

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：27102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21791829

研究課題名（和文）銅トランスポーターがシスプラチン耐性癌細胞の耐性機序に与える影響

研究課題名（英文）The effect of copper transporters on the resistance mechanisms of the cisplatin-resistant cancer cell

研究代表者

松本 忍（MATSUMOTO SHINOBU）

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：20514996

研究成果の概要（和文）：シスプラチンは、多くの固形癌の治療に広く用いられている最も有効な抗癌剤の一つである。しかし、その獲得耐性は臨床上的の使用を大きく制限することになる。近年、銅トランスポーターである ATP7A および ATP7B が CDDP の細胞外への排出に、CTR1 が CDDP の細胞内取り込みに関与することが示唆されている。本研究では、銅の投与がシスプラチンの細胞内蓄積量に何らかの影響を与えるのか、また銅トランスポーターの発現様式と獲得耐性との間に関連が認められるのか、検討を行った。結果、高濃度の銅は CDDP の細胞内蓄積量を有意に増加させるが、CTR1 発現量の増加は、CDDP 感受性・耐性細胞ともに認められなかった。ヒト類表皮癌細胞株における CDDP 耐性機構には、ATP7A の顕著な減少が関連していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Cisplatin (CDDP) is one of the most effective anticancer drug and has been widely used to treat a variety of solid tumors. However, acquired resistance to CDDP limits its clinical use. Recently, it has been suggested that CDDP uptake might be mediated by the copper efflux transporters ATP7A and ATP7B, and the copper influx transporter CTR1. An investigation was carried out as whether copper affected the intracellular accumulation of CDDP and whether changes in the expression of ATP7A and CTR1 were related to acquired resistance. As a result, a high concentration of copper was associated with increases in cellular accumulation of DNA, but did not increase CTR1 expression in CDDP-sensitive or -resistant cells. The acquisition of CDDP resistance in human epidermoid cancer cells was accompanied by a greatly reduced level of ATP7A.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2009 年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 2010 年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 2011 年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 2,900,000 | 870,000 | 3,770,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：シスプラチン、抗癌剤耐性、銅トランスポーター

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

CDDP は多くの固形癌の治療に有効な抗癌剤であるが、耐性の獲得が治療上の効果を著減させていることは広く知られている。この CDDP 耐性は様々な因子によってもたらされているが、癌細胞種による相違も見られるため、耐性を克服するためには、まずその細胞種における耐性機構を明らかにすることが重要である。我々はこの検討のために、当科所有のヒト類表皮癌細胞株 KB から step-wise 法により CDDP 耐性細胞株 KBR/1.2 を樹立した。

KB および KBR/1.2 に対し、CDDP の主要な耐性機構と考えられている (1)細胞内での解毒機構の亢進、(2)細胞内の CDDP 蓄積量の減少、(3)DNA 修復能の亢進の 3 点に着目して検討を行ったところ、細胞内解毒作用を持つ GSH の発現に有意差はなく、DNA 修復能に関しても差異は認められなかった。よって KBR における CDDP 獲得耐性のメカニズムは CDDP の細胞内取り込み量の低下および DNA に結合する CDDP 量の低下によるものであることが明らかになった。

近年銅のトランスポーターの CDDP 流出入への関与が注目され始めているがまだ報告は少なく、その詳細は明らかではない。現在銅トランスポーター CTR1 が CDDP の細胞内取り込みに (Ishida S. et al. 2002 他)、ATP7A が CDDP の排出に関与している (Samimi G. et al. 2003) という報告が見られる。しかし、ATP7A を高発現させた細胞株では、CDDP の細胞内蓄積量が逆に増加したという報告もある。

今回樹立した KBR および親株の KB においても銅のトランスポーターの関与は十分に考えられるものである。in vitro において CDDP 耐性を克服することが出来れば、他の細胞種においても、また in vivo においても十分応用可能となると思われる。本研究では、濃度および処理時間、投与方法を変えて銅を投与した場合、CDDP の細胞内蓄積量にどのように影響を与えるのか検討する。また、銅によって細胞内へ流入する CDDP を変化させたときに見られる CTR1 や ATP7A 出現量の変化およびその役割についても検討する。

2. 研究の目的

CDDP 耐性細胞に対して CDDP 処理を行った場合、細胞内流入量が CDDP 感受性細胞と比較して低下しているという報告がしばしばみられる。しかしながら、CDDP の細胞内への流出入機構に関しては未だ明確に解明されてはいない。よって CDDP 耐性を克服し

てその有効性を増大させ、CDDP による副作用の軽減法を確立するためには、まず CDDP 耐性細胞だけでなく感受性細胞においても CDDP 細胞内流入の機構を解明する必要があると考える。

近年、CDDP 流出入に銅トランスポーターが関与する可能性が示唆されており、我々も検討を重ねてきた。また、定常状態における銅レベルは CDDP 耐性ヒト類表皮癌細胞株 (KBR/1.2) で有意に減少していたため (Matsumoto S. et al. 2007)、細胞内の銅レベルが CDDP 耐性に何らかの影響を与えていると考えた。

今回、銅の投与が CDDP の獲得耐性にいかに影響を与えるかについて更なる検討を行い、耐性の克服を目指すこととする。

3. 研究の方法

(1) 培養、薬剤処理

KB および KBR/1.2 を用いて、 3×10^6 個の細胞を 145 cm² dish に播種し、72 時間培養後、2.5% 透析牛胎児血清を添加した arginine deficient MEM に置換して、新たな DNA 増殖を止めた状態で薬剤処理を行う。薬剤濃度および処理時間は結果に応じて適宜変動させていくこととする。

(2) CDDP の細胞内取り込み量の測定

薬剤処理後の細胞を回収して細胞数を算定する。この後 PBS 洗浄を行い、硝酸と過塩素酸を添加して湿式灰化を行う。灰化物を定量後に含有白金量をフレームレス原子吸光分光光度計にて測定をする。2 dish 分の細胞を 1 試料とし、3 試料の測定、比較を行って結果を検討することとする。

(3) DNA に結合した CDDP 量の測定

薬剤処理後の細胞を回収し、タンパク質および脂質の溶解を行う。フェノール処理によりこれらを除去した後、エタノール沈殿により核酸を抽出精製する。RNA 除去、クロロホルム抽出、再度のエタノール沈殿を行い DNA を抽出する (Fichtinger-Schepman AMJ. et al. 1987)。得られた DNA を Tris/EDTA buffer に溶解した後、原子吸光分光光度計によって白金の定量を行う。

(4) 銅トランスポーターの発現に関する検討
上記と同様の細胞培養、薬剤処理を行った後に細胞を回収し、通法に従って SDS-PAGE 電気泳動法で蛋白を分離、抗 CTR1 抗体および抗 ATP7A 抗体を用いて Western blotting 法にてこれらの蛋白発現を検出する。また、

mRNA の発現を RT-PCR 法により検索する。

(5) 薬剤感受性の検討

以上の実験から得られた結果と薬剤感受性に相関が見られるか検討する。

4. 研究成果

500 μ M 以上の CuSO₄ で処理することにより、KB および KBR/1.2 における Pt-cell 量は CDDP および CuSO₄ の濃度に依存して増加した。750 μ M の CuSO₄ で処理すると、40 μ M CDDP 単独で処理した場合に比べて、Pt-cell 量は KB、KBR/1.2 においてそれぞれ 1.9、4.0 倍に増加した。また、Pt-DNA 量は KB で 1.8 倍、KBR/1.2 で 3.2 倍に増加した。ただし、KBR/1.2 の Pt-cell 量は、KB に比べて有意に減少していた。両細胞株とも Pt-cell 量は CDDP の処理時間にも依存して増加した。

ATP7A の量は KB に比べて KBR/1.2 で大いに減少していたが、CTR1 の量はやや減少が認められた程度だった。CDDP 処理により、ATP7A の発現量は KB においては著しく増加したが、KBR/1.2 においては変化がなかった。また、CDDP と同時に CuSO₄ を処理した場合も同様な結果であった。CTR1 の発現に関しては、両細胞とも薬剤処理による誘導は認められなかった。これらの結果より、高濃度の銅は CDDP の細胞内蓄積量ならびに DNA 結合量を有意に増加させるが、CTR1 とは関係がないこと、また CDDP の細胞内蓄積には ATP7A が関与し、細胞内蓄積量の減少に起因する CDDP 耐性機構には、ATP7A の顕著な減少が関連していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

① Matsumoto-Takeda S, Yamamoto N, Nishida I, Saeki K, Oda M, Yamauchi K, Miyamoto I, Tanaka T, Kito S, Wakasugi-Sato N, Seta Y, Shiiba S, Matsumoto Y, Yamashita Y, Maki K, Takahashi T, Morimoto Y: Importance of magnetic resonance imaging for evaluation of a child with prominent swelling of the facial region after trauma: report of a case. Dent Traumatol, 査読有, 27; 2011: 300-4.

DOI: 10.1111/j.1600-9657.2011.00985.x

② Tanaka T, Oda M, Kito S, Wakasugi-Sato N, Matsumoto-Takeda S, Otsuka K, Yoshioka I, Habu M, Kokuryo S, Kodama M, Nogami S, Miyamoto I, Yamamoto N, Ishikawa A, Matsuo

K, Shiiba S, Seta Y, Yamashita Y, Takahashi T, Tominaga K, Morimoto Y: Noninvasive identification of peripheral vessels of oral and maxillofacial regions using electrocardiography-triggered three-dimensional fast asymmetric spin-echo sequences. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 査読有, 112(4); 2011: 493-501.

DOI: 10.1016/j.tripleo.2011.02.047

③ Yamamoto N, Yamashita Y, Tanaka T, Ishikawa A, Kito S, Wakasugi-Sato N, Matsumoto-Takeda S, Oda M, Miyamoto I, Yamauchi K, Shiiba S, Seta Y, Matsuo K, Koga H, Takahashi T, Morimoto Y: Diagnostic significance of characteristic findings on ultrasonography for the stitch abscess after surgery in patients with oral squamous cell carcinoma. Oral Oncol, 査読有, 47; 2011: 163-9.

DOI: 10.1016/j.oraloncology.2010.10.015

④ Wakasugi-Sato N, Wakasugi T, Oda M, Yamashita Y, Yoshioka I, Yamamoto N, Habu M, Kodama M, Kokuryo S, Ichimiya H, Miyamoto I, Tanaka T, Kito S, Matsumoto-Takeda S, Ishikawa A, Seta Y, Matsuo K, Takahashi T, Tominaga K, Morimoto Y: Clinical significance of ultrasonographic examination including detection of thyroid gland diseases when surveying cervical lymph nodes in subjects with oral squamous cell carcinoma. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 査読有, 109; 2010: e78-85.

DOI: 10.1016/j.tripleo.2010.01.011

⑤ Tanaka T, Sakamoto E, Shiiba S, Oda M, Kito S, Wakasugi-Sato N, Matsumoto-Takeda S, Imamura Y, Nakanishi O, Morimoto Y: Relationship between the curative effects of carbamazepine administration and the neurovascular compression volume of the trigeminal nerve measured using magnetic resonance cisternography. Clin J Pain, 査読有, 25(9); 2009: 752-9.

DOI: 10.1097/AJP.0b013e3181ada29c

[学会発表] (計 7 件)

① Matsumoto-Takeda S, Oda M, Otsuka K, Wakasugi-Sato N, Kito S, Tanaka T, Soga T, Arizumi T, Morimoto Y: A case report of a child with prominent swelling in mental regions after trauma. The 18th International Congress of

Dentomaxillofacial Radiology, May 26-30, 2011, Hiroshima, Japan.

②Morimoto Y, Wakasugi-Sato N, Shiki K, Oda M, Tanaka T, Kito S, Matsumoto-Takeda S, Otsuka K, Watanabe T, Ideguchi T, Momozono A: Usefulness of examination of thyroid glands by ultrasonography for patients with oral squamous cell carcinoma. The 18th International Congress of Dentomaxillofacial Radiology, May 26-30, 2011, Hiroshima, Japan.

③ Kito S, Tanaka T, Wakasugi-Sato N, Matsumoto-Takeda S, Otsuka K, Oda M, Uchida A, Hiromatsu T, Goya T, Kozono T, Morimoto Y: A rare case of septic arthritis of the TMJ without malocclusion. The 18th International Congress of Dentomaxillofacial Radiology, May 26-30, 2011, Hiroshima, Japan.

④ Tanaka T, Yamamoto N, Kito S, Matsumoto-Takeda S, Wakasugi-Sato N, Otsuka K, Oda M, Imamura Y, Haraoka T, Ono I, Nishio Y, Miyamoto I, Yamashita Y, Takahashi T, Morimoto Y: Utility of ultrasonography for diagnosis of abscess after surgery of oral cancer. The 18th International Congress of Dentomaxillofacial Radiology, May 26-30, 2011, Hiroshima, Japan.

⑤時津高俊、小田昌史、松本(武田) 忍、若杉(佐藤)奈緒、鬼頭慎司、田中達朗、滝野正義、濱井祐昭、深井康弘、内田朱美、廣松辰巳、森本泰宏：小児のオトガイ部外傷評価におけるMRIの有効性。日本歯科放射線学会第49回九州・第53回関西合同地方会、12月11日、2010、北九州。

⑥松本 忍、田中達朗、若杉奈緒、小田昌史、鬼頭慎司、森本泰宏：ソフト開発による歯科疾患の客観的評価への提案。歯工学連携キックオフシンポジウム、1月16日、2009、北九州。

⑦鬼頭慎司、若杉奈緒、松本 忍、小田昌史、内田朱美、廣松辰巳、田中達朗、森本泰宏：FDG高集積を認め診断に苦慮したアミロイド沈着を伴う下顎骨髄炎の一例。日本歯科放射線学会第29回関西・九州合同地方会、11月28日、2009、岡山。

〔図書〕(計4件)

①Kito S, Shiiba S, Oda M, Tanaka T, Seta

Y, Wakasugi-Sato N, Matsumoto-Takeda S, Yoshioka I, Morimoto Y, Nova Science Publishers, Squamous Cell Carcinomas, Dynamic alteration of nucleolin and AgNOR proteins in oral cancer apoptotic cells by ultraviolet rays irradiation. 2011, pp.123-136.

②Oda M, Tanaka T, Kito S, Seta Y, Ishikawa A, Kodama M, Yamamoto N, Habu M, Miyamoto I, Kokuryo S, Khanal A, Basugi A, Wakasugi-Sato N, Matsumoto-Takeda S, Hamai M, Mandai S, Takino S, Matsuo K, Yamashita Y, Yoshioka I, Sakoda S, Takahashi T, Tominaga K, Koga H, Morimoto Y, Nova Science Publishers, Oral Cancer: Causes, Diagnosis and Treatment, Recent advances of the diagnostic images for oral cancers. 2011, pp.85-112

③Tanaka T, Kito S, Ishikawa A, Kokuryo S, Yamamoto N, Habu M, Miyamoto I, Kodama M, Matsumoto-Takeda S, Oda M, Wakasugi-Sato N, Otsuka K, Shiiba S, Seta Y, Yamashita Y, Yoshioka I, Matsuo K, Takahashi T, Tominaga K, Morimoto Y, In Tech Open access, In Computed Tomography - Special Applications, Application of CT for the study of pathology of the jaws. 2011, pp.3-24

④森本泰宏、田中達朗、松本 忍、医歯薬出版、臨床研修歯科医必修マニュアル(竹原直道、廣藤卓雄 監修)第2版、2010、40-44

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本 忍 (MATSUMOTO SHINOBU)
九州歯科大学・歯学部・助教
研究者番号：20514996