癌細胞におけるシスプラチン耐性機構と感受性復帰法

増 田 英 隆

九州歯科大学外科学講座 (主任: 増田英隆教授)

Cisplatin Resistance and Its Circumvention in a Human Cancer Cell Line

Hidetaka Masuda

Department of Surgery (Chief: Prof. Hidetaka Masuda)
Kyushu Dental College, Kitakyushu, Japan

シスプラチン (DDP) は DNA に結合して細胞毒性を発現し、多種のヒト固形癌に効果を示す数少ない優れた抗癌剤の一つで、今日の抗癌化学療法に広く用いられているが、本剤の継続投与により獲得耐性を導く事が大きな隘路となっている。この為、DDP 耐性機構の解明、耐性克服法の研究が世界的に活発となってきた。既に知られている DDP 耐性機構として、薬剤の細胞内流入の低下、細胞内グルタチオン (GSH) やメタロチオネインの増加による DDP 不活性化の亢進、GSH の薬物解毒作用に必要な酵素 GST π の活性増加などがあるが、筆者らは新たに DNA 修復活性に着目した¹⁻⁶⁾。

DNA 除去修復機構

DNA 除去修復機構について簡単に述べる。化学物質等で DNA に傷が入ると endonuclease と exonuclease が働き DNA 上の傷を取り除く。次に DNA polymerase α 及び β が DNA の欠損部位に正しい DNA 塩基を埋め、最後に ligase で結合させ DNA の修復が完了する。この修復機構は、半保存的 DNA 合成に対し、外部からの臨時的障害を修復する為に行なわれる DNA 合成の意味で、修復合成もしくは不定期 DNA 合成と呼ばれる。本研究では、この一連の修復過程の強さに着眼した。

研究に用いた培養癌細胞の性質

未治療の卵巢癌患者から採取し培養化した、DDP 感受性の卵巢癌細胞・A2780 とこの細胞を DDP 存在下で培養し、DDP 耐性となった 2780^{CP} 細胞を用いた¹⁾。in vitro で両細胞の DDP 感受性を比較した所、50% 殺細胞濃度 (IC₅₀) で 2780^{CP} は A2780 に比べ約 4 倍 DDP に耐性であった³⁾。次に両腫瘍細胞をヌードマウスに移植

して DDP の腫瘍内注入による腫瘍増殖抑制効果を比較した。DDP 4 μ g/g 体重を週一回、計四回腫瘍内注入した後の、感受性対耐性腫瘍の重量比は 1 対 10 であった。この様に、in vivo でも 2780^{CP} は A2780 に比べ DDP 耐性であった。

DNA 除去修復活性の測定

DDP の細胞内標的である DNA に結合するプラチナ (Pt) の量を両細胞で比較した所、A2780、2780^{CP} とほぼ等量結合した³⁾。従って 2780^{CP} の耐性機構として、DNA 障害を修復する能力の変化が疑われた。よって以下に示す三通りの方法で両細胞の DNA 除去修復活性を比較した。

I. 不定期 DNA 合成 (UDS)

細胞をアルギニン欠損培地で静止状態とし Hydroxy-urea 10 mM を加えると半保存的 DNA 合成は 99% 程度抑制された。更に、^[3H]dThd 5 μ Ci/ml 及び各種濃度の DDP を加え 3 時間培養した。この間 DNA に摂取された ^[3H]dThd の活性は UDS と約 1% の半保存的 DNA 合成 (DDP 非処理の background として定量) の合計を表わす。結果はこの合計値を background 値で割った値で示した。図 1 の様に A2780 ではいかなる DDP 濃度でも UDS は認められなかったが、2780^{CP} では濃度に応じて活発であった¹⁾。

II. アルカリ性 CsCl 密度勾配平衡法

静止状態の細胞に dThd の構造類似体である BudR、^[3H]dThd 及び DDP を加える。半保存的 DNA 合成には BudR を大量に取り込むが、修復合成にはごく微量しか取り込まない。dThd との僅かな分子量の相違により、BudR を多く取り込んだ DNA は超遠心すると遠

心管の底に沈む。一方、修復合成で取り込まれた BudR はごく少量の為、DNA 全体の重さに殆ど影響を与えず、修復合成に関与した DNA は遠心管の中程で停止し、この部分の $[^3\text{H}]\text{dThd}$ 活性が DNA 修復活性を表わす。本法で、修復活性は A2780 では DDP の各濃度とも低く、2780^{CP} では濃度と共に著明に増加した²⁾。

Ⅲ. DNA からの Pt 除去率

2780^{CP} の方が A2780 より修復活性が高ければ、DNA に結合した Pt は 2780^{CP} の方で時間的により早く除去されよう。そこで両種の細胞を静止状態にして DDP で 2 時間処理し、直後から経時的に DNA に含まれる Pt 量を測定した。図 2 の様に、12 時間後と 24 時間後の Pt 除去率は A2780 ではそれぞれ 0 及び 16%，2780^{CP} では 30 及び 40% であった³⁾。

以上 3 通りの方法で DDP 耐性細胞は感受性細胞に比べ、DNA 修復活性が高いという結果が得られた。

図1 シスプラチンによる不定期 DNA 合成誘導

図2 DNA に結合したプラチナ除去能力とアフィディコリンの効果

DDP 耐性細胞の感受性復帰法

I. 修復阻害

2780^{CP} の亢進した除去修復活性を抑制する為に、DNA polymerase α を特異的に阻害する aphidicolin (AP) 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を用いて本細胞の修復活性の変化を調べた^{2,3)}。CsCl 密度勾配平衡法で、修復活性のレベルは約半分に低下した。DNA に結合した Pt 量で見ても AP を加えると除去率が低下した (図 2)。又、DDP の毒性に与える AP の効果を細胞生存率で見ると、AP を加える事で、2780^{CP} の DDP 感受性は約 2 倍に増強した。

図3 細胞生存率と DNA 結合プラチナ量の関係

図4 DNA へのプラチナ結合に与えるアンホテリシン B の効果

図5 低濃度アンホテリシン B のシスプラチンに与える効果

表1 シスプラチンと他剤併用の効果 (DDP : IC₅₀)

細胞	DDP	DDP+AMB	DDP+AP	DDP+AMB+AP
2780 ^{CP}	17.0 (15.0-19.8)	10.0 (9.4-10.8)	7.7 (6.7- 8.6)	4.8 (4.0- 5.5)
A2780	4.4 (4.0- 4.8)	4.1 (3.7- 4.5)	4.2 (3.8- 4.6)	4.0 (3.6- 4.3)

DDP : シスプラチン AMB : アンホテリシン B AP : アフィディコリン () : 95%信頼区間

II. 加温法

温熱化学療法は耐性を克服出来るか否かを試みた⁴⁾。42℃の加温により、2780^{CP}に与えるDDPの細胞毒性はIC₅₀で約1.5倍強くなった。この機構を知る為に、DDPのDNA結合に与える温熱の影響を調べた。耐性、感受性両細胞とも42℃でのDDP-DNA結合量は37℃の場合の約1.5倍に増加した。そこで、DDP-DNA結合量と細胞毒性の関係を調べた所、耐性、感受性両細胞種ともこれらの二者は強い相関を示した(図3)。従って、DNAに可及的多量のDDPを結合させる工夫が重要となった。

III. 細胞膜活性剤AMBの使用

抗カビ剤、アンホテリシンB(AMB)は他の薬剤の細胞膜透過性増強作用をも併せ持つので、このAMBがDDP-DNA結合に与える影響を見た(図4)⁵⁾。A2780では本剤の併用により著しい結合量の増加が見られたが、2780^{CP}では1.2倍~1.8倍程度であった。これは生体では副作用のみ強くなり肝心の耐性腫瘍には期待した程の効果が得られない事を示唆する。しかし、AMB 2μg/mlでは2780^{CP}での結合量が僅かではあるがA2780でのそれより高く、又、A2780では、AMBが0μg/mlより結合量が低下した。この事が有意か否かを確かめる為にAMB 2μg/ml前後の濃度における細胞生存率を詳しく調べた。図5の様に、A2780では確かにAMB 0.5~2.2μg/mlの範囲で細胞生存率がAMB 0μg/mlの時に比べ10%程度上がっており、2780^{CP}ではAMB 1.2μg/ml以上で生存率が低下した。従って、濃度次第では臨床的にAMBを抗癌剤の増強剤として用いる事が出来ると考えられた。

IV. 修復阻害剤と膜活性剤の併用

APとAMBを同時にDDPに併用し細胞毒性の変化を調べた⁶⁾。表1でIC₅₀を耐性細胞で見ると、DDPだけの場合17μM、AMB 2μg/mlを併用すると10μM、AP 3μg/mlを併用した場合7.7μM、AMBとAPの両者を併用すると4.8μMと約4倍DDPの毒性が上がり

A2780細胞と同様のDDP感受性を示し、実験上、概ねこの種のDDP耐性を克服した事になる。一方、A2780では、どの併用でもIC₅₀は4μM程度で、DDPの毒性に変化はなかった。よって、生体において正常細胞がA2780細胞と同様のDDP感受性を持つとすれば、DDPをAMB、APの併用により副作用の増強無しに、DDP耐性腫瘍に選択的に奏効させる事が可能となろう。

文 献

- 1) Behrens, B. C., Hamilton, T. C., Masuda, H., Grotzinger, K. R., Whan-Peng, J. et al.: Characterization of a cis-Diamminedichloroplatinum(II)-resistant human ovarian cancer cell line and its use in evaluation of platinum analogues. *Cancer Res.* 47: 414-418, 1987.
- 2) Masuda, H., Ozols, R. F., Lai, G., Fojo, A., Rothenberg, M. and Hamilton, T. C.: Increased DNA repair as a mechanism of acquired resistance to cis-diammine-dichloroplatinum(II) in human ovarian cancer cell lines. *Cancer Res.* 48: 5713-5716, 1988.
- 3) Masuda, H., Tanaka, T., Matsuda, H. and Kusaba, I.: Increased removal of DNA-bound platinum in a human ovarian cancer cell line resistant to cis-diamminedichloroplatinum(II). *Cancer Res.* 50: 1863-1866, 1990.
- 4) Masuda, H., Tanaka, T., Kido, A., Kitamura, K. and Kusaba, I.: Hyperthermic enhancement of cytotoxicity and DNA-binding of cisplatin in sensitive and resistant human ovarian cancer cell lines. *Cancer J.* 4 (4): 283-288, 1991.
- 5) Masuda, H., Tanaka, T., Kido, A. and Kusaba, I.: Potentiation of cisplatin against sensitive and resistant human ovarian cancer cell lines by amphotericin B. *Cancer J.* 4 (2): 119-124, 1991.
- 6) Masuda, H., Tanaka, T., Matsushima, S. and Kusaba, I.: Selective potentiation of cisplatin in combination with amphotericin B and aphidicolin against a resistant human ovarian cancer cell line. *Cancer J.* 5 (2): 96-100, 1992.