

学位の種類	博 士	氏 名	佐賀 祐司
<p>学位論文題目</p> <p>Reversal of Acquired Cisplatin Resistance by Modulation of Metallothionein in Transplanted Murine Tumors</p> <p>(マウス移植腫瘍におけるメタロチオネインの調節による シスプラチン獲得耐性からの回復)</p> <p>共著者名 橋本 博、八竹 直、岩田達也、徳光正行</p> <p>International Journal of Urology 掲載予定</p> <p>研究目的</p> <p>白金製剤であるシスプラチンは、各種の癌に広く用いられている抗癌剤である。しかしその有用性は抗癌剤耐性によりそこなわれることも多い。特に当初は有効であったのにもかかわらず、連用するうちに抗腫瘍効果が減弱すること、すなわち抗癌剤獲得耐性が認められることがあり問題視されている。シスプラチンの薬剤耐性因子として、細胞内蓄積の低下、不活化亢進、アポトーシス経路の抑制などが推測されている。これらの因子のうち、細胞内でのシスプラチン不活化にはSH基を有するメタロチオネインやグルタチオンなどが関与していると考えられ、なかでもメタロチオネインが重要な因子と推測される。</p> <p>メタロチオネインは重金属やある種の薬毒物の毒性軽減に関与する蛋白質であり、重要な生体防御因子の一つと考えられている。本蛋白質の生体内での合成は、金属をはじめさまざまな薬物やストレスなどによっても誘導されるため、細胞内濃度が変動しやすい蛋白質である(1)。何らかの刺激によって癌細胞中のメタロチオネイン濃度が上昇すると、その癌細胞はシスプラチンなどの抗癌剤に耐性を示すようになる可能性がある。例えば亜鉛やカドミウムの前投与によってメタロチオネインをあらかじめ誘導合成しておくと、シスプラチンの抗腫瘍効果が減弱することが報告されている。さらに亜鉛によるメタロチオネインの合成誘導が、シスタチオナーゼ阻害剤であるプロパルジルグリシンによって抑制され、シスプラチンの抗腫瘍効果を増強することが報告されている(2)。しかしシスプラチン自体のメタロチオネイン誘導効果は、亜鉛やカドミウムなどの金属と比較して微弱と考えられ、シスプラチン獲得耐性へのメタロチオネインの関与についてはいまだ議論のあるところである。</p> <p>本研究ではシスプラチンの薬剤耐性、特に獲得耐性に関する機序についてメタロチオネインを中心に検討することを目的とした。すなわちシスプラチンによるメタロチオネインの誘導性について検討し、さらにはメタロチオネインをターゲットとしたBiochemical Modulationの可能性についてシスタチオナーゼ阻害剤であるプロパルジルグリシンを併用して検討した。</p>			

材料・方法

実験動物は C3H マウスの背部皮下にマウス膀胱癌細胞株 MBT-2 を移植した担癌マウスである。

1. シスプラチンによるメタロチオネイン誘導性の検討

担癌マウスにシスプラチンを単回ないし複数回投与し、その際の腫瘍組織内メタロチオネイン濃度の変化を検討した。またメタロチオネインの組織内濃度を調節するモジュレーターとして、ガンマシスタチオナーゼ阻害剤であるプロパルジルグリシンも併用した。メタロチオネイン測定は金属飽和法のひとつである銀飽和法により行った。

2. メタロチオネインをターゲットとした Biochemical Modulation の検討

担癌マウスにシスプラチンあるいはプロパルジルグリシンを単独ないし併用で 10 日間連日投与し、その際の腫瘍組織内メタロチオネイン濃度ならびに抗腫瘍効果を検討した。抗腫瘍効果は MBT-2 移植後、経時的に腫瘍サイズを計測して判定した。また腫瘍組織の一部をメタロチオネイン免疫組織染色し、メタロチオネイン蛋白の発現性評価も行なった。

3. シスプラチンによるグルタチオン誘導性および腫瘍内プラチナ蓄積性の検討

担癌マウスにシスプラチンを 10 日間連日投与し、その際の腫瘍組織内グルタチオン濃度の変化を検討した。グルタチオン測定は CALBIOCHEM's Glutathione Assay Kit を使用し、分光光度計にて測定した。

また担癌マウスにシスプラチン単独あるいはプロパルジルグリシン併用で 10 日間連日投与し、その際の腫瘍組織内プラチナ濃度を検討した。プラチナ濃度はフレイムレス原子吸光計にて測定した。

4. 統計学的解析

実験結果はすべて平均値±標準偏差で示し、統計学的解析は Student's *t* 検定ないし Dunnett の多重比較検定を用い、 $P < 0.05$ を有意差ありとした。

成績

1. シスプラチンによるメタロチオネイン誘導性

シスプラチン 50 ないし 100 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ i. p. の単回投与では、腫瘍組織内メタロチオネイン濃度にほとんど変化を与えなかった。そこで繰り返し投与を行うことで組織内濃度が上昇するかなかを明らかにするため、シスプラチン 5.0, 7.5, 10.0, 12.5 $\mu\text{mol}/\text{kg}/\text{day}$ i. p. の 10 日間連日投与を行ったところ、投与量依存的にメタロチオネイン濃度が上昇した。またシスプラチン 10 $\mu\text{mol}/\text{kg}/\text{day}$ i. p. を連日 (5, 8, 10, 11 日間) 投与したところ、投与回数依存的にメタロチオネイン濃度が上昇した。すなわちシスプラチン連用により、腫瘍組織内にメタロチオネインが誘導合成された。

そこで次にメタロチオネインの合成阻害作用をもつプロパルジルグリシンを併用することで、シスプラチン繰り返し投与で腫瘍組織内に誘導合成されたメタロチオネインが基礎レベルまで減少するかなかを検討した。シスプラチン 10 $\mu\text{mol}/\text{kg}/\text{day}$ i. p. を連日 10 日間投与する系で、プロパルジルグリシン (250, 500, 1000 $\mu\text{mol}/\text{kg}/\text{day}$ s. c.) を連日 10 日間併用投与したところ、腫瘍組織内メタロ

チオネインはプロパルジルグリシンの用量依存的に減少した。以上の検討により、シスプラチンの繰り返し投与によって腫瘍組織内にメタロチオネインが誘導合成されること、さらにモジュレーターとしてプロパルジルグリシンを併用することで、シスプラチンによるメタロチオネイン誘導合成を抑制できることが判明した。

2. メタロチオネインをターゲットとした Biochemical Modulation 効果の検討

メタロチオネインの腫瘍組織内濃度がシスプラチンの抗腫瘍効果に与える影響を検討するため、シスプラチン単独投与群ならびにシスプラチン-プロパルジルグリシン併用投与群の各々の腫瘍内メタロチオネイン濃度と腫瘍増殖動態を比較した。シスプラチン ($10\mu\text{mol}/\text{kg}/\text{day}$ i. p.) を10日間連日投与すると、腫瘍内メタロチオネイン濃度はコントロール群に比較して約2倍まで上昇した ($P < 0.01$)。シスプラチン ($10\mu\text{mol}/\text{kg}/\text{day}$ i. p.) に加えてプロパルジルグリシン ($1000\mu\text{mol}/\text{kg}/\text{day}$ s. c.) を10日間連日投与すると、腫瘍組織内メタロチオネイン濃度はコントロール群とほぼ同レベルに収まっていた。腫瘍体積はシスプラチン単独投与群に比較し、シスプラチン-プロパルジルグリシン併用投与群では3分の1以下であった ($P < 0.01$)。すなわちメタロチオネインを合成誘導しないシスプラチン-プロパルジルグリシン併用投与群において、有意に抗腫瘍効果が増強していた。

各群の腫瘍組織のメタロチオネイン免疫染色では、生化学的測定結果に一致する染色強度を示した。

3. 腫瘍組織内グルタチオンおよびプラチナ濃度

シスプラチン $10\mu\text{mol}/\text{kg}/\text{day}$ i. p. を10日間連日投与しても、腫瘍組織内グルタチオン濃度には変化を与えなかった。

腫瘍組織内プラチナ濃度は、シスプラチン単独群 ($10\mu\text{mol}/\text{kg}/\text{day}$ i. p. 10日間連日)の方が、シスプラチン-プロパルジルグリシン併用投与群より1.7倍高い値を示した ($P < 0.05$)。

考 案

シスプラチンによるメタロチオネインの誘導性については *in vitro* では一般的に認められる現象であり、数多くの報告がなされているが、*in vivo* では従来その報告はあまりなされていない(3)。その理由としてシスプラチンのメタロチオネイン誘導能が、亜鉛やカドミウムなどの金属と比較して微弱なこと、あるいは *in vivo* 環境での細胞株特異性が一因と考えられる。

今回の検討においてもシスプラチンの単回投与によるメタロチオネイン誘導はわずかであり、MBT-2細胞株でのシスプラチンによるメタロチオネイン誘導性は低いと言える。しかし同一量を10回に分割して投与したところ、有意にメタロチオネイン濃度が上昇した。つまりシスプラチンの投与量、投与回数あるいは投与間隔などを調整することで、メタロチオネインの誘導を調節できる可能性がある。このことはメタロチオネインを抗癌剤耐性因子としてとらえた場合、なるべくメタロチオネインの増加しない投与方法を選択することで抗癌剤耐性を軽減できる可能性を示唆している。

またシスプラチン10日間連日投与の系でプロパルジルグリシンを併用することによって、メタロチオネインの合成誘導の抑制が可能となり、シスプラチンの抗腫瘍効果が増強することが確認された。その解釈として、シスプラチンの連用によって生じたメタロチオネインを介する抗癌剤獲得耐性が、プロパルジルグリシンの併用により回復できたものと考えられる。このようなメタロチオネインをターゲットとした Biochemical Modulation の手法を用いることによってシスプラチン耐性を克服できる可

能性がある。

腫瘍組織内プラチナ濃度について、シスプラチン単独群のほうがプロパルジルグリシン併用群よりも高いという結果であった。すなわち抗腫瘍効果とは相関せず、メタロチオネイン濃度と相関していた。この解釈として腫瘍組織内に取り込まれたプラチナはすでに不活化されており、組織内メタロチオネイン量に応じた量が蓄積しているものと推察された。また、グルタチオンもシスプラチンにより誘導されず、今回の実験系ではシスプラチンの耐性因子として細胞内蓄積の低下やグルタチオンの関与は認められなかった。

結 論

マウス膀胱癌細胞を移植した担癌マウスを用いた *in vivo* の実験系において、シスプラチンの繰り返し投与によりメタロチオネインが誘導されること、さらにメタロチオネインを介するシスプラチンの獲得耐性が、メタロチオネインをターゲットとした Biochemical Modulation によって回復できることが示唆された。

引用文献

- (1) Kagi JH. Overview of metallothionein. *Methods Enzymol.* 1991; 205: 613-626.
- (2) Satoh M, Kloth DM, Kadhim SA. Modulation of both cisplatin nephrotoxicity and drug resistance in murine bladder tumor by controlling metallothionein synthesis. *Cancer Res.* 1993; 53: 1829-1832.
- (3) Okazaki Y, Miura N, Satoh M, Imura N, Naganuma A. Metallothionein-mediated resistance to multiple drugs can be induced by several anticancer drugs in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998; 245: 815-818.

参考論文

- (1) Saga Y, Hashimoto H, Yachiku S, Tokumitsu M, Kaneko S. Immunohistochemical expression of metallothionein in human bladder cancer: correlation with histopathological parameters and patient survival. *J Urol.* 2002; 168: 2227-2231.
- (2) Hashimoto H, Tokumitsu M, Saga Y, Okuyama M, Yachiku S. Immunohistochemical expression of P-glycoprotein in the rat urinary bladder and the effect of verapamil on intravesical chemotherapy. *Int J Urol.* 2001; 8: 118-123.
- (3) Hashimoto H, Sue Y, Saga Y, Tokumitsu M, Yachiku S. Roles of p53 and MDM2 in tumor proliferation and determination of the prognosis of transitional cell carcinoma of the renal pelvis and ureter. *Int J Urol.* 2000; 7: 457-463.

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏名	佐賀 祐司
審査委員長 谷口隆信 ㊞			
審査委員 若宮伸隆 ㊞			
審査委員 松原和夫 ㊞			
学位論文題目			
Reversal of acquired cisplatin resistance by modulation of metallothionein in transplanted murine tumors. (マウス腫瘍におけるメタロチオネインの調節によるシスプラチン獲得耐性からの回復)			
共著者名 橋本博、八竹直、岩田達也、徳光正行			
International Journal of Urology 掲載予定			

シスプラチンは精巣腫瘍、膀胱腫瘍、卵巣腫瘍などの固形腫瘍に対して用いられ、特に精巣腫瘍に対しては組織型にかかわらず高い効果が認められている。しかしながら再燃例においてこの薬剤に耐性を示す例がしばしば見られ、特に精巣腫瘍以外の腫瘍においては化学療法の効果に限られてしまうことが多い。このシスプラチン耐性の獲得に関わる分子機構については不明である。シスプラチンは白金錯体製剤であり、DNAを障害し抗腫瘍効果を発揮するためにこの白金が必要である。著者らは体内で重金属と結合しそれらの代謝や貯蔵に関わる分子に着目し、シスプラチン耐性の一部はこれらの結合蛋白に由来するのではないかという仮説に立って実験を行った。

著者らはマウス皮下に膀胱癌由来の移行上皮癌細胞株MBT2を移植した担癌マウスモデルを用いた。先ず代表的な金属結合性の小分子蛋白質であるメタロチオネインについて、シスプラチン投与による誘導について検討したところ、投与開始後1週間以降に有意な発現上昇が認められ11日後には約2倍にまで発現が亢進した。γ-シスタチオネースを阻害することによってメタロチオネインの合成を抑制するプロバジルグリシンを同時に投与することにより、シスプラチンによって誘導されるメタロチオネインの誘導は完全に抑制された。これらの結果はメタロチオネインに対する抗体を用いた腫瘍組織学的検討でも確認された。次いで腫瘍縮小効果について検討した。シスプラチン10日間連続投与によって腫瘍容量は1/3に縮小したが、プロバジルグリシンを同時に投与することにより腫瘍容量は1/10にまで縮小した。プロバジルグリシン単独では抗腫瘍効果は認められなかった。これらの結果から、シスプラチンによって誘導されてくるメタロチオネインにより白金が結合されることによってシスプラチンの抗腫瘍効果が減弱すると言う、シスプラチン耐性獲得機構が示唆された。最後に、腫瘍組織内の白金濃度を直接定量した所、シスプラチン単独投与の場合よりもシスプラチンとプロバジルグリシン併用の方が細胞内白金濃度の有意な減少がみられ、一見これまでの結果と矛盾するよう思われた。著者らは、シスプラチン感受性のある併用群において細胞内白金濃度が低いことは、結合蛋白であるメタロチオネインの発現誘導が起こらないためであるが、シスプラチン分子内で錯体として結合できる実質的な白金濃度は併用群の方が高く、シスプラチンに対する感受性とは矛盾しないと結論づけている。

シスプラチンは固形腫瘍に広い抗腫瘍スペクトラムを持つ薬剤であるが、再燃例における耐性の獲得が大きな問題である。今回の論文で示された重金属結合性の蛋白メタロチオネインの誘導による耐性は、白金錯体製剤というシスプラチンの特徴から考えて他の抗腫瘍薬とは異なるユニークなものであると考えられる。今後メタロチオネインに対する薬理学的手段を通じてシスプラチン耐性が克服されるような研究に発展されることが期待される。

申請者に対して諮問を行い、当該分野に関する申請者の知識/経験/見識は課程博士に相応しいものであると判断しました。以上、論文/諮問による審査の結果、博士に値すると判定したことを御報告申し上げます。