

ヒト肺癌培養細胞株のシスプラチン耐性機構におけるトロンボキサン受容体の役割

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/2297/9175

ヒト肺癌培養細胞株のシスプラチン耐性機構における トロンボキサン受容体の役割

金沢大学医学部医学科内科学第三講座 (主任: 松田 保教授)

坂 東 琢 磨

肺癌の化学療法における最大の障壁は抗悪性腫瘍薬に対する耐性である。したがってその耐性機構の解明は重要な研究課題の一つである。シスプラチン (cis-diamminedichloroplatinum (II), CDDP) は代表的抗悪性腫瘍薬であるが、シスプラチンに対する耐性機構としては、細胞内への薬剤取り込み機構が重要で、細胞膜 Na^+ , K^+ -ATP 分解酵素 (Na^+ , K^+ -ATPase) 活性がその規定因子の一つであることが報告されている。本研究ではヒト肺癌培養細胞株を用いて、CDDP 細胞内取り込み機構における細胞膜 Na^+ , K^+ -ATPase 活性の役割とトロンボキサン受容体の関与について検討した。非小細胞肺癌株である EBC-1 株, PC-3 株, RERF-LC-MS 株では、選択的トロンボキサン受容体拮抗薬カルシウム 5(z)-[1R, 2S, 3S, 4S]-7-[3-フェニルスルホニルアミノバイシクロ [2.2.1] ヘプト-2-イル] -5-ヘプトノエイトハイドレイト (calcium 5(z)-[1R, 2S, 3S, 4S]-7-[3-phenylsulfonylamino]bicyclo [2.2.1] hept-2-yl]-5-heptenoate hydrate, S-1452) あるいは (3R)-3-(4-フルオロフェニルスルホナミド)-1, 2, 3, 4-テトラヒドロ-9-カルバゾールプロパノイックアシッド ((3R)-3-(4-fluorophenylsulfonamido)-1, 2, 3, 4-tetrahydro-9-carbazolepropanoic acid, BAYu3405) 処理により、その CDDP に対する感受性が増強された。また、非小細胞肺癌株では S-1452 処理により細胞膜 Na^+ , K^+ -ATPase が活性化され、RERF-LC-MS 株では細胞内 CDDP 取り込み量が増加した。小細胞肺癌株である SBC-1, SBC-3 の各細胞株では S-1452 処理で CDDP に対する感受性と細胞膜 Na^+ , K^+ -ATPase 活性は変化せず、SBC-3 株においては細胞内 CDDP 取り込み量は変化しなかった。小細胞肺癌株である SBC-2 株では、S-1452 処理により細胞膜 Na^+ , K^+ -ATPase 活性が増強されたが、CDDP 感受性の増強は得られなかった。以上の結果から、トロンボキサン受容体は非小細胞肺癌株の CDDP 感受性の規定因子として重要な役割を果たしており、細胞膜 Na^+ , K^+ -ATPase 活性を介して CDDP の細胞内取り込みに大きく関与していることが示唆された。しかし、小細胞肺癌株では CDDP 耐性機構における細胞膜 Na^+ , K^+ -ATPase およびトロンボキサン受容体の関与は小さく、この差異が非小細胞肺癌と小細胞肺癌に対する CDDP の抗腫瘍効果が大きく異なることの一因と考えられる。

Key words lung cancer, cis-diamminedichloroplatinum (II), drug resistance, Na^+ , K^+ -ATPase, thromboxane receptor

シスプラチン (cis-diamminedichloroplatinum (II), CDDP) の臨床導入は多くの固形癌において治療成績の改善をもたらした¹⁾が、肺癌の化学療法は現在においても多くの臨床試験が行われている段階で標準的治療法は確立されていない²⁾。癌化学療法の最大の障壁は薬剤耐性であり、これを克服するためには耐性機構の解明が不可欠である。また、肺癌はその生物学的特性の相違から非小細胞肺癌と小細胞肺癌に分類され、CDDP に対する感受性が両者において大きく異なる³⁾ことは周知の事実ではあるが、その要因についての研究報告は乏しく耐性機構が異なると推定されているに過ぎない³⁾。

CDDP に対する薬剤耐性機構としては、細胞内蓄積機構⁴⁻⁷⁾、細胞質内解毒機構⁸⁻¹⁰⁾、DNA 修復機構¹¹⁾の関与が報告されている。非小細胞肺癌における CDDP 耐性機構としては、細胞内蓄積機構、特に細胞膜 Na^+ , K^+ -ATP 分解酵素 (Na^+ , K^+ -ATPase) を介するエネルギー依存性の細胞内取り込みの低下^{12,13)}や、細胞内解毒機構の亢進、特にグルタチオン (glutathione, GSH) の増加⁹⁾などが報告されている。

一方、小細胞肺癌における CDDP 耐性機構としては、細胞質内解毒機構の亢進、特にグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (glutathione-S-transferase, GST)¹⁴⁾やメタロチオネイン (metallothionein, MT)¹⁵⁾の役割に関する報告がみられるが、小細胞肺癌の CDDP 細胞内蓄積機構は詳らかではない。また、肺癌細胞株における DNA 修復機構の関与は薄いと報告が多い¹⁶⁾。

前述の如く非小細胞肺癌の CDDP 細胞内取り込みには細胞膜 Na^+ , K^+ -ATPase を介する能動輸送機構が重要な役割を果たしており^{12,13)}、その活性が CDDP 感受性の規定因子の一つとして重要と考えられているが、小細胞肺癌における役割は明らか

ではない。また、肺癌細胞株における DNA 修復機構の関与は薄いと報告が多い¹⁶⁾。

平成7年11月20日受付, 平成7年12月20日受理

Abbreviations: CDDP, cis-diamminedichloroplatinum (II); DMSO, dimethylsulfoxide; GSH, glutathione; GST, glutathione-S-transferase; FBS, fetal bovine serum; IC₅₀, drug concentration inhibiting cell growth by 50%; MT, metallothionein; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; PBS, phosphate-buffered saline

ではない。さらに癌細胞の細胞膜 Na^+ , K^+ -ATPase 活性に影響を及ぼす因子に関する研究はまったく報告されていない。

一般に Na^+ , K^+ -ATPase は細胞膜の能動輸送に関与し、神経や筋において細胞内外のイオンバランスの形成を司る重要な酵素と考えられている¹⁹⁾が、近年その活性とアラキドン酸代謝産物との関連性についての報告が散見される。ストレプトゾトシンによって惹起された実験的糖尿病動物モデルにおいて、筋や神経組織の Na^+ , K^+ -ATPase 活性が低下^{20)~22)}し、さらにトロンボキササン A_2 とプロスタグランジン I_2 の産生比が変化する^{23)~26)}との報告がある。また、ラットの摘出子宮組織における Na^+ , K^+ -ATPase 活性とアラキドン酸代謝系の関連性も報告されている²⁷⁾。

以上の知見を踏まえ、本研究ではヒト肺癌培養細胞株の CDDP 感受性、細胞内薬剤蓄積量、および細胞膜 Na^+ , K^+ -ATPase 活性に及ぼす選択的トロンボキササン受容体拮抗薬の影響を調べることにより、CDDP の作用機序の第一段階である細胞内蓄積機構における細胞膜 Na^+ , K^+ -ATPase 活性の重要性とその規定因子としてのトロンボキササン受容体の役割について検討した。

材料および方法

I. 試薬

RPMI1640, リン酸緩衝液 (pH 7.4) (phosphate-buffered saline, PBS), 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) はニッセイ薬品工業 (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 はブリストル・マイヤーズ スクイブ株式会社 (東京) より供与された。選択的トロンボキササン受容体拮抗薬カルシウム 5 (2)-[1R,2S,3S,4S-7-[3-フェニルсульフォニルアミノバイシクロ [2.2.1]ヘプト-2-イル]-5-ヘプトノエイトハイドロイト (calcium 5 (2)-[1R,2S,3S,4S-7-[3-phenylsulfonylamino]bicyclo [2.2.1] hept-2-yl]-5-heptenoate hydrate, S-1452) と (3R)-3-(4-フルオロフェニルсульフォナミド)-1,2,3,4-テトラヒドロ-9-カルバゾールプロパノイックアシッド ((3R)-3-(4-fluorophenylsulfonamido)-1,2,3,4-tetrahydro-9-carbazolepropanoic acid, BAYu3405) はそれぞれ塩野義製薬株式会社 (大阪) とバイエル薬品株式会社 (大阪) より供与された。⁸⁵RbCl はアマジャム・ジャパン (東京) より購入した。ジメチルスルフォキシド (dimethylsulfoxide, DMSO) と HEPES は和光純薬 (大阪) から、また 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-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT) と SDS は Sigma (St. Louis, USA) より購入した。

II. 細胞株とその培養条件

ヒト非小細胞肺癌由来の培養細胞株である EBC-1 (肺扁平上皮癌由来), PC-3 (肺腺癌由来), RERF-LC-MS (肺腺癌由来) とヒト小細胞肺癌由来の培養細胞株である SBC-1, SBC-2, SBC-3 の各細胞株を用いた。これらの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) より供与された。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% CO_2 濃度、37°C で培養した。

III. 感受性試験

薬剤感受性は既報^{28)~30)}に従って細胞増殖阻害試験で求めた。

各細胞株を前述の培養液に浮遊し、EBC-1 (1.0×10^6 個/ml), PC-3 (1.0×10^6 個/ml), RERF-LC-MS (1.6×10^6 個/ml), SBC-1 (1.6×10^6 個/ml), SBC-2 (1.0×10^6 個/ml), SBC-3 (1.6×10^6 個/ml) に調整した。96穴V底マルチプレート (Costar, Cambridge, USA) の各ウェルに細胞浮遊液を 100 μl 注ぎ培養器内に 1 時間静置した。S-1452 500 μM , BAYu3405 500 μM , あるいは溶媒単独を 50 μl (トロンボキササン受容体拮抗薬は殺細胞効果を示さない最大濃度を用いた), さらに各濃度の CDDP 50 μl を各ウェルに加え、2 時間培養器内に静置した。その後、培養液での洗浄を 2 回施した上で、上清を注意深く吸引し培養液 200 μl を各ウェルに加えた。マイクロビレットで攪拌しながら各ウェルから 100 μl を取り出し、96穴平底マルチプレート (Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA) に移した。さらに培養液を 100 μl 加え計 200 μl として培養器内に静置した。

96時間培養後、PBS に溶解し 5mg/ml に調整した MTT を各ウェルに 20 μl 加え、4 時間培養した後に上清を吸引し DMSO でホルマザン結晶を溶解した。10 分間攪拌した後に自動吸光度計 (EAR 340 AT, SLT, Vienna, Austria) を用いて、波長 560nm における OD 値を波長 660nm における値を対照として測定した。得られた OD 値から細胞生存率曲線を描き、幾何学的に 50% 増殖阻害濃度 (drug concentration inhibiting cell growth by 50%, IC_{50} 値) を求め薬剤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。

IV. 細胞内 CDDP 蓄積量の定量

非小細胞肺癌 (腺癌) 由来の RERF-LC-MS 株と小細胞肺癌由来の SBC-3 株において細胞内 CDDP 蓄積量を測定した。各細胞株を 1×10^7 個/ml に調整し、組織培養皿 (Falcon) で 24 時間培養後、上清を CDDP 100 μM と S-1452 500 μM あるいは溶媒単独を含む培養液に交換した。薬剤暴露の 1, 2 時間後の細胞と、さらに薬剤暴露の 2 時間後に PBS で 2 回洗浄し、その 1, 2 時間後の細胞を採取、PBS に浮遊しそれぞれの細胞をソニケーター Branson sonifier 250 (Branson, Danbury, CT, USA) で破碎した。各検体のプラチナ濃度を原子吸光法で測定した。

V. 細胞膜 Na^+ , K^+ -ATPase 活性の定量

Rozengut らの方法³¹⁾と Ohmori らの方法³²⁾に準じ、⁸⁶RbCl の細胞内取り込み量で細胞膜 Na^+ , K^+ -ATPase 活性を定量化した。各細胞株を 1×10^6 個/ml に調整し HEPES 緩衝液 (pH 7.4) (10mM ブドウ糖, 5mM KCl, 1mM MgCl_2 , 1mM CaCl_2 , 10mM HEPES-HCl, 123mM NaCl) に浮遊した。S-1452 500 μM あるいは溶媒単独を加え 20 分間静置、さらに ⁸⁶RbCl 1 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ を加えて 40 分間静置した後に、PBS で 2 回洗浄し PBS に浮遊した。各検体を液体シンチレーター ACS II (アマ

Table 1. Modulation of sensitivity to CDDP by S-1452 in non-small cell lung cancer cell lines

Cell line	IC_{50} value (μM)	
	Vehicle	S-1452 500 μM
EBC-1	146.0 \pm 32.2 ^a	32.1 \pm 11.5 ^b
PC-3	114.8 \pm 26.4	30.6 \pm 8.2 ^b
RERF-LC-MS	89.5 \pm 9.1	13.7 \pm 5.2 ^b

a, Each value is $\bar{x} \pm \text{SD}$ of the three independent experiments b, $p < 0.01$ compared to the value for the cells treated with vehicle

シヤム・ジャパン)に溶解し、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)で測定した。37℃と4℃の二条件で同時に実験を行いその放射活性の差をもって細胞膜 Na^+ , K^+ -ATPase 活性とした。

VI. タンパク質濃度の定量

各検体のタンパク質濃度は BCA プロテインアッセイキット (Pierce, Rockford, IL, USA) を用いて測定した。

VII. 統計学的分析

Student の t テストで2群間検定を行い、危険率5%未満の場合有意差ありとした。数値は平均値 \pm SD で表示した。

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で評価したシスプラチン感受性の成績を示す。

非小細胞肺癌株の CDDP に対する IC_{50} 値 (表1) は、S-1452 500 μM 処理により、EBC-1, PC-3, RERF-LC-MS の3株で有意に低値となった。また、BAYu3405 500 μM 処理によっても、各細胞株において IC_{50} 値の有意な改善が得られた (表2)。すなわち、非小細胞肺癌株ではトロンボキサン受容体拮抗薬によって CDDP 感受性が著しく増強された。

表3に示す如く、小細胞肺癌株の CDDP に対する IC_{50} 値は S-1452 500 μM 処理によっても、SBC-1, SBC-2, SBC-3 の3株で有意な変化は認められなかった。すなわち、小細胞肺癌株ではトロンボキサン受容体拮抗薬の CDDP 感受性への影響は明らかではなかった。

II. 細胞内 CDDP 蓄積量

非小細胞肺癌株 RERF-LC-MS と小細胞肺癌株 SBC-3 における CDDP の細胞内蓄積量を経時的に観察した成績を示す。

RERF-LC-MS 株では、1時間後、2時間後には時間依存性に細胞内の CDDP 蓄積量が増加した。S-1452 500 μM 処理によりその蓄積量はそれぞれ有意に増加した (図1)。2時間後に薬

Table 2. Modulation of sensitivity to CDDP by BAYu3405 in non-small cell lung cancer cell lines

Cell line	IC_{50} value (μM)	
	Vehicle	BAYu3405 500 μM
EBC-1	155.8 \pm 12.6*	19.8 \pm 3.9*
PC-3	120.0 \pm 16.7	13.8 \pm 4.3*
RERF-LC-MS	98.6 \pm 10.1	14.4 \pm 2.2*

a. Each value is $\bar{x} \pm \text{SD}$ of the three independent experiments b. $p < 0.01$ compared to the value for the cells treated with vehicle

Table 3. Modulation of sensitivity to CDDP by S-1452 in small cell lung cancer cell lines

Cell line	IC_{50} value (μM)	
	Vehicle	S-1452 500 μM
SBC-1	8.2 \pm 1.5*	6.3 \pm 2.1
SBC-2	15.4 \pm 4.5	9.5 \pm 1.3
SBC-3	1.8 \pm 1.4	2.4 \pm 1.5

a. Each value is $\bar{x} \pm \text{SD}$ of the three independent experiments

剤を除いた後は対照細胞と S-1452 処理細胞では CDDP の細胞内残存率は同等であった。すなわち、S-1452 処理により CDDP の細胞内蓄積量が増加するが、これは排泄の減少ではなく取り込みの増加によると考えられた。

一方、SBC-3 株では1時間後、2時間後には時間依存性に細胞内の CDDP 蓄積量が増加したが、S-1452 500 μM 処理によっても蓄積量には有意な変化はなかった (図2)。薬剤除去後の細胞内残存率は同等であった。

III. 細胞膜 Na^+ , K^+ -ATPase 活性

$^{86}\text{RbCl}$ の細胞内取り込み量を指標として、各細胞株の細胞膜 Na^+ , K^+ -ATPase 活性を測定した成績を示す。

非小細胞肺癌由来の3株の細胞膜 Na^+ , K^+ -ATPase 活性は、S-1452 500 μM 処理により各細胞株で有意に増強された (図3)。

一方、小細胞肺癌株については、SBC-2 株の細胞膜 Na^+ , K^+ -ATPase 活性は S-1452 500 μM 処理により有意に活性化されたが、SBC-1 株と SBC-3 株では S-1452 処理の影響は明らかではなかった (図4)。

なお、非小細胞肺癌株と小細胞肺癌株の細胞膜 Na^+ , K^+ -ATPase 活性はほぼ同等であった。

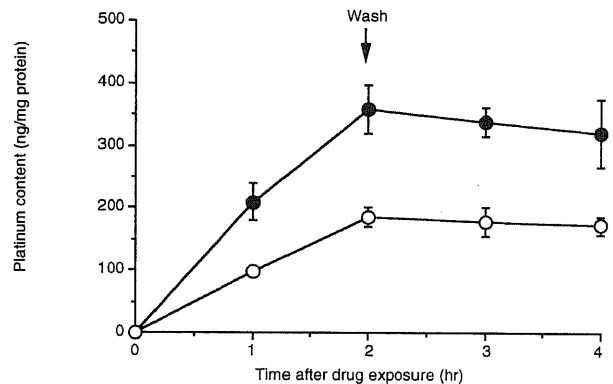


Fig. 1. Intracellular accumulation of platinum in RERF-LC-MS cell line. All cells were treated with 100 μM CDDP for 1 or 2 hr. Cells treated with 100 μM CDDP were washed with cold PBS and incubated for 1 or 2 hr in drug-free medium. \circ , RERF-LC-MS with vehicle; \bullet , RERF-LC-MS with 500 μM S-1452. Bars, SD.

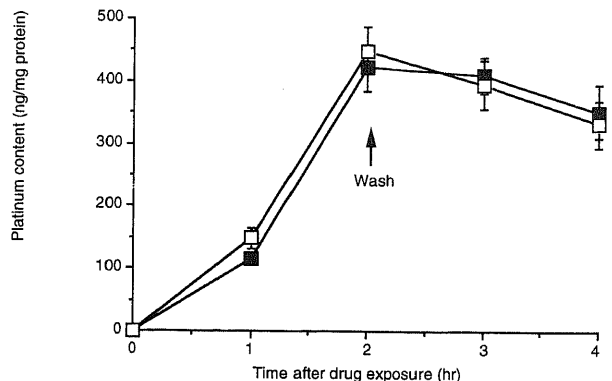


Fig. 2. Intracellular accumulation of platinum in SBC-3 cell line. All cells were treated with 100 μM CDDP for 1 or 2 hr. Cells treated with 100 μM CDDP were washed with cold PBS and incubated for 1 or 2 hr in drug-free medium. \square , SBC-3 with vehicle; \blacksquare , SBC-3 with 500 μM S-1452. Bars, SD.

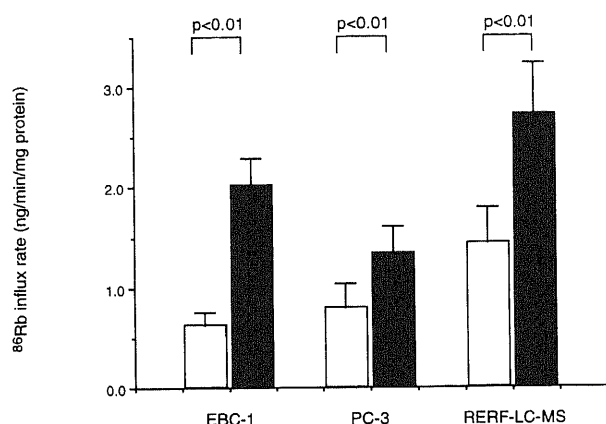


Fig. 3. ^{86}Rb influx of non-small cell lung cancer cell lines. □, cells with vehicle; ■, cells with 500 μM S-1452. Bars, SD.

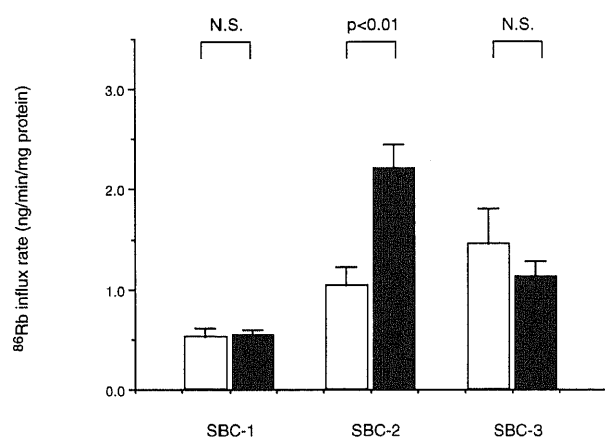


Fig. 4. ^{86}Rb influx of small cell lung cancer cell lines. □, cells with vehicle; ■, cells with 500 μM S-1452. Bars, SD.

考 察

代表的抗悪性腫瘍薬である CDDP は多くの固形癌において臨床応用されている¹⁾が、その成績は満足できるものではなく、特に非小細胞肺癌ではその奏効率²⁾は 20~30% 程度²⁾であり、治療成績の改善が強く望まれている。化学療法の治療成績の向上に関する試みとしては、多剤併用療法における抗悪性腫瘍薬の組み合わせや新しい投与方法の開発、あるいは効果増強薬の開発などが挙げられる³⁾が、いずれの試みにおいても抗悪性腫瘍薬の作用機序、即ち耐性機序の解明が重要な意義をもつと考えられる。

CDDP の耐性機序としては、薬剤の細胞内蓄積機構^{4)~7)}、細胞質内解毒機構^{8)~10)}、DNA の修復機構¹¹⁾などが関与すると考えられているが、特に細胞内への CDDP 蓄積機構は、作用機序の第一段階として重要視され多くの検討がなされている¹²⁾。CDDP の細胞膜内側への通過は受動的拡散と能動輸送機構の両者が関与すると考えられている¹³⁾。Andrews ら³³⁾は卵巣癌細胞株を用いて CDDP の能動輸送機構とその感受性規定因子としての重要性を初めて報告した。すなわち、ヒト卵巣癌細胞株 2008 とその CDDP 耐性株 2008/DDP を用いて CDDP の細胞内蓄積機構の差異を検討した結果、 Na^+ 、 K^+ -ATPase の阻害薬であるウア

バインで処理すると 2008 株で CDDP の細胞内蓄積量が約 50% に減少し、ATP の枯渇した状態や K^+ 非存在下での培養によっても CDDP の細胞内蓄積量が減少し、さらに細胞内蓄積量と細胞外液の Na^+ 濃度が相関した。これらの現象は 1 分以内に検出されたため、細胞外への排泄相ではなく細胞内への取り込み相に変化が生じたものと推定されている。また、耐性株 2008/DDP では細胞膜 Na^+ 、 K^+ -ATPase 活性が有意に低下していたことも含め、細胞膜 Na^+ 、 K^+ -ATPase は CDDP をエネルギー依存性に細胞内に取り込み、この酵素活性の低下が CDDP の耐性機序の因子として重要と結論した。Ohmori ら³⁴⁾は、非小細胞肺癌株 PC-14 とその CDDP 耐性株 PC-14/CDDP において CDDP 感受性に及ぼすウアバインの影響を検討した。耐性株 PC-14/CDDP においては親株 PC-14 に比べて CDDP の細胞内蓄積が 23% に減少し、細胞膜 Na^+ 、 K^+ -ATPase 活性が有意に低下していた。また、ウアバイン処理により PC-14 株における CDDP 蓄積量が 60% 減少したことから、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することが確認された。さらに Ohmori ら³⁵⁾は PC-14 株からウアバイン耐性株を樹立し、CDDP 取り込み機構における細胞膜 Na^+ 、 K^+ -ATPase 活性の重要性を強調した。一方、小細胞肺癌は一般に CDDP に対する感受性が極めて良好である²⁾。その小細胞肺癌株の CDDP 耐性機構においては細胞内蓄積機構の関与は小さいとの報告¹³⁾¹⁴⁾が多いが、CDDP の取り込み機構に関する知見は乏しい。今回の検討では、非小細胞肺癌株では細胞膜 Na^+ 、 K^+ -ATPase の活性化により CDDP の細胞内取り込み量が増加し、さらに CDDP 感受性が増強された。この成績は従来の報告に一致するものである。さらに、同じ実験系で検討した結果、小細胞肺癌株では細胞膜 Na^+ 、 K^+ -ATPase 活性と CDDP 感受性には関連性が見い出せなかったことから、小細胞肺癌株の CDDP 取り込み機構は他の癌種と大きく異なることが示唆された。小細胞肺癌株において CDDP の能動輸送機構が存在するか否か、あるいは受動的拡散すなわち細胞膜の透過性が著しく亢進しているか否かなどは今後の検討課題と考えられた。

近年、エネルギー依存性に CDDP と GSH との抱合体を細胞外へ排泄するポンプ (GSX ポンプ) の存在が報告された^{36)~37)}。細胞質内の解毒機構としては、GSH、GST、および MT の関与が報告されている。Fujiwara ら⁸⁾は、CDDP 耐性非小細胞肺癌株 PC-9/CDDP では親株 PC-9 に比べて GSH が約 5 倍に増加していることを報告した。笠原¹⁴⁾は CDDP 耐性小細胞肺癌株 N231/CDDP を樹立し、GST の阻害剤であるエタクリン酸で処理することによって CDDP 感受性が改善することを報告した。また、Kasahara ら¹³⁾は小細胞肺癌株 H69 から CDDP 耐性株 H69/CDDP₂ と H69/CDDP を樹立し、これらの細胞株では MT 量と CDDP 感受性が逆相関することを報告した。つまり、細胞内において GSH、GST、あるいは MT の作用が亢進することにより、CDDP 耐性が誘導されると考えられる。しかし、細胞質内解毒機構と薬剤蓄積機構、特に排泄機構との関連性については、CDDP 耐性機構における重要性の有無も含め今後充分検討されるべきであろう。

今回の成績から、CDDP の細胞内取り込み機構には非小細胞肺癌では細胞膜 Na^+ 、 K^+ -ATPase が重要な役割を果たしていることが確認されたが、その酵素活性の規定因子に関する検討は皆無である。 Na^+ 、 K^+ -ATPase は神経や筋において細胞内外の

生理的イオンバランスの形成を司る重要な酵素である¹⁹⁾が、実験的に作成された糖尿病動物モデルの神経や筋においてその酵素活性が低下することが報告されている^{20)~22)}。こうした実験では Na^+ , K^+ -ATPase 活性の低下のみならず、アラキドン酸代謝系の変化も指摘されている。すなわち、ストレプトゾトシンによって惹起された実験的糖尿病動物モデルにおいて、心筋²⁰⁾、末梢神経²¹⁾、そして骨格筋²²⁾の Na^+ , K^+ -ATPase 活性が低下し、さらにトロンボキサン A_2 とプロスタグランジン I_2 の産生比が変化する^{23)~26)}ことが報告されている。また、ラットの摘出子宮組織においてトロンボキサン A_2 の産生が増加すると Na^+ , K^+ -ATPase 活性が低下することも報告されている²⁷⁾。これらの知見から、プロスタグランジンと Na^+ , K^+ -ATPase 活性との関連性が示唆され、とくにトロンボキサン A_2 の関与が注目された。

トロンボキサン A_2 はアラキドン代謝産物の一つで様々な疾患の病態に関与するメディエーターである。Fujimura ら^{30)~41)}は気管支喘息患者において、その基本病態である気道過敏性がトロンボキサン A_2 合成酵素阻害薬あるいはトロンボキサン受容体拮抗薬によって有意に改善するが、その他の慢性呼吸器疾患ではその改善が認められないことから、トロンボキサン A_2 が気管支喘息の病態に特異的に関与すると結論した。さらに、気管支喘息患者では β 遮断薬の投与により喘息発作が誘発されるが、モルモットの実験的 β 遮断薬誘発気道収縮においてもトロンボキサン A_2 が関与することが報告されている⁴²⁾。また、トロンボキサン A_2 は血小板で産生され、強力な血小板凝集作用と血管収縮作用があるため止血作用およびこれに関連する作用である血栓形成促進作用を有することが知られている⁴³⁾。一方、プロスタグランジン I_2 には血小板凝集抑制作用と血管拡張作用があり⁴⁴⁾、トロンボキサン A_2 とプロスタグランジン I_2 の産生比の変化が糖尿病などにおける動脈硬化や血栓症の原因や増悪因子と考えられている^{45)~48)}。トロンボキサン受容体がCDDPの作用機序に深く関与するという今回の成績を考慮すると、トロンボキサン A_2 がその病態に関与する疾患が合併症として存在する場合、CDDPを含む化学療法に効果に影響を及ぼす可能性があり、今後化学療法の奏効率や化学療法を施行した患者における予後因子を検討する際にはこうした合併症の有無や重症度を合わせて評価することも重要であろう。

今回の検討では、トロンボキサン受容体拮抗薬添加の影響を検証することにより、CDDP感受性、CDDPの細胞内蓄積、さらに細胞膜 Na^+ , K^+ -ATPase 活性の規定因子としてのトロンボキサン受容体の役割を検討した結果、非小細胞肺癌株におけるその関与が示唆された。しかし、小細胞肺癌株における感受性その他の規定因子たり得ず、さらなる検討が望まれる。

結 論

ヒト肺癌培養細胞株を用いてCDDP耐性機構におけるトロンボキサン受容体の役割を検討し、以下の結論を得た。

1. 非小細胞肺癌由来のEBC-1株、PC-3株、RERF-LC-MS株では2種の異なる構造を有するトロンボキサン受容体拮抗薬S-1452およびBAYu3405処理によりCDDP感受性が増強された。
2. S-1452処理によりRERF-LC-MS株ではCDDPの細胞内取り込み量が増加したが、排泄には影響しなかった。
3. S-1452処理により非小細胞肺癌株の細胞膜 Na^+ ,

K^+ -ATPase 活性が増強された。

4. 小細胞肺癌由来のSBC-1株とSBC-3株ではS-1452による感受性増強作用は明らかではなかった。
5. S-1452処理によりSBC-3株ではCDDPの細胞内蓄積量は変化しなかった。
6. S-1452処理によってもSBC-1株とSBC-3株では細胞膜 Na^+ , K^+ -ATPase 活性の有意な変化は認められなかった。
7. S-1452処理によりSBC-2株では細胞膜 Na^+ , K^+ -ATPase 活性が増強されたが、CDDP感受性の増強は明らかではなかった。

以上の結果から、非小細胞肺癌株ではトロンボキサン受容体が細胞膜 Na^+ , K^+ -ATPase 活性の規定因子としてCDDPの細胞内取り込み機構に重要な役割を果たしているが、小細胞肺癌株ではその関与は小さいと推定され、この差異が非小細胞肺癌と小細胞肺癌において自然耐性度が大きく異なる原因の一つと考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、ご指導ご校閲を賜りました恩師松田保教授に深く感謝の意を表します。また、直接ご指導いただいた金沢大学医学部内科学第三講座藤村政樹講師、同附属病院第三内科笠原寿郎助手に心より感謝いたします。さらにご協力いただいた金沢大学医学部第三内科教室員各位に重ねて御礼申し上げます。

なお、本研究の内容は、第86回国癌学会年次総会(トロント、1995年3月)、第35回日本胸部疾患学会総会(名古屋、1995年5月)、第54回日本癌学会総会(京都、1995年10月)において発表した。

文 献

- 1) Loehrer, P. J., & Einhorn, L. H.: Cisplatin. *Ann. Intern. Med.*, **100**, 704-713 (1984).
- 2) Devita, V. T., Hellman, S. & Rodenberg, S. A.: *Cancer. Principles & Practice of Oncology*, 4th ed., p673-758, J. B. Lippincott Co., Philadelphia, 1993.
- 3) Hospers, G. A. P., Meijer, C., DeLeij, L., Uges, D. R. A., Mulder, N. H. & DeVries, E. G. E.: A study of human small-cell lung cancer carcinoma (hSCLC) cell lines with different sensitivities to detect relevant mechanisms of cisplatin (CDDP) resistance. *Int. J. Cancer*, **46**, 138-144 (1990).
- 4) Andrews, P. A. & Howell S. B.: Cellular pharmacology of cisplatin: perspectives on mechanisms of acquired resistance. *Cancer Cells*, **2**, 35-43 (1990).
- 5) DeGraeff, A., Slebos R. J. C. & Rodenhuis, S.: Resistance to cisplatin and analogues: mechanisms and potential clinical implications. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **22**, 325-332 (1988).
- 6) Hospers, G. A. P., Mulder, N. H. & DeVries, E. G. E.: Mechanisms of cellular resistance to cisplatin. *Med. Oncol. Tumor Pharmacother.*, **5**, 145-151 (1988).
- 7) Kelley, S. L. & Rosencweig, M.: Resistance to platinum compounds: mechanisms and beyond. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, **25**, 1135-1140 (1989).
- 8) Fujiwara, Y., Sugimoto, Y., Kasahara, K., Bungo, M., Yamakido, M., Tew, K. D. & 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, K. D., Bomber, A. M. & Hoffman, S., J.:** Ethacrynic acid and piroprost as enhancers of cytotoxicity in drug resistant and sensitive cell lines. *Cancer Res.*, 48, 3622-3625 (1988).
- 10) **Nakagawa, K., Saijo, N., Tsuchida, S., Sakai, M., Tsunokawa, 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).
- 11) **Basu, A. & Lazo, J. S.:** A hypothesis regarding the prospective role of metallothioneins against the toxicity of DNA interactive anticancer drugs. *Toxicol. Lett.*, 50, 123-135 (1990).
- 12) **Andrews, P. A., Murphy, M. P. & Howell, S. B.:** Metallothionein-mediated cisplatin resistance in human ovarian carcinoma cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 19, 149-154 (1987).
- 13) **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).
- 14) 笠原寿郎: 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. 十全医会誌, 100, 858-867 (1991).
- 15) **Eastman, A. & Schulte, N.:** Enhanced DNA repair as a mechanism of resistance to cis-diamminedichloroplatinum (II). *Biochemistry*, 27, 4730-4734 (1988).
- 16) **Gately, D. P. & Howell, S. B.:** Cellular accumulation of the anticancer agent cisplatin: a review. *Br. J. Cancer*, 67, 1171-1176 (1993).
- 17) **Timmer-Bosscha, H., Mulder, N. H. & DeVries, E. G. E.:** Modulation of cis-diamminedichloroplatinum (II) resistance: a review. *Br. J. Cancer*, 66, 227-238 (1992).
- 18) **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).
- 19) **Horisberger, J.-D., Lemas, V., Kraehenbühl, J.-P. & Rossier, B. C.:** Structure-function relationship of Na, K-ATPase. *Annu. Rev. Physiol.*, 53, 565-584 (1991).
- 20) **Pierce, G. N. & Dhalla, N. S.:** Sarcolemmal Na⁺-K⁺-ATPase activity in diabetic rat heart. *Am. J. Physiol.*, 254, C241-247 (1983).
- 21) **Das, P. K., Bray, G. M., Aguayo, A. J. & Raminsky M.:** Diminished ouabain-sensitive sodium-potassium ATPase activity in sciatic nerves of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Exp. Neurol.*, 53, 285-288 (1976).
- 22) **Kjeldsen, K., Braendgaard, H., Sidenius, P., Larsen, J. S. & Norgaard, A.:** Diabetes decreases Na⁺-K⁺-pump concentration in skeletal muscles, heart ventricular muscle, and peripheral nerves of rat. *Diabetes*, 36, 842-848 (1987).
- 23) **Ziboh, V. A., Maruta, H., Lord, J., Cagle, W. D. & Lucky, W.:** Increased biosynthesis of thromboxane A₂ by diabetic platelets. *Eur. J. Clin. Invest.*, 9, 223-228 (1979).
- 24) **Steirn-Borda, L., Franchi, A. M., Borda, E. S., Del-Castillo, E., Gimeno, M. F. & Gimeno, A. L.:** Augmented thromboxane generation by mesenteric arteries from pancreatectomized diabetic dogs is coincident with the vascular tone enhancement evoked by Na arachidonate and prostacyclin. *Eur. J. Pharmacol.*, 103, 211-221 (1984).
- 25) **Jeremy, J. Y., Thompson C. S., Mikhailidis, D. P. & Dandona, P.:** Duration, and not severity, of diabetes mellitus determines effects on prostacyclin synthesis in the rat aorta, penis and bladder. *Prog. Lipid Res.*, 25, 507-509 (1986).
- 26) **Axelrod, L. & Levine, L.:** Plasma prostaglandin levels in rats with diabetes mellitus and diabetic ketoacidosis. *Diabetes*, 31, 994-1001 (1982).
- 27) **Franchi, A. M., Motta, A., Gimeno, A. L. & Gimeno, M. A. F.:** Relationship between factors influencing Na⁺-K⁺-ATPase activity and eicosanoid production from ¹⁴C-arachidonic acid in spayed rat uterus. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, 48, 273-275 (1993).
- 28) **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).
- 29) **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 lines. *Int. J. Oncol.*, 7, 789-793 (1995).
- 30) **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.*, in press
- 31) **Lozengurt, E. & Heppel, L. A.:** Serum rapidly stimulates ouabain-sensitive ⁸⁶Rb⁺ influx in quiescent 3T3 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 72, 4492-4495 (1975).
- 32) **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).
- 33) **Andrews, P. A., Mann, S. C., Huynh, H. H. & Albright K. D.:** Role of Na⁺, K⁺-adenosine triphosphatase in the accumulation of cis-diamminedichloroplatinum (II) in human ovarian carcinoma cells. *Cancer Res.*, 51, 3677-3681 (1991).
- 34) **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).

35) Ishikawa, T. & Ali-Osman, F.: Glutathione-associated cis-diamminedichloroplatinum (II) metabolism and ATP-dependent efflux from leukemia cells. *J. Biol. Chem.*, **268**, 20116-20125 (1993).

36) Fujii, R., Mutoh, M., Niwa, K., Yamada, K., Aikou, T., Nakagawa, M., Kuwano, M. & Akiyama, S.: Active efflux system for cisplatin in cisplatin-resistant human KB cells. *Jpn. J. Cancer Res.*, **85**, 426-433 (1994).

37) Fujii, R., Mutoh, M., Sumizawa, T., Chen, Z., Yoshimura, A. & Akiyama, S.: Adenosine triphosphate-dependent transport of leukotriene C₄ by membrane vesicles prepared from cisplatin-resistant human epidermoid carcinoma tumor cells. *J. Natl. Cancer Inst.*, **86**, 1781-1784 (1994).

38) Fujimura, M., Sasaki, F., Nakatsumi, Y., Takahashi, Y., Hifumi, S., Taga, K., Mifune, J., Tanaka, T. & Matsuda, T.: Effects of a thromboxane synthetase inhibitor (OKY-046) and a lipoxygenase inhibitor (AA-861) on bronchial responsiveness to acetylcholine in asthmatic subjects. *Thorax*, **41**, 955-959 (1986).

39) Fujimura, M., Nishioka, S., Kumabashiri, I., Matsuda, T. & Mifune, J.: Effects of aerosol administration of a thromboxane synthetase inhibitor (OKY-046) on bronchial responsiveness to acetylcholine in asthmatic subjects. *Chest*, **98**, 276-279 (1990).

40) Fujimura, M., Sakamoto, S. & Matsuda T.: Attenuating effect of a thromboxane synthetase inhibitor (OKY-046) on bronchial responsiveness to methacholine is specific to bronchial asthma. *Chest*, **98**, 656-660 (1990).

41) Fujimura, M., Sakamoto, S., Saito, M., Miyake, Y. & Matsuda, T.: Effect of a thromboxane A₂ receptor antagonist (AA-2414) on bronchial hyperresponsiveness to methacholine in subjects with asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **87**, 23-27 (1991).

42) Songür, N., Fujimura, M., Mizuhashi, K., Saito, M., Xiu, Q. & Matsuda, T.: Involvement of thromboxane A₂ in propranolol-induced bronchoconstriction after allergic bronchoconstriction in guinea pigs. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **149**, 1488-1493 (1994).

43) Gerrard, J. M.: Prostaglandins and Leukotrienes. *Blood and Vascular Cell Function*, 1st ed., p77-278, Marcel Dekker, New York, 1985.

44) Watanebe, J., Wohltmann H. J., Klein, R. L., Colwell, J. A. & Lopes-Virella, M. F.: Enhancement of platelet aggregation by low-density lipoproteins from IDDM patients. *Diabetes*, **37**, 1652-1657 (1988).

45) Fleisher, L. N., Tall, A. R., Witte, L. D., Miller, R. W. & Cannon, P. J.: Stimulation of arterial endothelial cell prostacyclin synthesis by high density lipoproteins. *J. Biol. Chem.*, **257**, 6653-6655 (1982).

46) Aviram, M. & Brook, J. G.: Platelet interaction with high and low density lipoproteins. *Atherosclerosis*, **46**, 259-268 (1983).

47) Beitz, J., Block, H.-U., Beitz, A., Müller, G., Winkler, L., Dargel, R. & Mest, H.-J.: Endogenous lipoproteins modify the thromboxane formation capacity of platelets. *Atherosclerosis*, **60**, 95-99 (1986).

48) Udvardy, M., Török, I. & Rak, K.: Plasma thromboxane and prostacyclin metabolite ratio in atherosclerosis and diabetes mellitus. *Thromb. Res.*, **47**, 479-484 (1987).

Role of the Thromboxane Receptor as a Determinant for Resistance to Cisplatin in Human Lung Cancer Cell Lines Takuma Bando, Department of Internal Medicine (III), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med Soc., 104, 750—757 (1995)

Key words lung cancer, cis-diamminedichloroplatinum (II), drug resistance, Na⁺, K⁺-Adenosine triphosphatase, thromboxane receptor

Abstract

Drug resistance may be one of the most important barriers leading to lung cancer chemotherapy failure. Thus it is essential to determine the mechanisms of resistance to anticancer agents. Cisplatin (cis-diamminedichloroplatinum (II), CDDP) is a key anticancer agent for cancer. It has been reported that the intracellular accumulation of CDDP is one of the important steps in determining resistance to CDDP, which may be modulated by Na⁺, K⁺-ATPase activity. In this study, the significance of membrane Na⁺, K⁺-ATPase activity and the role of the thromboxane receptor in the intracellular accumulation of CDDP was examined using human lung cancer cell lines. In non-small cell lung cancer cell lines, EBC-1, PC-3, and RERF-LC-MS cell lines, the sensitivities to CDDP were improved by treatment with two different selective thromboxane receptor antagonists, calcium 5(z)-[1R,2S,3S,4S-7-[3-phenylsulfonylamino]bicyclo [2.2.1] hept-2-yl]-5-heptenoate hydrate (S-1452), and (3R)-3-(4-fluorophenylsulfonamido)-1,2,3,4-tetrahydro-9-carbazolepropanoic acid (BAYu3405). Na⁺, K⁺-ATPase was activated and the intracellular accumulation of CDDP increased with the treatment in each non-small cell lung cancer cell line. In the small cell lung cancer cell lines, SBC-1 and SBC-3 cell lines, the sensitivity to CDDP or the Na⁺, K⁺-ATPase activity was not changed significantly, and in the SBC-3 cell line the intracellular accumulation of CDDP was not modulated by the treatment. In small cell lung cancer cell line, SBC-2 cell line, although the Na⁺, K⁺-ATPase was activated by the treatment, the sensitivity to CDDP was not improved. These results suggest the important role of the thromboxane receptor as a determinant of the sensitivity to CDDP in non-small cell lung cancer cell lines in activating the Na⁺, K⁺-ATPase and modulating the intracellular accumulation of CDDP. But the Na⁺, K⁺-ATPase activity and the role of thromboxane receptor may not be so significant in the resistance mechanisms to CDDP in small cell lung cancer cell lines. The discrepancy between the non-small and small cell lung cancer cell lines may be one of the reasons for the variations in the antitumor effect of CDDP in clinical trials of chemotherapy for lung cancer.