

氏名	秋 山 俊 樹		
学位(専攻分野)	博 士(歯 学)		
学位授与番号	博 甲 第 1112 号		
学位授与の日付	平成 5 年 3 月 28 日		
学位授与の要件	歯学研究科歯学専攻 (学位規則第 4 条第 1 項該当)		
学位論文題目	シスプラチン耐性 A431 細胞株の樹立とその耐性獲得機構に関する研究		
論文審査委員	教授 松村 智弘	教授 谷口 茂彦	教授 古田 裕昭

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

【緒言】

口腔癌の化学療法において、シスプラチン (CDDP) は最も頻用される薬剤の一つであるが、CDDP を反復投与する間に耐性化する現象も多く経験される。しかしながら、口腔癌の主体をなしている扁平上皮癌における CDDP 耐性機構に関する知見は乏しい。本研究ではヒト外陰部扁平上皮癌細胞由来である A431 細胞を用いて、多段階選択法により分離した耐性株と、突然変異の誘発により分離した耐性株をそれぞれ樹立し、その *in vitro* での耐性獲得機構について検索した。

【材料】

ヒト外陰部扁平上皮癌細胞由来 A431 細胞 (A431/W.T.) を用いた。

【方法】

1. CDDP 耐性 A431 細胞株の樹立

培養液中 CDDP 濃度を段階的に上昇させる多段階選択法と、N-メチル-N'-ニトロ-N'-ニトロソグアニジン (MNNG) による変異原処理法で耐性株を分離した。

2. CDDP 耐性扁平上皮癌株の耐性獲得機構の検討

1) 細胞内 CDDP 濃度の検討

CDDP 添加培養液中で培養した各細胞を経時的に集め、細胞内プラチナ量を原子吸光分光光度計にて測定した。

2) 細胞膜画分のタンパク質、脂肪酸分析

細胞膜試料のタンパク質分析は SDS-PAGE により、脂肪酸分析はガスクロマトグラフィーにて行った。

3) EGF 受容体数の定量, EGF 受容体の免疫組織化学的検討

[¹²⁵I] EGF binding assay により EGF 受容体数を定量した。また, 抗 EGF 受容体抗体を用いて ABC 法により免疫組織化学的に検討した。

4) 細胞内還元型グルタチオン (GSH) および酸化型グルタチオン (GSSG) 量, グルタチオン-S-トランスフェラーゼ- π (GST- π) 遺伝子の検出

GSH・GSSG 量の定量は, Hissin らの方法に従い測定した。GST- π の mRNA の検出は, β -アクチンを内部標準としてノーザンプロット法により行った。

5) プチオニンスルホキシミン (BSO) の CDDP 感受性に対する影響

BSO を培養液中に添加し, 細胞内 GSH 量の変化とそのときの CDDP 感受性を検討した。

【結果】

1. CDDP 耐性 A431 細胞株の樹立

多段階選択法では 2.7 倍の A431/CDDP1, 変異原処理法では 5.2 倍の A431/CDDP2 が分離され, 両耐性株は CDDP 非存在下で 1 年間培養しても耐性を維持していた。

2. CDDP 耐性扁平上皮癌株の耐性獲得機構の検討

1) 細胞内 CDDP 濃度の検討

細胞内 CDDP 蓄積量は, 両耐性株ともに減少していた。

2) 細胞膜画分のタンパク質, 脂肪酸分析

両耐性株ともタンパク質組成, 脂肪酸組成に A431/W.T. と相違はなかった。

3) EGF 受容体数の定量, EGF 受容体の免疫組織化学的検討

EGF 受容体数は, 両耐性株ともに減少が認められた。また, 免疫組織化学的検討では各細胞とも細胞膜に陽性反応を認めたが, 各細胞間に染色性の相違は認めなかった。

4) GSH・GSSG 量, GST- π 遺伝子の検出

GSH・GSSG 量は両耐性株ともに増加していた。また, GST- π の mRNA も両耐性株に発現が増加する傾向が認められた。

5) BSO の CDDP 感受性に対する影響

BSO を培養液中に添加することで, 各細胞株とも細胞内 GSH 量は減少し, CDDP 感受性は BSO 非処理時の A431/W.T. と同程度にまで回復した。

【考察】

本研究で樹立した両耐性株は, 各細胞株の耐性度に応じて細胞内の CDDP の蓄積量の低下が認められ, CDDP の蓄積量の低下による耐性を獲得していた。しかし, 膜の SDS-PAGE, 脂肪酸組成には相違を認めず, 特に, SDS-PAGE において多剤耐性細胞に発現すると言われる P-糖タンパク質のバンドの発現も認めなかった。一方で, 細胞内の薬剤代謝酵素である GSH・GSSG 量は両耐性株において増加しており, GST- π の mRNA の発現も増加する傾向を認めた。さらに, BSO により感受性が回復したことから GSH 関

連酵素群のCDDP耐性における関与が明らかとなった。また両耐性株の細胞あたりのEGF受容体数は減少しており、EGFの増殖作用の扁平上皮癌における特異性が示唆された。

【結論】

A431/W.T.から耐性株樹立の方法の相違によって耐性度の異なる二つの細胞株が分離された。両CDDP耐性株は多少性格を異にしたが、何れの株もCDDPの細胞内の蓄積量が低下していた。両耐性株において細胞内薬剤代謝酵素であるGSH関連酵素群の関与が明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

本論文は、口腔癌に頻用される化学療法剤シスプラチンに対するヒト外陰部由来扁平上皮癌A431細胞の耐性株を樹立し、その耐性獲得機構について研究したものである。多段階選択法と突然変異誘発法による異なった二種の方法でシスプラチン耐性株を樹立した。両シスプラチン耐性株は親株に対してもシスプラチンの細胞内への蓄積量が減少し、耐性の程度と細胞内蓄積量は平行関係にあること、細胞膜にP-糖タンパク質の発現をみないこと、両シスプラチン耐性株はともに細胞内に薬剤代謝酵素である還元型・酸化型グルタチオン量が増加していること、グルタチオンの関連酵素であるグルタチオン-S-トランスフェラーゼ- π のmRNAの発現が増加傾向を認めること、さらに、グルタチオンの合成阻害剤であるブチオニンスルホキシミンを作用させることで、耐性形質が克服されることなどが判明した。これらの知見はA431細胞におけるシスプラチンの耐性獲得機構には多剤耐性株に生じるP-糖タンパク質の関与はなく、薬剤の蓄積と代謝に問題のあることの示唆を得、さらに耐性克服への手がかりを得たことと併せて価値ある論文と認める。

よって、本申請者は博士（歯学）の学位を得る資格があると認める。