧は、固形腫瘍の内部では20mmHg以下と報告されている¹⁹⁾。肺癌内部の酸素分圧について、Gatenbyら¹⁷⁾はコンピューター断層撮影ガイド下にプローブを用いて検討し、周辺肺組織の酸素分圧70-75mmHgに対して腫瘍末梢部の酸素分圧は14mmHg、腫瘍中心部の酸素分圧は7mmHgであったと報告している。こうした腫瘍内部の低酸素状態は、酸素投与によっても改善されないとされている¹⁵⁾。

低酸素状態が癌細胞に与える影響については、これまでも種々の研究成績が報告されている。O'Dwyerら³³⁾は、大腸癌細胞HT-29を用いた検討にて、低酸素曝露によって薬剤感受性規定因子であるDT-ジアホラーゼ(DT-diaphorase)活性とGSHが増加することを示した。またYaoら³⁴⁾は同じくHT-29を用い、8時間の低酸素曝露の後、12時間にわたってアポトーシスが誘導されることを示した。さらにGraeberら³⁵⁾は乳癌や大腸癌など11種類の細胞株を用いて、低酸素状態にて癌抑制遺伝子産物であるp53蛋白の発現は増加するが、それが野生型であるかどうかの状態に関らず、細胞周期においてG₁期チェックポイントが活性化したと報告した。酸素状態の差異による抗腫瘍薬感受性の変化についてSiemannら³⁶⁾は、低酸素状態においてヒト腺癌細胞A549とマウス肉腫細胞KHT/ivに対するメルファラン(melphalan)の細胞毒性が有意に増強したと報告した。しかし、低酸素状態における非小細胞肺癌株のプラチナ系抗腫瘍薬感受性の変化については未だ明らかにされてはいない。

CDDPに対する細胞レベルにおける薬剤耐性の機構としては、細胞内蓄積の減少^{5)~7)}、細胞内解毒因子の増幅^{8)~11)}、DNA障害修復の亢進^{5)12)~14)}の関与が報告されている。CDDPの細胞内蓄積量の変化はこれら感受性規定因子の中で最も普遍的に認められており、自然耐性および獲得耐性細胞を用いた検討⁵⁾⁸⁾によって重要と報告されている。一般に、細胞内プラチナ蓄積量の低下の原因として、薬剤の細胞内取り込みの減少が考えられる。細胞内へのCDDPの取り込みについては、濃度勾配による受動的な機序が知られていた³⁷⁾。しかし、Andrewsら³⁸⁾は卵巣癌細胞株を用いた検討で、Na⁺, K⁺-ATPase阻害薬であるウアバイン(ouabain)で処理された細胞へのプラチナ蓄積量

が低下したことから、 Na^+ , K^+ -ATPase を介したエネルギー依存性の CDDP の能動輸送機構を示唆した。また Ohmori ら⁶⁾は、ウアバイン処理した非小細胞肺癌株 PC-14 において、CDDP 蓄積量が約 50% に減少したと報告した。さらに Ohmori ら⁷⁾は、ウアバイン耐性の PC-14 である PC-14/OB300 を樹立し、 Na^+ , K^+ -ATPase の mRNA 過剰発現が認められること、細胞内 CDDP 蓄積量が親株に比べて増加し、CDDP 感受性も増加したことを示し、非小細胞肺癌株においても細胞膜 Na^+ , K^+ -ATPase 活性が CDDP の細胞内取り込みに関与していることを明らかにした。著者は低酸素状態において、非小細胞肺癌株の CDDP 感受性が低下すること、CDDP と同じプラチナ系抗癌薬である CBDCA に対しても感受性が低下すること、そして図 3, 4 に示したごとく、低酸素状態において細胞内プラチナ蓄積量が低下することを明らかにした。そこで低酸素状態における細胞内プラチナ蓄積量低下における能動輸送の関与を明らかにする目的で、 Na^+ , K^+ -ATPase 活性を測定した。その結果、低酸素状態では細胞膜 Na^+ , K^+ -ATPase 活性は有意に低下していた。すなわち、低酸素状態は細胞膜 Na^+ , K^+ -ATPase 活性の低下を介して細胞内プラチナ蓄積量を低下させたと考えられた。その細胞内プラチナ蓄積量の低下が、低酸素状態における非小細胞肺癌株の CDDP と CBDCA に対する低感受性の主因と考えられた。

腫瘍内部の低酸素状態は、化学療法や放射線療法を行う上で重大な問題と考えられている¹⁷⁾¹⁹⁾²¹⁾²²⁾。こうした腫瘍内部の酸素状態は放射線治療の面から検討されることが多く¹⁷⁾¹⁸⁾²⁰⁾²²⁾、酸素状態を核医学的手法を用いて非侵襲的に評価することも試みられている²⁰⁾。今回の結果より、非小細胞肺癌細胞株では低酸素状態にて CDDP と CBDCA の抗癌薬感受性が低下することが明らかとなり、放射線治療のみならず化学療法においても、腫瘍内部の酸素状態は治療効果を左右するものとして重要である可能性が示唆された。肺癌化学療法に際しては、プラチナ系抗癌薬単剤よりも、低酸素に強い抗癌薬との併用などの工夫が必要であろう。

結 論

ヒト非小細胞肺癌培養細胞株を用いて、正常酸素状態と低酸素状態における CDDP 感受性を比較検討し、以下の結論を得た。

1. 低酸素状態において、CDDP 感受性は非小細胞肺癌由来の PC-9, RERF-LC-MS, EBC-1 のいずれの細胞株でも有意に低下した。
2. CBDCA についても、低酸素状態において抗癌薬感受性は PC-9, RERF-LC-MS, EBC-1 のいずれの細胞株でも有意に低下した。
3. 細胞内プラチナ蓄積量は、RERF-LC-MS, EBC-1 のいずれの細胞株でも低酸素状態において有意に低下した。
4. $^{86}\text{RbCl}$ の細胞内流入率によって評価した細胞膜 Na^+ , K^+ -ATPase 活性は、RERF-LC-MS, EBC-1 のいずれの細胞株でも低酸素状態において有意に低下した。

以上の成績から、非小細胞肺癌培養細胞株では低酸素状態にて細胞膜 Na^+ , K^+ -ATPase 活性が低下しており、細胞内プラチナ蓄積量の低下を介して CDDP と CBDCA の抗癌薬感受性低下の原因となっていることが示唆され、低酸素状態が非小細胞肺癌の化学療法の治療効果に影響を及ぼす因子の一つであると考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、当研究の御指導、御校閲を賜りました金沢大学医学部第三内科講座松田保教授、直接に御指導頂いた藤村政樹講師ならびに笠原寿郎助手に心より感謝いたします。更に御協力いただいた呼吸器研究室の諸先生方に重ねて御礼申し上げます。

なお、本研究の内容は、第 38 回日本呼吸器学会総会 (熊本, 1998 年 3 月)、第 39 回日本肺癌学会総会 (金沢, 1998 年 10 月) において発表した。

文 献

- 1) 福岡正博. 肺癌の診断と治療 最近の動向. 日内会誌 86: 1-3, 1997
- 2) Miller TP. Rationale for the use of chemotherapy in non-small cell lung cancer. *Semin Oncol* 17: 11-13, 1990
- 3) American Society of Clinical Oncology Group. Clinical practice guidelines for the treatment of unresectable non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 15: 2996-3018, 1997
- 4) Bonomi PD, Finkelstein DM, Ruckdeschel JC, Blum RH, Green MD, Mason B, Hahn R, Tormey DC, Harris J, Comis R, Glick J. Combination chemotherapy versus single agents followed by combination chemotherapy in stage IV non-small cell lung cancer; a study of the Eastern Cooperative Oncology Group. *J Clin Oncol* 7: 1602-1613, 1989
- 5) Bungo M, Fujiwara Y, Kasahara K, Nakagawa K, Ohe Y, Sasaki Y, Irino Y, Saijo N. Decreased accumulation as a mechanism of resistance to cis-diamminedichloroplatinum (II) in human non-small cell lung cancer cell line: relation to DNA damage and repair. *Cancer Res* 50: 2549-2553, 1990
- 6) Ohmori T, Morikage T, Sugimoto Y, Fujiwara Y, Kasahara K, Nishio K, Ohta S, Sasaki Y, Takahashi T, Saijo N. The mechanism of the difference in cellular uptake of platinum derivatives in non-small cell lung cancer cell line (PC-14) and its cisplatin-resistant subline (PC-14/CDDP). *Jpn J Cancer Res* 84: 83-92, 1993
- 7) Ohmori T, Nishio K, Ohta S, Kubota N, Adachi M, Komiya K, Saijo N. Ouabain-resistant non-small-cell lung-cancer cell line shows collateral sensitivity to cis-diamminedichloroplatinum (II) (CDDP). *Int J Cancer* 57: 111-116, 1994
- 8) Fujiwara Y, Sugimoto Y, Kasahara K, Bungo M, Yamakido M, Tew KD, Saijo N. Determinants of drug response in a cisplatin-resistant human lung cancer cell line. *Jpn J Cancer Res* 81: 527-535, 1990
- 9) Tew KD, Bomber AM, Hoffman SJ. Ethacrynic acid and piperprost as enhancers of cytotoxicity in drug resistant and sensitive cell lines. *Cancer Res* 48: 3622-3625, 1988
- 10) Nakagawa K, Saijo N, Tsuchida S, Sasaki M, Tsunokawa Y, Yokota J, Muramatsu M, Sato K, Terada M, Tew KD. Glutathione-S-transferase p as a determinant of drug resistance in transfectant cell lines. *J Biol Chem* 265: 4296-4301, 1990
- 11) 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
- 12) Eastman A, Schulte N. Enhanced DNA repair as a mechanism of resistance to cis-diamminedichloroplatinum (II).

Biochemistry 27: 4730-4734, 1988

- 13) Fink D, Nebel S, Aebi S, Zheng H, Cenni B, Nehme A, Christen RD, Howell SB. The role of DNA mismatch repair in platinum drug resistance. *Cancer Res* 56: 4881-4886, 1996
- 14) Lanzi C, Perego P, Supino R, Romanelli S, Pensa T, Carenini N, Viano I, Colangelo D, Leone R, Apostoli P, Cassinelli G, Gambetta RA, Zunino F. Decreased drug accumulation and increased tolerance to DNA damage in tumor cells with a low level of cisplatin resistance. *Biochem Pharmacol* 55: 1247-1254, 1998
- 15) Vaupel P. Hypoxia in neoplastic tissue. *Microvasc Res* 13: 399-408, 1977
- 16) Vaupel P, Frinak S, Bicher H. Heterogeneous oxygen partial pressure and pH distribution in C3H mouse mammary adenocarcinoma. *Cancer Res* 41: 2008-2013, 1981
- 17) Gatenby RA, Coia LR, Richter MP, Katz H, Moldofsky PJ, Engstrom P, Brown DQ, Brookland R, Broder GJ. Oxygen tension in human tumors: In vivo mapping using CT-guided probes. *Radiology* 156: 211-214, 1985
- 18) Gatenby RA, Kessler HB, Rosenblum JS, Coia LR, Moldofsky PJ, Hartz WH, Broder GJ. Oxygen distribution in squamous cell carcinoma metastases and its relationship to outcome of radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 14: 831-838, 1988
- 19) Vaupel P, Kallinowski F, Okunieff P. Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumor: a review. *Cancer Res* 49: 6449-6465, 1989
- 20) Chapman JD. Measurement of tumor hypoxia by invasive and non-invasive procedure: a review of recent clinical studies. *Radiother Oncol* 20(Suppl): 13-19, 1991
- 21) Bush RS, Jenkin RDT, Allt WEC, Beale FA, Bean H, Dembo AJ, Pringle JF. Definitive evidence for hypoxic cells influencing cure in cancer therapy. *Br J Cancer* 37 (Suppl III): 302-306, 1978.
- 22) 笹井啓資, 小野公二, 高橋正治, 阿部光幸. 動脈血酸素含有量による肺扁平上皮癌放射線感受性の予測. *癌の臨床* 35: 1554-1557, 1989
- 23) Mosmann T. Rapid calorimetric assay for cellular growth and survival: Application of proliferation and cytotoxic assay. *J Immunol Methods* 65: 55-63, 1983
- 24) Bando T, Kasahara K, Shibata K, Nakatsumi Y, Fujimura M, Matsuda T. Role of DT-diaphorase as a determinant of sensitivity to mitomycin analogues in non-small cell lung cancer cell lines. *Int J Oncol* 5: 819-825, 1994
- 25) Bando T, Kasahara K, Shibata K, Numata Y, Heki U, Shirasaki H, Iwasa K, Fujimura M, Matsuda T. Cytotoxicity of a novel indoloquinone EO9 in hypoxic non-small cell lung cancer cell line. *Int J Oncol* 7: 789-793, 1995
- 26) Bando T, Kasahara K, Shibata K, Numata Y, Heki U, Shirasaki H, Iwasa K, Fujimura M, Matsuda T. Modulation of sensitivity to mitomycin C and a dithiol analogue by tempol in non-small-cell lung cancer cell lines under hypoxia. *J Cancer Res Clin Oncol* 122: 21-26, 1996
- 27) Rozengurt E, Heppel LA. Serum rapidly stimulates ouabain-sensitive $^{86}\text{Rb}^+$ influx in quiescent 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 72: 4492-4495, 1975
- 28) Klastersky J, Sculier JP, Bureau G, Libert P, Ravez P, Vandermoten G, Thiriaux J, Cordier R, Dabouis G, Brohee D, Themelin L, Mommen P for the Lung Cancer Working Party (Belgium). Cisplatin versus cisplatin plus etoposide in the treatment of advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 7: 1087-1092, 1989
- 29) Kawahara M, Furuse K, Kodama N, Yamamoto M, Kubota K, Takada M, Negoro S, Kusunoki Y, Matui K, Takifuji N, Fukuoka M. A randomized study of cisplatin versus cisplatin plus vindesine for non-small cell lung carcinoma. *Cancer* 68: 714-719, 1991
- 30) Fukuoka M, Masuda N, Furuse K, Negoro S, Takada M, Matsui K, Takifuji N, Kudoh S, Kawahara M, Ogawara M, Kodama N, Kubota K, Yamamoto M, Kusunoki Y. A randomized trial in inoperable non-small-cell lung cancer: Vindesine and cisplatin versus mitomycin, vindesine and cisplatin versus etoposide and cisplatin alternating with vindesine and mitomycin. *J Clin Oncol* 9: 606-613, 1991
- 31) Furuse K, Kubota K, Kawahara M, Kodama N, Ogawara M, Akira M, Nakajima S, Takada M, Kusunoki Y, Negoro S, Matsui K, Masuda N, Takifuji N, Kudoh S, Nishioka M, Fukuoka M for the Southern Osaka Lung Cancer Study Group. Phase II study of concurrent radiotherapy and chemotherapy for unresectable stage III non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 13: 869-875, 1995
- 32) Saijo N. New chemotherapeutic agents for the treatment of non-small cell lung cancer. The Japanese experience. *Chest* 113: 17S-23S, 1998
- 33) O'Dwyer PJ, Yao K-S, Ford P, Godwin AK, Clayton M. Effects of hypoxia on detoxicating enzyme activity and expression in HT29 colon adenocarcinoma cells. *Cancer Res* 54: 3082-3087, 1994
- 34) Yao K-S, Clayton M, O'Dwyer PJ. Apoptosis in human adenocarcinoma HT29 cells induced by exposure to hypoxia. *J Natl Cancer Inst* 87: 117-122, 1995
- 35) Graeber TG, Peterson JF, Tsai M, Monica K, Fornace AJ, Giaccia AJ. Hypoxia induces accumulation of p53 protein, but activation of G₁-phase checkpoint by low-oxygen conditions is independent of p53 status. *Mol Cell Biol* 14: 6264-6277, 1994
- 36) Siemann DW, Chapman M, Beikirch A. Effects of oxygenation and pH on tumor cell response to alkylating chemotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 20: 287-289, 1991
- 37) Gately DP, Howell SB. Cellular accumulation of the anticancer agent cisplatin: a review. *Br J Cancer* 67, 1171-1176, 1993
- 38) Andrews PA, Mann SC, Huynh HH, Albright KD. Role of Na⁺, K⁺-adenosine triphosphatase in the accumulation of cis-diamminedichloroplatinum (II) in human ovarian carcinoma cells. *Cancer Res* 51: 3677-3681, 1991

Resistance to Cisplatin of Human Non-Small Cell Lung Cancer Cell Lines under Hypoxic Conditions. Kei-ichi Iwasa, Department of Internal Medicine (III), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 – J. Juzen Med Soc., **108**, 233 – 240 (1999)

Key words non-small cell lung cancer, cis-diamminedichloroplatinum (II), hypoxic condition, drug resistance, Na⁺, K⁺-ATPase

Abstract

Although cis-diamminedichloroplatinum (II) (CDDP) is one of the most active anticancer agents in non-small cell lung cancer (NSCLC) chemotherapy, its efficacy is often limited by natural or acquired resistance. In this study, sensitivities of NSCLC cell lines to platinum agents were evaluated under both hypoxic and normoxic condition. IC₅₀ values of CDDP for PC-9, RERF-LC-MS, and EBC-1 cells assessed by the MTT assay were significantly higher under hypoxic conditions compared with those under normoxic conditions. The sensitivity of these cells to carboplatin also significantly decreased under hypoxic conditions. To elucidate the mechanisms of resistance to platinum agents under hypoxic conditions, intracellular platinum accumulation was measured in RERF-LC-MS and EBC-1 cells by atomic absorption spectrometry. For RERF-LC-MS cells, exposure to 50 or 100 μ M of CDDP respectively decreased platinum accumulation by 40.4 and 40.8% respectively comparative to the levels found under normoxic conditions. In case of EBC-1 cells, platinum accumulation was decreased by 38.4 or 35.9% comparative to normoxic conditions. Because platinum accumulation into NSCLC cells has been shown to be regulated by Na⁺, K⁺-ATPase, Na⁺, K⁺-ATPase activity was determined by measuring ⁸⁶Rb influx. In each cell line, there was a significant decrease in Na⁺, K⁺-ATPase activity under hypoxic conditions: ⁸⁶Rb influx was 0.51 \pm 0.12 ng/min/mg protein under normoxic conditions versus 0.27 \pm 0.08 ng/min/mg protein under hypoxic conditions in RERF-LC-MS cells, and 0.26 \pm 0.12 ng/min/mg protein under normoxic conditions versus 0.13 \pm 0.06 ng/min/mg protein under hypoxic condition in EBC-1 cells. This data suggests that the decrease in Na⁺, K⁺-ATPase activity under hypoxic conditions induces a lower accumulation of platinum in the NSCLC cell lines, resulting in the corresponding hyposensitivity to platinum agents under hypoxic conditions. Na⁺, K⁺-ATPase activity might be an important factor in determining the sensitivity to platinum agents of NSCLC.