



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
報告番号	甲第1505号
学位記番号	第1076号
氏名	國井 英治
授与年月日	平成 27 年 9 月 25 日
学位論文の題名	Organic cation transporter OCT6 mediates cisplatin uptake and resistance to cisplatin in lung cancer (OCT6 は肺癌におけるシスプラチン取り込みと耐性に関与する) Cancer Chemotherapy and Pharmacology. 75 (5): 985-991, 2015.
論文審査担当者	主査： 中西 良一 副査： 伊藤 猛雄, 新実 彰男

論 文 内 容 の 要 旨

分子標的薬の登場により癌治療のパラダイムシフトが起こっている。しかしプラチナ系抗癌剤は未だ癌治療における主要薬剤として汎用されており、その耐性化機構は十分に解明されていない。プラチナ系抗癌剤が癌細胞に対して殺細胞効果を発揮する上で、これまでに癌細胞内プラチナ濃度の重要性が示されている。細胞内環境は、細胞膜を形成する脂質二重層を介して細胞外と隔てられているが、単純拡散によって細胞膜を通過する脂溶性低分子と異なり、プラチナ系抗癌剤をはじめとした水溶性分子の細胞内外への輸送は、細胞膜上に存在する機能タンパク質であるトランスポーターに依存する。過去に multidrug resistance-associated protein (MRP) などの排泄型トランスポーターの発現亢進が、細胞内プラチナ濃度の低下を介して薬剤耐性に関わることが明らかにされてきた。その一方で、取り込み型トランスポーターと薬剤耐性との関連を検討した報告はほとんどない。本論文ではこの取り込み型トランスポーターの一種である Organic cation transporter (OCT) ファミリー蛋白に焦点を当て、OCT ファミリーが癌細胞内へのプラチナ系抗癌剤の取り込みに関与しているか、また癌細胞における OCT の発現低下が、シスプラチン (cisplatin, CDDP) をはじめとするプラチナ系抗癌剤に対する耐性に関与するか、肺癌細胞株を用いて検討を行った。

まず、小細胞肺癌細胞株 PC-6 と非小細胞肺癌細胞株 PC-14、およびこれらの細胞株の CDDP 耐性株 PC-6/CDDP および PC-14/CDDP を用いて検討を行った。はじめに、これらの細胞株の CDDP に対する感受性を MTS アッセイ法で検討したところ、その IC₅₀ 値は親株と比較して PC-6/CDDP では 4.24 倍、PC-14/CDDP は 3.79 倍の耐性を有していた。同様に、同じプラチナ系抗癌剤のオキサリプラチン (oxaliplatin, L-OHP) に対する IC₅₀ 値も、PC-9/CDDP では 14.2 倍、PC-14/CDDP では 7.72 倍の耐性を有していた。

次に、4つの OCT ファミリー蛋白遺伝子、*OCT1 (SLC22A1)*, *OCT2 (SLC22A2)*, *OCT3 (SLC22A3)*, *OCT6 (SLC22A16)* の発現レベルを real time RT-PCR を用いて比較したところ、*OCT6 (SLC22A16)*のみ、2つの CDDP 耐性細胞株に共通して親株より発現が低下していた。これらの耐性株における OCT6 発現は、蛋白レベルでも発現低下していることを Western blotting を用いて確認した。さらに CDDP (50 μ M ないし 400 μ M) を 1 時間ないし 4 時間曝露させた後に、細胞成分を洗浄・破碎して遊離プラチナを測定する手法で、CDDP 曝露後の細胞内プラチナ濃度を測定したところ、耐性株では親株と比較して有意な細胞内プラチナ濃度の低下が認められた。これらの結果より、OCT ファミリーの中で OCT6 が癌細胞株における CDDP の細胞内取り込みに関与し、その発現が薬剤耐性と関連することが示唆された。

OCT6 の発現と、肺癌細胞株での CDDP 細胞内取り込み、およびその耐性化への関与をより直接的に確認するため、OCT6 の発現低下が認められた CDDP 耐性株 PC-14/CDDP に対して、プラスミドベクターを用いて OCT6 を過剰発現させた細胞株 (OCT6 vector 1 および OCT6 vector 2) およびその陰性コントロール株 (mock) を樹立した。これらの細胞株に対して、上記と同様の手法を用いて、CDDP (400 μ M) ないし L-OHP (100 μ M) に 4 時間曝露した後の細胞内プラチナ濃度を比較したところ、OCT6 過剰発現株では陰性コントロール株と比較して、有意な細胞内プラチナ濃度の上昇が確認された。加えて CDDP および L-OHP に対する薬剤感受性を評価したところ、OCT6 過剰発現株の IC₅₀ 値は、陰性コントロール株の IC₅₀ 値と比較して低下していた。即ち、OCT6 の過剰発現が、細胞内プラチナ濃度の上昇を引き起こし、さらに薬剤耐性を回復させたと考えられた。

以上の結果より、肺癌細胞株においては、OCT ファミリーの中で OCT6 が CDDP の細胞内取り込みに関わり、OCT6 の発現低下が CDDP 耐性の 1 つの機序であることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

【発表の概略】 プラチナ系抗癌剤が癌細胞に対して殺細胞効果を発揮する上で、癌細胞内プラチナ濃度の重要性が示されている。本論文では、取り込み型トランスポーターの一種である Organic cation transporter (OCT) ファミリー蛋白に焦点を当て、OCT ファミリーが癌細胞内へのプラチナ系抗癌剤の取り込みに関与しているか、また癌細胞における OCT の発現低下が、シスプラチン (cisplatin, CDDP) をはじめとするプラチナ系抗癌剤に対する耐性に関与しているか、肺癌細胞株を用いて検討した。小細胞肺癌細胞株 PC-6 と非小細胞肺癌細胞株 PC-14、およびこれらの CDDP 耐性株 PC-6/CDDP および PC-14/CDDP を使用し、各々の細胞株の CDDP に対する感受性を MTS アッセイ法で比較したところ、その IC₅₀ 値は親株と比較して PC-6/CDDP では 4.24 倍、PC-14/CDDP は 3.79 倍上昇していた。また、オキサリプラチン (oxaliplatin, L-OHP) に対する IC₅₀ 値は、PC-6/CDDP では 14.2 倍、PC-14/CDDP では 7.72 倍と交差耐性を認めた。これらの細胞株における、OCT ファミリー遺伝子、*OCT1 (SLC22A1)*、*OCT2 (SLC22A2)*、*OCT3 (SLC22A3)*、*OCT6 (SLC22A16)* の発現レベルを quantitative RT-PCR を用いて比較したところ、*OCT6 (SLC22A16)* のみ、2 つの CDDP 耐性細胞株に共通して親株より発現が低下していた。また OCT6 は蛋白レベルでも耐性株の発現低下が確認された。これらの細胞株に 50 μM ないし 400 μM の CDDP を一定時間曝露させた後、細胞成分を洗浄・破砕して遊離プラチナを測定する手法で細胞内への CDDP 取り込みを比較したところ、耐性株では親株と比較して有意な取り込み低下が認められた。次に、OCT6 の発現が細胞内への CDDP 取り込みと耐性化に与える影響を直接的に確認するため、OCT6 の発現低下が認められた PC-14/CDDP に対して、OCT6 を強制発現させた細胞株 (OCT6 vector 1, OCT6 vector 2) およびコントロール株 (mock) を樹立した。これらの細胞株に対して、上記と同様の手法で CDDP および L-OHP 曝露後の、細胞内への薬剤取り込みを比較したところ、OCT6 強制発現株ではコントロールと比較して有意な薬剤取り込み上昇を認めるとともに、CDDP および L-OHP に対する IC₅₀ 値は低下していた。即ち、OCT6 の過剰発現がこれらの薬剤の細胞内取り込みを亢進させ、薬剤耐性を回復させたと考えられた。結論として、肺癌細胞株における OCT6 は CDDP の細胞内取り込みに関与し、その発現低下が CDDP 耐性に寄与することが示唆された。

【審議の内容】 主査の中西教授より、①CDDP の副作用とその機序およびその対策はどうしているか、②現在の肺癌診療において各臨床病期に対する治療選択はどうなっているか、③OCT を除く他の膜輸送蛋白に関して、④OCT6 の本来の機能は何か、⑤査読者からどのような質問を受け、どのように対処したか、等の質問が挙げられた。次に副査の伊藤教授より、①OCT6 の発現調整メカニズムはどうなっているか、②OCT6 の電位および pH 依存性はどうか、③OCT6 のシスプラチンの親和性を決定づける因子は何か、④OCT6 のシスプラチン輸送に対するカルニチンの効果はどうか、⑤細胞バッチや培養条件の違いが影響しないか、などの質問があった。同じく副査の新実教授より、①抗悪性腫瘍薬の分類と作用機序、②卒業後の肺癌診療の進歩などに関する質問があった。いずれの質問に対しても十分な回答が得られ、本研究領域について深く理解するとともに、専攻分野に関する知識を習得しているものと判断された。よって本論文の著者には博士 (医学) の学位を授与するに値すると判断した。