

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：27102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24792007

研究課題名(和文)細胞内シスプラチン輸送機構の解明と薬剤耐性との相関についての検討

研究課題名(英文)Study of the relationship between mechanism of transport of intracellular cisplatin and cisplatin resistance

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：プラチナ系抗がん剤であるシスプラチン(CDDP)の耐性機序を解明するため、細胞内での白金(Pt)の分布を透過型電子顕微鏡(TEM)及び走査型電子顕微鏡(SEM)を用いて検索した。TEMによる解析では、いずれの細胞種においても核内部にはPtによって染色されたクロマチンが認められ、クロマチンは凝縮していた。これらはCDDPが核内部に取り込まれ、DNAへ結合していることを示唆するものであった。また、Ptが電子染色の染色剤としての役割を果たすことも示された。SEMによる分析においても、マッピング上Ptのピークを認め、細胞内でのCDDPの局在部位を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the mechanism of cisplatin, the distributions of intracellular platinum were searched using a transmission electron microscope (TEM) and a scanning electron microscope (SEM). In individual cell lines which varied their sensitivity to cisplatin, by the analysis using the TEM, much chromatin stained with Pt was observed, and condensed. These findings suggested that cisplatin was incorporated into nuclear and bound to the DNA, thereby agglutinating chromatin. It was also indicated that platinum plays the role as a stain of an electron staining. A peak of platinum was detected by mapping examination by the SEM, and revealed a localization of cisplatin in the cells.

研究分野：歯科放射線学

キーワード：シスプラチン トランスポーター 薬剤耐性

1. 研究開始当初の背景

シスプラチン (以下 CDDP) は非常に優れた抗がん剤であるにもかかわらず、同薬剤に対する自然耐性、獲得耐性により临床上の使用が制限される。多くの研究がなされているにも関わらず、その細胞内流入入についての機構には未だ不明確な点が多く、また、細胞種による相違についても解明されていない。近年、CDDP の輸送には何らかのポンプの関与が示唆されている。本研究において CDDP の細胞内外への輸送システムを明らかにすることにより、CDDP 耐性を克服してその有効性を増大させることを目指す。

2. 研究の目的

プラチナ系抗癌剤である CDDP は、DNA 鎖内および鎖間に Pt-DNA 架橋を形成し、DNA の複製および転写を阻害することで抗癌作用を発揮する。CDDP は固形癌化学療法において最も重要な抗癌剤で、臨床でも広く使用されている。しかし患者の多くは、やがてこの薬剤に対して耐性を示すようになる (Kollmannsberger et al., 2006)。この CDDP に対する自然耐性、獲得耐性により CDDP の治療上の効果は低減し、临床上の使用が制限されることとなる。

CDDP の耐性機構には、(1) 細胞内への CDDP 蓄積の低下、(2) 細胞内でのチオール類による解毒の亢進、(3) CDDP によって傷害された DNA の修復能の亢進、(4) CDDP によるシグナル伝達経路、細胞周期調節の異常などが関与している (Stewart, 2007)。これらのうちの 1 つの機構が耐性の主な原因となっている場合もあるし、さまざまな因子が複雑に絡み合っている場合もある。耐性克服に関する研究は、あらゆる分野で多くの研究者により現在も盛んに行われている。

しかし、それにもかかわらず、上記 (1) の細胞内 CDDP 蓄積量の低下にかかわる原因因子は特定されていない。CDDP に対して感受性か耐性かに関わらず、そもそも、CDDP がどのようにして細胞内へ入るのか、あるいはどのようにして細胞外へ排出されるのか、その機構が正確にはわかっていない。CDDP は受動拡散によって細胞内へ入ると考えられてきたが、ウアバイン、pH、サイクリック AMP などによって CDDP の細胞内蓄積は左右される。また、CDDP には極性がある。これらのことなどから、CDDP の輸送には何らかの機構の存在が示唆され、未だ知られていないポンプによって輸送される可能性も考えられる。近年、CDDP の輸送に銅のトランスポーター (CTR1: Cu influx transporter, ATP7A 及び ATP7B: Cu efflux transporters) の関与が示唆された (Samimi et al., 2004, Safaei et al., 2005 他)。しかし、ATP7A を高発現させると、CDDP 耐性になるが細胞内 CDDP 蓄積は増加するといった矛盾が生じている。CTR1 についても、高発現させると細胞内の CDDP 量は増加するにもかかわらず、CDDP

に対する感受性は変わらないという報告もでてきた (Safaei et al., 2006)。

申請者は *in vitro* の研究により、CDDP の細胞内蓄積量が低下した耐性細胞株では CTR1 の発現は変化しないが、ATP7A が高発現していることを報告した (Matsumoto et al., 2007)。ATP7A は細胞内のゴルジネットワークのトランス面に、CTR1 は細胞膜上に存在するといわれており (Safaei 2005)、これらのトランスポーターが細胞内で CDDP を核まで、あるいは細胞外へどのように輸送するのかについても本研究で明らかにする必要があらうと考える。

これまでの基礎的研究から得られた知見をもとに、CDDP 処理後、Pt が細胞内のどの部位に取り込まれているのか、また細胞種における CDDP 局在の相違を調べるため、電子顕微鏡を用いて検索を行うこととした。

3. 研究の方法

(1) 使用する細胞株

耐性機序の異なる 2 種の細胞株を使用する。

CDDP 感受性細胞株	CDDP 耐性細胞株	主な耐性機序
A2780 (ヒト卵巣癌細胞株)	2780CP	DNA 修復能が亢進 シスプラチン細胞内蓄積量の変化なし GSH 量は増加
KB (ヒト類表皮癌細胞株)	KBR/1.2	DNA 修復能は変化なし シスプラチン細胞内蓄積量の減少 GSH 量は変化なし

(2) 細胞培養および薬剤投与

細胞を 145cm<sup>2</sup> dish に播種し、37°C5%CO<sub>2</sub> 下で培養を行った。72 時間後、160 μM の CDDP を 6 時間もしくは 24 時間投与後、直ちに細胞の回収を行った。

(3) 電顕観察用試料の準備

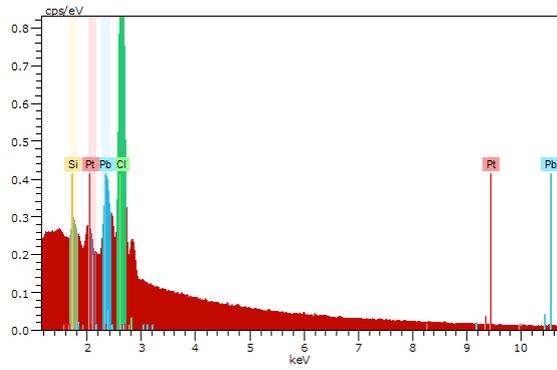
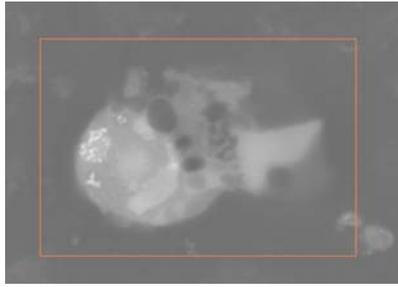
一般的に、電子染色においては、酢酸ウラン、酢酸鉛等の重金属を染色剤として用いている。CDDP 中に含まれる Pt も重金属の一種であるため、透過型電子顕微鏡観察における染色効果を有している可能性があると考えた。このため、回収した 4 種の細胞株をオスミウムを含まないグルタルアルデヒド単独による固定を行い、脱水処理後、包埋した。透過型電子顕微鏡用には 80~100 nm の薄切を行い、無染色状態で観察を行った。

走査型電子顕微鏡用には 1 μm に薄切を行い、カーボン膜シートを利用して Pb での染色を行った。

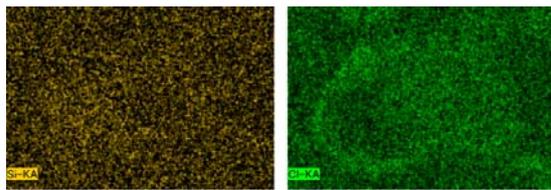
4. 研究成果

(1) 走査型電子顕微鏡 (SEM) による細胞内元素分布の分析結果

①細胞元素の分布図

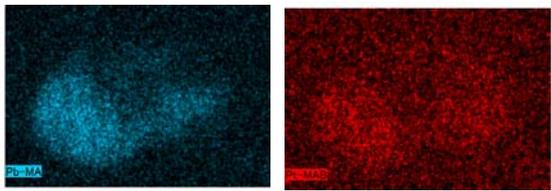


②各元素のマッピング画像



Si

Cl

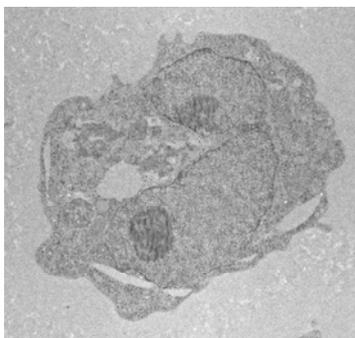


Pb

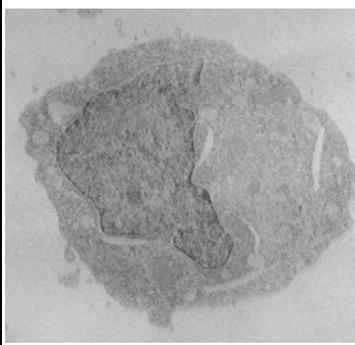
Pt

(2) 透過型電子顕微鏡 (TEM) による分析

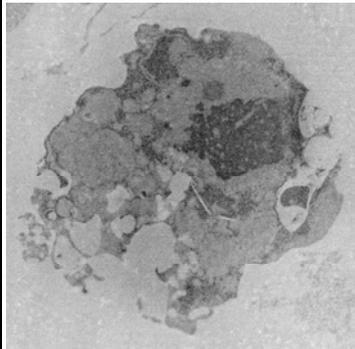
①A2780



Control

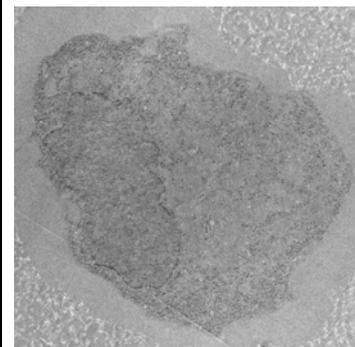


CDDP 6 時間  
投与後

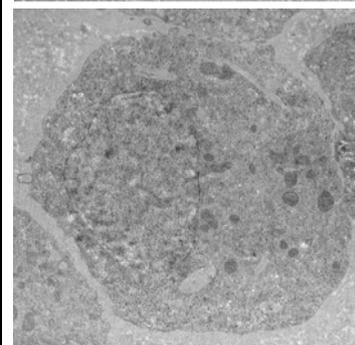


CDDP 24 時間  
投与後

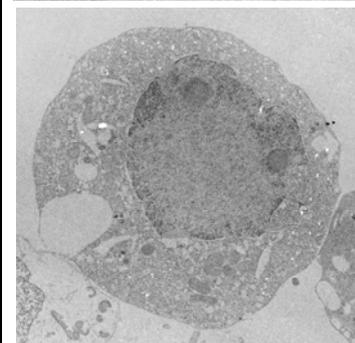
②2780CP



Control

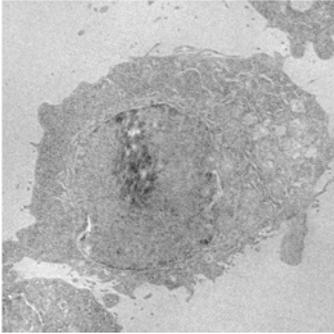


CDDP 6 時間  
投与後

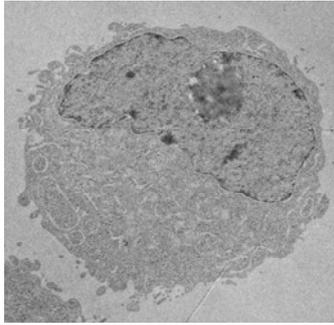


CDDP 24 時間  
投与後

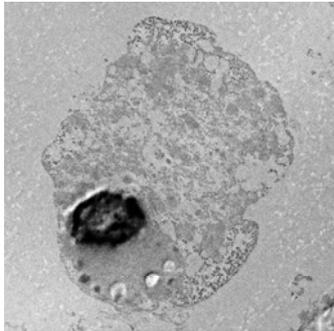
③KB



Control

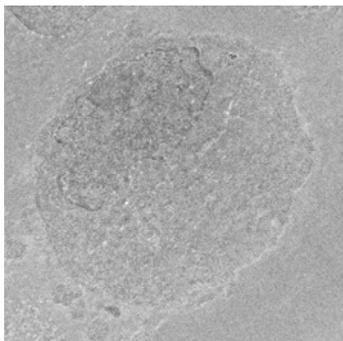


CDDP 6 時間  
投与後

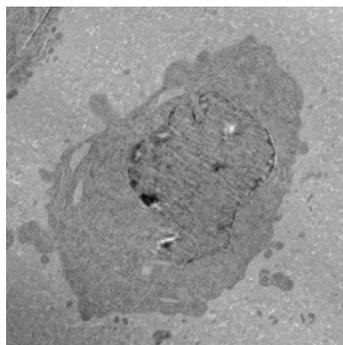


CDDP 24 時間  
投与後

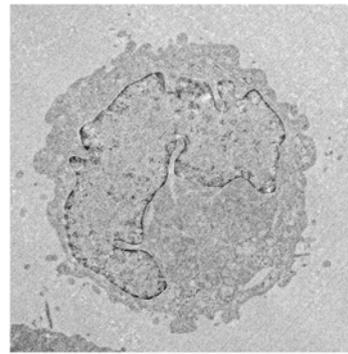
④KBR/1.2



Control



CDDP 6 時間  
投与後



CDDP 24 時間  
投与後

③考察

各細胞株を無染色状態下、TEM により観察を行ったところ、核内部のクロマチンの着色を認めた。これは Pt が電子染色において染色剤としての役割を果たすことを示すものであった。

今回、CDDP 6 時間処理後、A2780 では CDDP が核膜や核内に多く取り込まれていた。2780CP では驚くべきことに、ミトコンドリアにも CDDP の取り込みが認められ、CDDP の耐性機序の 1 つである DNA 修復能の亢進には、ミトコンドリアが重要な役割を果たすことが示唆された。24 時間処理後には、A2780 では核内に多量の Pt 染色を認め、クロマチンが凝集していると思われた。2780CP では核膜周辺に CDDP の局在が認められ、6 時間処理後同様、ミトコンドリアにも CDDP の取り込みが認められた。

また、KB と KBR/1.2 においては、CDDP6 時間処理後では KB により多くの CDDP が含まれていた。24 時間処理後では、KBR/1.2 では CDDP 量に明らかな変化を認めなかったが、KB においてはクロマチンの凝縮を示唆する結果を得た。

これまでに行った研究において、2780CP では A2780 と比べ DNA 修復能は亢進しているが、細胞内 CDDP 蓄積量の減少は認められないこと、KBR/1.2 においては KB と比べ、DNA 修復能に変化は認めないが、細胞内 CDDP 蓄積量が減少していることを報告してきた。今回の結果はいずれもこれまでに報告してきたこの結果に沿うものでもあった。

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 8 件)

①Shiiba S, Tanaka T, Sakamoto E, Oda M, Kito S, Ono K, Wakasugi-Sato N, Matsumoto-Takeda S, Seta Y, Imamura Y, Nakanishi O, Inenaga K, Morimoto Y: Can the neurovascular compression volume of the trigeminal nerve on MR cisternography predict the success of local anesthetic block after initial treatment by the

carbamazepine? Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol 2014, 117: e15-21 査読有

②Kazunobu Shiki, Tatsurou Tanaka, Shinji Kito, Nao Wakasugi-Sato, Shinobu Matsumoto-Takeda, Masafumi Oda, Shun Nishimura and Yasuhiro Morimoto The significance of cone beam computed tomography and the limitations of panoramic radiographs in the visualization of anatomical variations and lesions in the maxillary sinus for patients undergoing dental implant planning in a private dental office in Japan. Head Face Med 2014, 10:20. DOI: 10.1186/1746-160X-10-20. 査読有

③Oda M, Yoshino K, Tanaka T, Shiiba S, Makihara E, Miyamoto I, Nogami S, Kito S, Wakasugi-Sato N, Matsumoto-Takeda S, Nishimura S, Murakami K, Koga M, Kawagishi S, Yoshioka I, Masumi S, Kimura M, Morimoto Y: Identification and adjustment of experimental occlusal interference using functional magnetic resonance imaging. BMC Oral Health 2014, 14:124. DOI: 10.1186/1472-6831-14-124. 査読有

④Oda M, Tanaka T, Habu M, Ono K, Kodama M, Kokuryo S, Yamamoto N, Kito S, Wakasugi-Sato N, Matsumoto-Takeda S, Nishimura S, Murakami K, Koga M, Kaneuji T, Yoshiga D, Miyamoto I, Yamashita Y, Seta Y, Awano S, Yoshioka I, Matsuo K, Tominaga K, Ansai T, Inenaga K, Morimoto Y: Diagnosis and prognostic evaluation for xerostomia using dynamic MR sialography. Curr Med Imaging Rev 2014, 10: 84-94. 査読有

⑤Yoshioka I, Tanaka T, Habu M, Oda M, Kodama M, Kokuryo S, Kito S, Wakasugi-Sato N, Matsumoto-Takeda S, Seta Y, Fukudome Y, Tominaga K, Sakoda S, Morimoto Y: Criteria and limitations for selecting a sagittal split ramus osteotomy for patients with skeletal mandibular prognathism and open bite. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol 2013; 115: 455-65. 査読有

⑥Kito S, Koga H, Kodama M, Habu M, Kokuryo S, Yamamoto N, Oda M, Nishino T, Zhang M, Matsuo K, Wakasugi-Sato N, Matsumoto-Takeda S, Seta Y, Yoshiga D, Kaneuji T, Nogami S, Yoshioka I, Yamashita Y, Tanaka T, Miyamoto I, Kitamura C, Tominaga K, Morimoto Y: Variety and complexity of <sup>18</sup>F-FDG accumulations in oral cavity of patients with oral cancers.

Dentomaxillofac Radiol 2013; 42: 20130014. doi: 10.1259/dmfr.20130014. 査読有

⑦Oda M, Kito S, Tanaka T, Nishida I, Awano S, Fujita Y, Saeki K, Matsumoto-Takeda S, Wakasugi-Sato N, Habu M, Kokuryo S, Kodama M, Kaneuji T, Yoshiga D, Miyamoto I, Nishimura S, Yamashita Y, Maki K, Tominaga K, Yoshioka I, Ansai T, Morimoto Y: Prevalence and imaging characteristics of detectable tonsilloliths on 482 pairs of consecutive CT and panoramic radiographs. BMC Oral Health 2013; 13: 54. DOI: 10.1186/1472-6831-13-54. 査読有

⑧Oda M, Tanaka T, Yamashita Y, Kito S, Wakasugi-Sato N, Matsumoto-Takeda S, Nishimura S, Habu M, Kodama M, Uehara M, Kaneuji T, Kokuryo S, Miyamoto I, Yoshiga D, Seta Y, Tominaga K, Yoshioka I, Morimoto Y: Identification of peripheral vessels in oral and maxillofacial regions on magnetic resonance angiography obtained using a balanced steady-state free-precession sequence with a time-spatial labeling inversion pulse and using fresh blood imaging. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol 2013; 116: 791-7. doi: 10.1016/j.oooo.2013.09.016. 査読有

[学会発表] (計 1 件)

①Oda M, Tanaka T, Kito S, Wakasugi-Sato N, Matsumoto-Takeda S, Nishimura S, Morimoto Y: Magnetic resonance angiography with fresh blood imaging for identification of hemangiomas and around blood vessels in oral cavity. The 2<sup>nd</sup> Asia-pacific conference in Fukuoka, International symposium on oral education and research in Kitakyushu, Kitakyushu, Japan, January 25, 2014.

## 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