

小細胞肺癌細胞 Lu-165 におけるフェニトインによる異所性アルギニンバズプレ
シン産生の抑制

Phenytoin Inhibits Ectopic Arginine Vasopressin Production in the Small Cell Lung
Cancer Cell Line Lu-165

平成 25 年度入学

太田 貴洋 (Ohta, Takahiro)

指導教員

庄司 優

目次

	項
略語	1
緒言	2
第1章 ヒト小細胞肺癌由来細胞間における AVP mRNA 発現の比較	6
第1節 序論	6
第2節 実験方法	6
第3節 実験結果	8
第4節 考察	9
第2章 小細胞肺癌細胞 Lu-165 において PHT が Copeptin 分泌と AVP mRNA 発現に与える影響	10
第1節 序論	10
第2節 実験方法	10
第3節 実験結果	12
第4節 考察	14
第3章 小細胞肺癌細胞 Lu-165 において高 Na 環境と PHT が Copeptin 分泌と AVP mRNA 発現に与える影響	16
第1節 序論	16
第2節 実験方法	16
第3節 実験結果	18
第4節 考察	20

第 4 章	小細胞肺癌細胞 Lu-165 における 5 つの VGSC サブユニット遺伝子発現の比較と SCN3A mRNA 発現に与える高 Na 環境と PHT の影響	22
第 1 節	序論	22
第 2 節	実験方法	22
第 3 節	実験結果	24
第 4 節	考察	26
	総括	27
	謝辞	28
	参考文献	29

略語

ADH	Antidiuretic hormone
AVP	Arginine vasopressin
CD	Cluster Designation
CHO	Chinese hamster ovary cells
CT	Threshold Cycle
mRNA	Messenger RNA
SCN	Gene symbol for voltage-gated sodium channel subunits
SCLC	Small cell lung cancer
SIADH	Syndrome of inappropriate secretion of antidiuretic hormone
PHT	Phenytoin
PS	Performance status
RT-PCR	Reverse Transcription-PCR
VGSC	Voltage-gated sodium channel

緒言

日本人の死亡数は 2015 年には 129 万 428 人で、2014 年の 127 万 3,004 人より 1 万 7,424 人増加している。死因別にみると、死因の第 1 位は悪性新生物、2 位は心疾患、3 位は肺炎であり、死亡者の約 3.5 人に 1 人は悪性新生物で死亡している。悪性新生物の主な部位別の死亡率（人口 10 万対）は、男性では肺が最も多く、1993 年以降第 1 位となり、2015 年の死亡数は 5 万 3,170 人、死亡率は 87.2 である。女性では大腸とともに肺が多く、2 万 1,164 人、死亡率は 32.9 である¹⁾。

肺癌は、小細胞肺癌（以下 SCLC）と非小細胞肺癌に分類される。SCLC は、肺癌全体の 10-15% を占め、非小細胞肺癌と比較すると腫瘍の増殖速度が早い反面、抗がん薬、放射線治療に対して感受性が高い。SCLC の予後因子は、PS および臨床病期、性、年齢、血清 Na 値とされている²⁾。進展期の SCLC 患者において血清 Na 値 130 mEq/L 以下を呈した患者は、血清 Na 値 130 mEq/L 以上の患者より生存期間が有意に短く予後が悪いと報告されている³⁾。

SCLC 患者における低 Na 血症は様々な要因で起こるが、特に腫瘍随伴症候群に惹起されるものは進行性で临床上重要である。SCLC の腫瘍随伴症候群は、原発腫瘍や転移腫瘍から離れた部位に生じる宿主の臓器機能障害と定義され、AVP 分泌過剰症（以下 SIADH）、異所性副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン症候群、高カルシウム血症、白血球増加症、播種性血管内凝固症候群、Lambert-Eaton 筋無力症候群、腫瘍随伴性脳脊髄炎、腫瘍随伴性知覚性ニューロパシー、腫瘍随伴性小脳変性症、腫瘍随伴性網膜症など多彩である⁴⁾。このうち、低 Na 血症を引き起こすのは、SIADH である。

SIADH は、髄膜炎、外傷、くも膜下出血、脳腫瘍、脳梗塞、脳出血、Guillain-Barre

症候群、脳炎、肺炎、肺腫瘍、肺結核、肺アスペルギルス症、気管支喘息、陽圧呼吸、ビンクリスチン、クロフィブレート、カルバマゼピン、アミトリプチン、イミプラミンなどにより視床下部・下垂体後葉からの AVP 分泌が刺激された場合発症する。また、腫瘍が AVP の自律性産生能を有し細胞外へ分泌する場合には、より重症の SIADH が発症する⁵⁾。

AVP の下垂体後葉（正所性）からの生理的分泌は、血中浸透圧の上昇により、視床下部の室傍核、視索上核の大細胞性内神経分泌ニューロンが刺激されて亢進する。これに対し、SCLC における異所性の AVP の産生分泌は、浸透圧などの調節を受けない自律性で、正所性に分泌される AVP の約 10 倍以上の血中濃度に達することもある。

AVP の生合成は、視床下部で転写された後、軸索輸送中にプロセッシングを受け、AVP、ニューロフィジン II、Copeptin で構成される前駆体のプロ AVP となる。AVP は 9 個のアミノ酸から構成され、アミノ酸配列の第 1、6 番目にシステインをもち、ジスルフィド結合による環状構造を持つ。AVP と Copeptin が等モルで下垂体後葉から分泌される⁶⁾。Copeptin は、プレプロ AVP の C 末端に位置し、半減期が AVP よりも長い上、安定性が高く、測定が容易であるため、AVP の分泌を間接的に評価するのに役立つ、測定に係る抗体が安定的に供給される様々な疾患の予後予測マーカーとして注目されている⁷⁻¹⁰⁾。AVP と Copeptin の血中濃度の間には相関性があることが確認されている⁷⁾。そこで今回、AVP と等モルに分泌される Copeptin 測定の有用性に注目し、本研究では AVP の分泌を Copeptin で評価することとした。

SIADH の治療は、過剰な AVP の作用の結果生じる低 Na 血症の改善に向けら

れている。原疾患の治療、1日の総水分摂取量の15-20 mL/kgへの制限、食塩の経口または非経口投与、ループ利尿薬の静脈内投与と、尿中Na排泄量に相当する3%食塩水投与などが行われている。異所性AVP産生によるSIADHで、上記の治療で効果不十分な場合は、AVP受容体拮抗薬であるモザバプタン塩酸塩の投与ができる¹¹⁾。しかし、これらはAVPの過剰を抑制するものではなく、あくまで、低Na血症の改善を目指したものである。現時点ではAVPの過剰を改善する薬剤は、臨床上推奨されるものがない。

AVPの過剰分泌を改善させる可能性のある薬物としてPHTが知られていた。臨床的には、SIADHの症例にPHTを投与すると、低Na血症とともに臨床症状が改善したという報告が散見される。In vitroにおいてもGuzekらは、Wister rat下垂体からのAVP分泌をPHTが抑制したと報告している¹²⁾。したがって、PHTは下垂体のAVP産生および分泌を抑制する可能性が高いが、SCLCにおける異所性AVP産生および分泌をPHTが抑制するかどうか不明であった。

PHTはVGSC阻害薬に位置付けされており、1908年に初めて合成され、欠神発作を除くすべての発作に対して有効性を示す、最も広範に使用されている抗てんかん薬の1つである。PHTの有効血中濃度は、非常に狭く10-20 µg/mLである¹³⁾。

PHTが作用するVGSCは9種の24回膜貫通型αサブユニット、5種の1回膜貫通型βサブユニットが現在まで同定されている¹⁴⁾。VGSCは興奮性の筋細胞や神経細胞の機能に重要であるが、最近非興奮性細胞における発現と機能に注目が集まっている。いくつかのがん細胞では、異なるVGSCサブユニットの発現が報告されており、がんの悪性度とVGSC発現の関連性が指摘されている¹⁵⁾。

16)。しかし、SCLCにおけるVGSCサブユニットの発現についてはこれまで報告がないことから、SCLCでのPHTの作用は不明であった。

そこで、PHTが異所性のAVP産生・分泌に対して抑制効果を有するか否か、また、異所性AVP産生腫瘍は非興奮性細胞であるがPHT作用分子であるVGSCを発現しているか否かを明らかにすることは、基礎的にも臨床的にも重要な問題と考えられる。もしPHT反応分子が異所性AVP産生腫瘍に存在するならば、その分子は、創薬ターゲットになり得るからである。そこで本研究では、まずSCLCがCopeptinを分泌することを確認、PHTがSCLCにおけるCopeptin分泌とAVP mRNAの発現を抑制するか否か検討することとした。さらに、SCLCはAVP転写および分泌に関わるNa感受性を有するか、SCLCにはVGSCサブユニットが発現しているか、PHTとNa負荷はSCLCにおけるVGSCサブユニットmRNAの発現転写に影響を与えるか否かについても検討することとした。

第1章 ヒト小細胞肺癌由来細胞間における AVP mRNA 発現の比較

第1節 序論

PHT の異所性 AVP 産生・分泌に対する影響を検討するためには、腫瘍細胞が AVP を高度に分泌していることが望ましい。しかし、SCLC における AVP の産生と分泌には、細胞株間で差が大きい。そこで本章では、4 種の SCLC 細胞系において AVP mRNA の発現を比較検討した。

第2節 実験方法

1.2.1 実験用試薬及び実験材料

Lu-24 細胞、Lu-134A 細胞、MS-1 細胞、Lu-165 細胞は Riken Bio Resource Center より購入した。細胞培養に用いた RPMI1640 は Sigma-Aldrich 社、ウシ胎児血清は Gibco 社、75cm² フラスコ、24 穴プレートは、Bio-Rad 社よりそれぞれ購入した。

1.2.2 培養条件

5 継代までの細胞を実験に使用した。細胞培養の培地は RPMI1640 を用い、75cm² フラスコに播種し、10%血清、95% air、5% CO₂、37°C環境下でインキュベータ（池本理化工業株式会社 010-0212AG）を用いて培養した。

1.2.3 継代方法

倒立型培養顕微鏡 (OLYMPUS CK40) で、Lu-24 細胞、Lu-134A 細胞、MS-1 細胞、Lu-165 細胞がコンフルエントになるのを確認してから、細胞と培地との混合液を遠心管に回収し、1000 rpm、5 分間遠心分離を行い、上清を吸引除去し、血清入りの RPMI1640 培地を加え細胞数を 1×10^5 cells/cm² に調製し、75cm² フラスコに播種し、さらにコンフルエントになるまで培養した。培養後、細胞を回収した。

1.2.4 RT-PCR 法

回収した SCLC 細胞から、QIAGEN 社より購入した FastLane Cell cDNA Kit を用い、プロトコルに準じて cDNA を合成した。AVP mRNA の定量は、Applied Biosystems 社より購入した Micro Amp Fast Optical 96-Well Reaction Plate に、Thermo Fisher Scientific 社より購入した Master Mix、RNase-free Water、Gene Assay に合成した cDNA を加え、同社の ABI 7500 FAST リアルタイム PCR システムと AVP mRNA および 18S rRNA 特異的プライマー/プローブを用い測定を行った。AVP mRNA 発現量は、閾値と増幅曲線が交わる点 CT 値を算出し、内在性コントロールである 18S rRNA の発現量で補正し、 Δ CT 値から相対値を算出した。

第3節 実験結果

1.3.1 SCLC 細胞間における AVP mRNA 発現の比較

今回検討した Lu-24 細胞、Lu-134A 細胞、MS-1 細胞、Lu-165 細胞と 4 種の SCLC 細胞を用いて AVP mRNA 発現の比較を行った。最も高発現を示したのは Lu-165 細胞であり、Lu-165 細胞の AVP mRNA 発現を 1 とし相対的な比較を行ったところ、MS-1 細胞では 0.03、Lu-24 細胞、Lu-134A 細胞では 0.003 と AVP mRNA の発現が、Lu-165 細胞に比較しほとんど認められなかった (Fig. 1)。

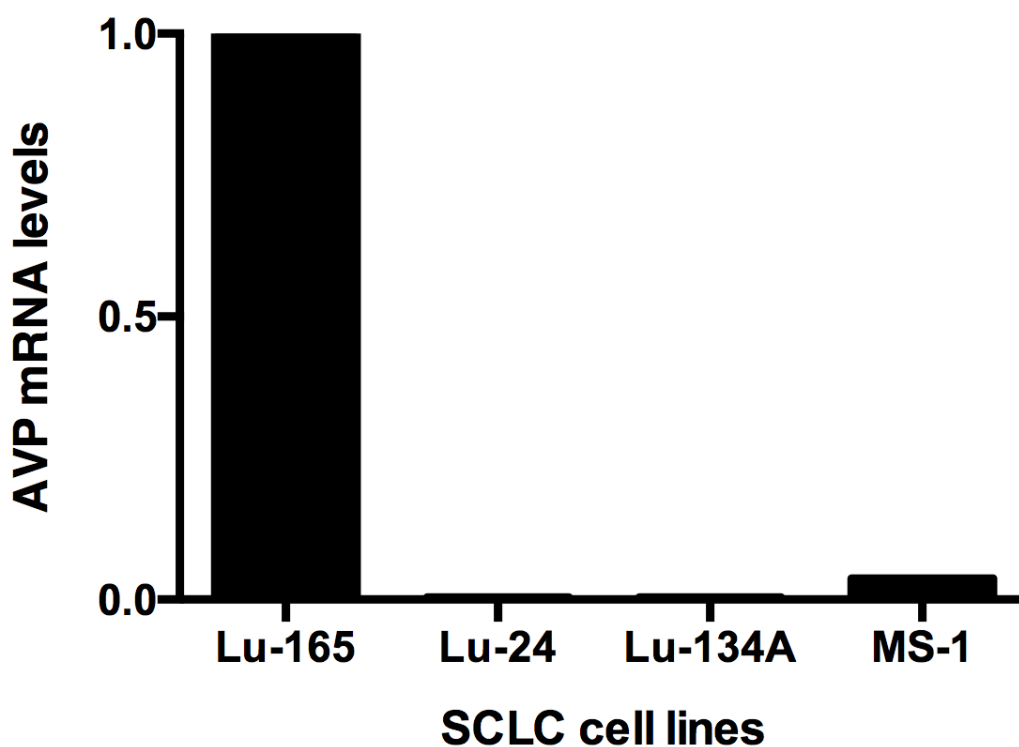


Fig 1. 4 種の SCLC 細胞間における AVP mRNA 発現の比較

4 種の SCLC 細胞 (Lu-24 細胞、Lu-134A 細胞、MS-1 細胞、Lu-165 細胞) を無血清培地下で 48 時間培養後に AVP mRNA 発現レベルを RT-PCR 法で測定した。4 種の SCLC 細胞間での AVP mRNA 発現量の最大量を 1 とし表示した (n=1)

第4節 考察

本章では4種のSCLC細胞であるLu-24細胞、Lu-134A細胞、MS-1細胞、Lu-165細胞を用いて、各細胞におけるAVP mRNA発現をRT-PCR法にて検討した。

今回の結果は、n=1ではあるが、Lu-165細胞におけるAVP mRNA発現が顕著に認められた。MS-1細胞では軽度のAVP mRNAの発現が認められたものの、Lu-24細胞、Lu-134A細胞ではAVP mRNAの発現はほとんど認められなかった。SCLCにおけるAVP mRNAの発現には細胞株間で差が大きいが、今回の結果をそれが裏付けるものとなった。

Lu-165細胞以外の3種のSCLC細胞はAVP遺伝子発現に関する既報を有さなかった。Lu-165細胞については、TerasakiらによってADH産生のSCLCによるSIADHと診断された50歳のインドネシア人男性から確立した細胞株である¹⁷⁾。今回AVP mRNAの高発現が認められたLu-165細胞は、継代後も良好なAVP産生能を維持していることが示唆された。Lu-165細胞以外にも、異所性AVP産生モデル細胞の報告があるが^{18,19)}、良好な異所性AVP産生モデル動物が開発されていない現況では、有用な細胞株である。

以上の結果より以後の実験ではLu-165細胞を用いることとした。

第2章 小細胞肺癌細胞 Lu-165 において PHT が Copeptin 分泌と AVP mRNA 発現に与える影響

第1節 序論

視床下部下垂体後葉の組織レベルで AVP 分泌を PHT が抑制するとしたと報告されているが¹²⁾、SCLC の異所性 AVP 産生・分泌への PHT の影響は明らかとなっていない。

そこで本章では、Lu-165 細胞を用いて PHT 処置による培養液中 Copeptin 濃度の変化、AVP mRNA の変化を検討した。今回、AVP と等モルに分泌され、安定性が高く AVP よりも半減期が長いとされる Copeptin 濃度の測定により AVP の分泌能の評価を試みることにした。

第2節 実験方法

2.2.1 実験用試薬及び実験材料

細胞培養、ウシ胎児血清、75cm² フラスコ、24 穴プレートは、1.2.1 に準じ、PHT は Sigma Chemical 社より購入し、実験に使用した。

2.2.2 培養条件

Lu-165 細胞は、5 継代までの細胞を実験に使用した。他の培養条件は 1.2.2 に準じた。

2.2.3 実験手順

前述の通り Lu-165 細胞を継代し、細胞と培地との混合液を遠心管に回収した。1000 rpm、5 分間遠心分離後、培地を吸引除去し、無血清の RPMI1640 培地を加え、細胞数を 1×10^5 cells/cm² に調製して 24 穴プレートに播種した。24 時間後に終濃度が 5、10、25 µg/mL となるように PHT を添加し、95% air、5% CO₂、37°C の環境下でさらに 48 時間培養した。培養終了後、細胞を含む培養液を回収し、直ちに遠心して培養液と細胞を分離し、測定までそれぞれ -80°C で冷凍保存した。

2.2.4 EIA 法

Copeptin 濃度は、培養液上清 300 µL から C18 SEP-Column により抽出後、既報⁸⁾のごとく EIA キット (Peninsula Laboratories International Incorporation, San Carlos, CA 94070, U.S.A.) を用い、Peninsula Laboratories 社推奨プロトコルに従って行い、Copeptin 値を測定した。

2.2.5 RT-PCR 法

1.2.4 に準じた。

2.2.6 統計学的解析

測定値は、平均値±標準誤差で示した。統計解析は、本実験で得られた Copeptin 値、AVP mRNA 値を対数変換し、一元配置分散分析後、Tukey 検定を行い、P 値 0.05 未満を有意差ありと判定した。統計学的解析には GraphPad Prism 6.0 を用いた。

第3節 実験結果

2.3.1 PHT 処置による培養液中 Copeptin 濃度の変化

PHT 処置による培養液中 Copeptin 濃度を Fig 2 に表した。PHT を無血清下で有効血中濃度を含む 3 濃度 (5、10、25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) で 48 時間処置した結果、Copeptin 濃度は PHT 未処置群では 6.7 ± 0.5 pmol/L、PHT 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 群では、 5.4 ± 0.1 pmol/L、PHT 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 群では 6.6 ± 0.9 pmol/L、PHT 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 群では 3.9 ± 0.3 pmol/L であった。PHT 未処置時に比較し、PHT 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 処置時に Copeptin 濃度の有意な減少 ($P < 0.01$) が認められた (Fig 2)。

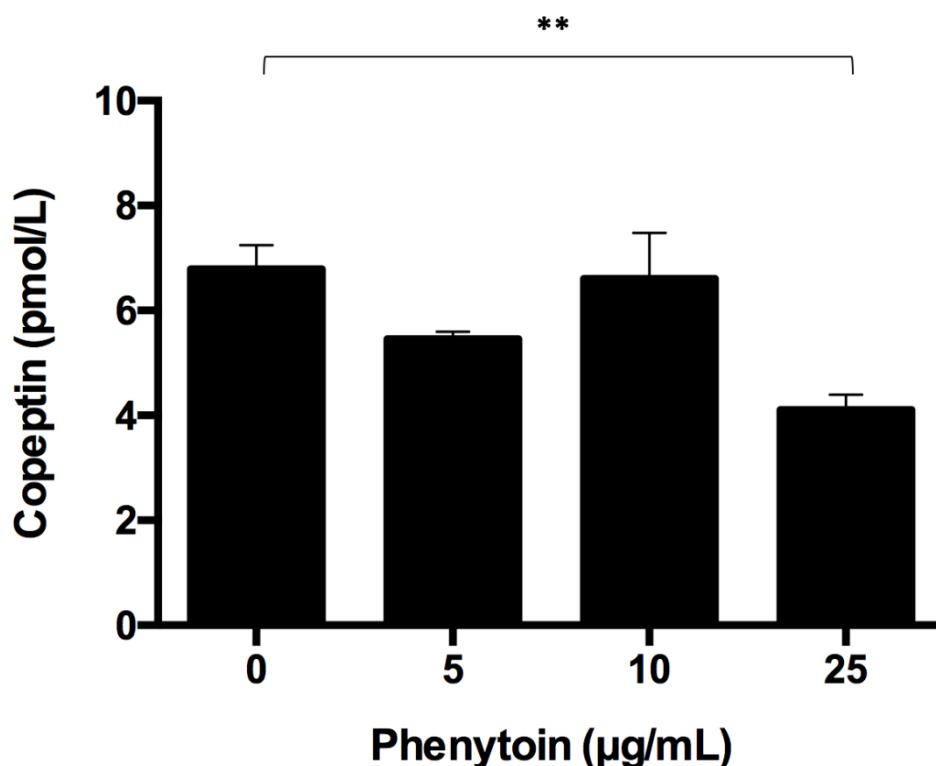


Fig 2. PHT 処置による培養液中 Copeptin 濃度の変化

Lu-165 細胞に PHT をそれぞれ 5、10、25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で無血清培地下 48 時間処置し、培養における Copeptin 濃度を測定した。データは平均値 \pm 標準誤差で表す。** $P < 0.01$ ($n=4$)

2.3.2 PHT 処置による細胞内 AVP mRNA の変化

PHT 処置による細胞内 AVP mRNA の相対的变化を Fig 3 に表した。AVP mRNA は、PHT 未処置群の 1.00 ± 0.36 に比較し、PHT 濃度依存的な減少傾向が認められ、PHT 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 群で 0.13 ± 0.04 まで有意な低下 ($P < 0.01$) を示した (Fig 3)。

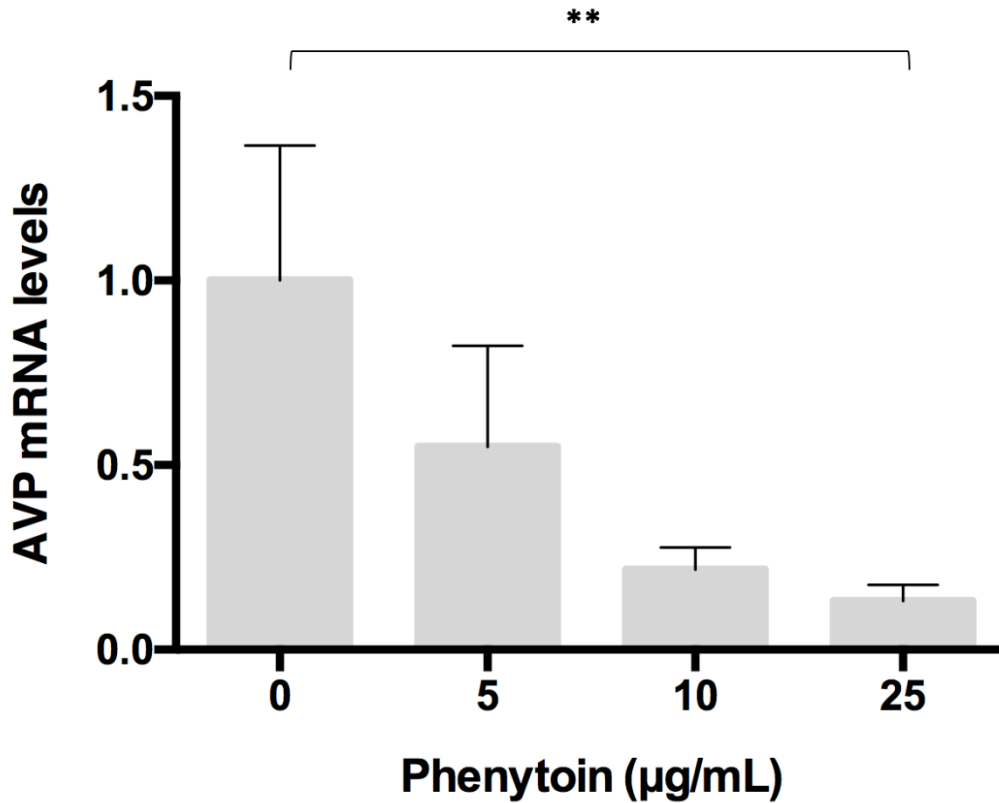


Fig 3. PHT 処置による細胞内 AVP mRNA の変化

Lu-165 細胞に PHT をそれぞれ 5、10、25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で無血清培地下 48 時間処置し、RT-PCR 法で AVP mRNA 遺伝子発現を検出した。データは平均値 \pm 標準誤差で表す。****** $P < 0.01$ ($n=5$)

第4節 考察

これまでPHTは異所性AVP産生神経内分泌細胞において直接的な作用を有するか否か不明であった。今回の結果は、Lu-165細胞がAVP mRNAを発現し、Copeptinを分泌しており、さらに治療域よりもわずかに高い濃度（25 µg/mL）のPHTが細胞内AVP mRNAと培養液Copeptin濃度を減少させることを明らかにした。Guzekらは、ラット下垂体細胞でPHTが40 µg/mLの濃度でAVP放出を抑制することを見出したが¹²⁾、本研究では、より低濃度の25 µg/mLで抑制が認められた。PHTはVGSC拮抗薬であり、興奮性細胞の視床下部下垂体後葉細胞では実際VGSCの発現が見出されている²⁰⁾。

今回の結果は、視床下部下垂体後葉細胞とLu-165細胞における共通のPHT作用機構の存在、すなわち、これまで不明であった非興奮性細胞のSCLCにおけるVGSCとその重要性を示唆するものと考えられる。VGSCはエキソサイトシスに関与することが知られていることから、PHTはVGSCの抑制を介してCopeptin分泌を低下させた可能性が考えられる。またVGSCはMAPKシグナル経路を介して遺伝子発現に影響を与えることが報告されており²¹⁾、PHTによるAVP mRNAの低下はそのような経路を介している可能性が考えられる。ただし、今回見出したLu-165細胞におけるPHTの効果が、他のSCLCやAVP産生腫瘍でも再現されるかは不明である。また、今回は48時間の培養時間での結果であり、興奮性の視床下部下垂体後葉細胞の即時反応性と非興奮性腫瘍細胞とはシグナル伝達を含む作用機序や作用様式が異なる可能性は否定できない。また今回はAVPのLu-165細胞内含有量での検討は行っていないが、培養液中のCopeptin濃度と細胞内AVP mRNAの低下は、AVP細胞内含有量の減少を示唆す

るものと考えられる。

以上の結果から、PHT が異所性 AVP 産生 SCLC に直接的な作用を持ち、Lu-165 細胞では Copeptin 分泌と AVP mRNA 発現を抑制することが明らかとなった。なお、SCLC が Copeptin を分泌することは、今回初めて見出されたものである。

第3章 小細胞肺癌細胞 Lu-165 において高 Na 環境と PHT が Copeptin 分泌と AVP mRNA 発現に与える影響

第1節 序論

視床下部下垂体後葉では血清 Na 濃度の上昇に反応し、AVP の産生と分泌が亢進する。前章では SCLC において AVP 産生・分泌を PHT が抑制した。しかし、SCLC における AVP 産生・分泌におよぼす高 Na 環境の影響と PHT の相互作用については明らかとなっていなかった。

そこで本章では、Lu-165 細胞を用いて高 Na 環境と PHT 処置による培養液中 Copeptin 濃度と AVP mRNA の変化を検討した。

第2節 実験方法

3.2.1 実験用試薬及び実験材料

塩化ナトリウムは Sigma-Aldrich 社から購入し、他は 1.2.1 に準じた。

3.2.2 培養条件

1.2.2 に準じた。

3.2.3 実験手順

1.2.3 に準じ培養後、細胞と培地との混合液を遠心管に回収し、1000 rpm、5 分間遠心分離を行い、培地を吸引除去し、無血清の RPMI1640 培地を加え、24 穴

プレートに播種し、24 時間後に終濃度が 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように PHT を添加した。同時に総 Na 濃度が 10 mEq/L、および 20 mEq/L 上昇するよう NaCl を添加した無血清の RPMI1640 培地に交換し、95% air、5% CO_2 、37°C の環境下で 48 時間処置した。なお、NaCl 添加前の RPMI1640 の Na 濃度は、生化学自動分析装置 (HITACHI LABOSPECT 008) の測定では 139.5 ± 0.1 (n=6) であった。

3.2.4 EIA 法

2.2.4 に準じた。

3.2.5 RT-PCR 法

1.2.4 に準じた。

3.2.6 統計学的解析

測定値は、平均値 \pm 標準誤差で示した。統計解析は、本実験で得られた Copeptin 値、AVP mRNA 値を対数変換し、二元配置分散分析後、対応のある t 検定または Tukey 検定を行い、P 値 0.05 未満を有意差ありと判定した。統計学的解析には GraphPad Prism 6.0 を用いた。

第3節 実験結果

3.3.1 高 Na 環境下 PHT 処置による Copeptin 濃度の変化

高 Na 環境下での PHT 処置による培養液中 Copeptin 濃度を Fig 4 に表した。Copeptin 濃度は、PHT 未処置 Na 非負荷群では 9.2 ± 2.3 pmol/L であったが、PHT 未処置 Na + 10 mEq/L 群では 13.9 ± 1.6 pmol/L まで、Na + 20 mEq/L 群では 17.7 ± 1.2 pmol/L まで Na 濃度依存的に有意に増加した。PHT 処置時には未処置時と比較し、Na 非負荷群で 6.2 ± 2.3 pmol/L であったが、Na + 10 mEq/L 群で 7.8 ± 1.2 pmol/L に、+ 20 mEq/L 群で 9.6 ± 1.6 pmol/L に Copeptin 濃度は有意に減少した (Fig 4)。

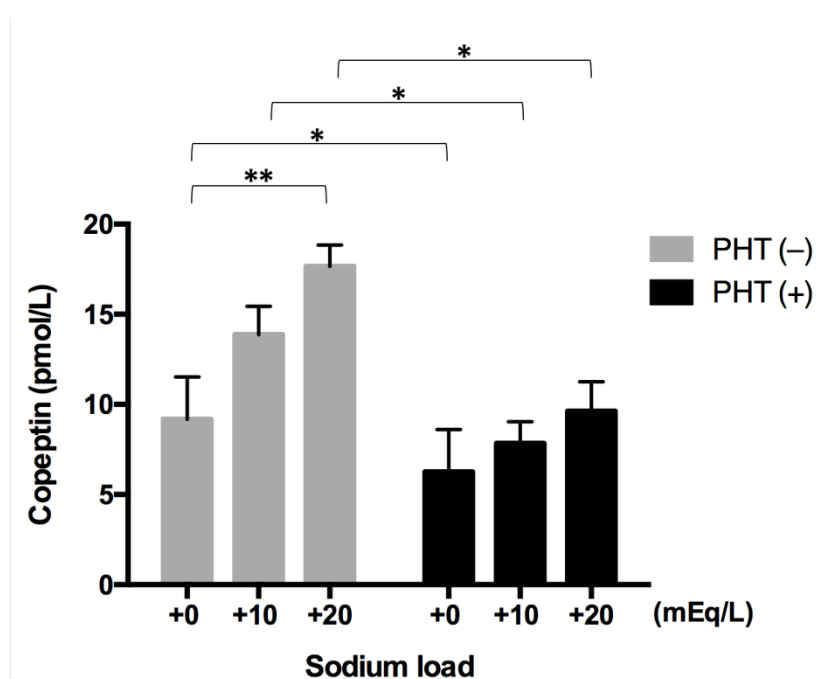


Fig 4. 高 Na 環境下 PHT 処置による Copeptin 濃度の変化

Lu-165 細胞に高 Na 環境下で PHT を 25 μ g/mL の濃度で無血清培地下 48 時間処置し、培養における Copeptin 濃度を測定した。データは平均値 \pm 標準誤差で表す。* P < 0.05、** P < 0.01

(n=4)

3.3.2 高 Na 環境下 PHT 処置による細胞内 AVP mRNA の変化

高 Na 環境下での細胞内 AVP mRNA の変化を Fig 5 に表した。

PHT 未処置 Na 非負荷群の AVP mRNA 発現を 1 とし相対的な比較を行ったところ、AVP mRNA は、PHT 未処置 Na 非負荷群の 1.00 ± 0.79 と比較し、Na + 10 mEq/L 群では 0.70 ± 0.35 、Na + 20 mEq/L 群では 1.05 ± 0.86 と Na 負荷による影響は見られなかった。PHT 処置時には、AVP mRNA 発現は Na 非負荷群では 0.46 ± 0.34 、Na + 10 mEq/L 群では 0.40 ± 0.22 で PHT 未処置時と比較し AVP mRNA 発現量の有意な減少 ($P < 0.05$) が認められた (Fig 5)。

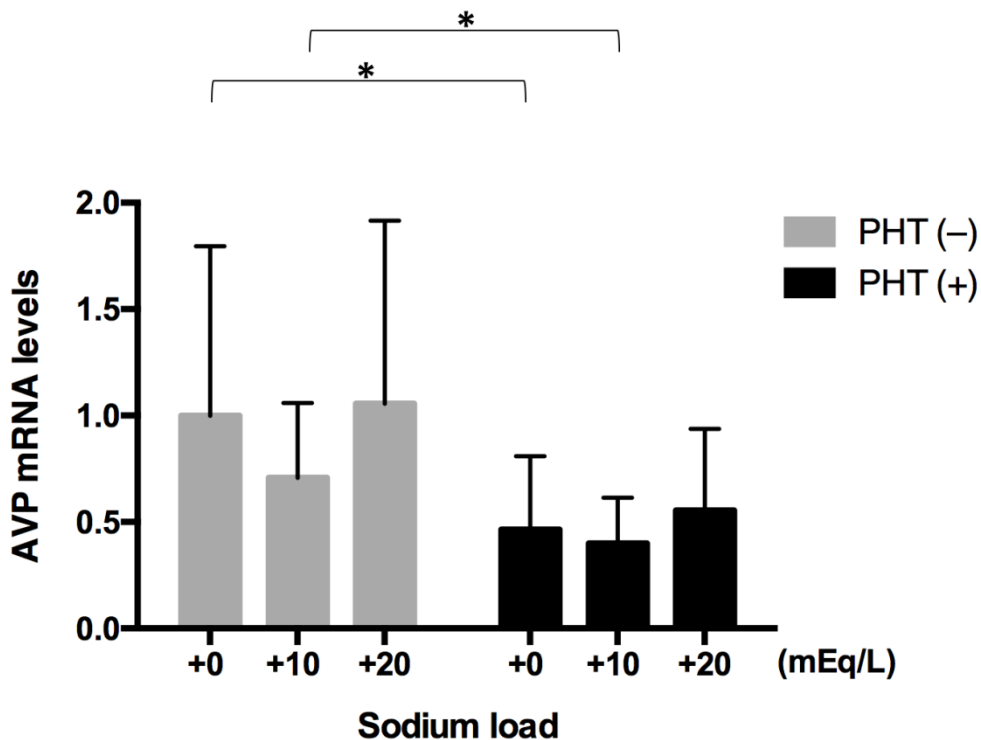


Fig 5. 高 Na 環境下 PHT 処置による細胞内 AVP mRNA の変化

Lu-165 細胞に高 Na 環境下で PHT を $25 \mu\text{g/mL}$ の濃度で無血清培地下 48 時間処置し、RT-PCR 法で AVP mRNA 遺伝子発現を検出した。データは平均値 \pm 標準誤差で表す。* $P < 0.05$ (n=6)

第4節 考察

SCLCにおけるAVP産生・分泌に対するPHTの高Na環境の影響は、不明であった。

今回、Lu-165細胞において高Na環境下では、Na濃度依存的にCopeptin分泌が増加した一方で、AVP mRNA発現はほとんど影響を受けなかった。このLu-165細胞のNa感受性においてAVP mRNA発現とCopeptin分泌に関し乖離が見られたことは、Lu-165細胞ではAVPの産生と分泌の制御機構に差異のある可能性を示唆する。視床下部下垂体後葉では、AVPの産生と分泌は視床下部の浸透圧受容体による制御をうけており、高Na環境が興奮分泌連関を介してAVP分泌を刺激することはよく知られている²²⁾。しかし、SCLCにおいては、高Na環境のエクソサイトーシスへの影響に関しては明らかとなっていなかった。

Lu-165細胞のCopeptin分泌はPHTに感受性を有するが、Na負荷時においてもこの感受性は影響を受けなかった。したがって、Lu-165細胞のCopeptin分泌におけるNa感受性には、VGSCを介するNaの移動が関与し、視床下部下垂体後葉系のAVP分泌に近いメカニズムが重要であることが示唆される。

今回、PHTによるLu-165細胞におけるAVP mRNAの発現抑制は、高Na環境では消失した。これは、PHTが高Na環境でのNa移動を抑制できなかったことによるものかもしれない。いずれにしても、非興奮性細胞におけるVGSCの発現と機能は今後の大きな課題である。

正所性であれ異所性であれ、低Na環境でのAVP産生・分泌はSIADHで見られる病態に近いところから、高Na環境とともに低Na環境のSCLCにおけるAVP産生・分泌に及ぼす影響は、非常に興味深い。ただし、低Na環境の実験には専

用の培養液が必要となるため、今回は高 Na 環境での検討にとどまったものであり今後の検討を必要とする。

以上の結果から Lu-165 細胞における Copeptin 分泌は高 Na 環境下でも PHT による抑制が認められ、Lu-165 細胞の PHT 感受性分子群は創薬のターゲットになる可能性がある。一方、Lu-165 細胞の PHT による AVP mRNA の発現抑制には高 Na 環境は適さない恐れがあり、今後低 Na 環境も含めた詳細な検討を要する。

第4章 小細胞肺癌細胞 Lu-165 における5つのVGSCサブユニット遺伝子発現の比較とSCN3A mRNA発現に与える高Na環境とPHTの影響

第1節 序論

VGSCは9種の24回膜貫通型 α サブユニット、5種の1回膜貫通型 β サブユニットが報告されている。乳癌細胞や前立腺癌細胞などの非興奮性細胞においても、SCN3A、SCN5AなどのVGSCサブユニットの発現が報告されてきている^{18,19)}。しかし、SCLCにおいてVGSCサブユニットが発現しているか今まで報告がなかった。

本章では、PHTの詳細な作用点の探索を目的に、悪性腫瘍で発現の報告されているVGSCの α サブユニットSCN3A、SCN5A、SCN8A、SCN9A、 β サブユニット $\beta 1$ を選択し、Lu-165細胞における遺伝子発現を検討した。併せてVGSCで高発現を示したサブユニットに関し、高Na環境下でPHTがどのように作用するかについても検討した。

第2節 実験方法

4.2.1 実験用試薬及び実験材料

3.2.1に準じた。

4.2.2 培養条件

1.2.2に準じた。

4.2.3 実験手順

2.2.3 と 3.2.3 に準じた。

4.2.4 RT-PCR 法

β 1 mRNA、SCN3A mRNA、SCN5A mRNA、SCN8A mRNA、SCN9A mRNA にそれぞれ特異的なプライマー/プローブを用い測定を行った。

β 1 mRNA、SCN3A mRNA、SCN5A mRNA、SCN8A mRNA、SCN9A mRNA 発現量は、CT 値を算出し、18S rRNA の発現で補正し、 Δ CT 値から相対値を算出した。

4.2.5 統計学的解析

測定値は、平均値 \pm 標準誤差で示した。統計解析は、本実験で得られた β 1 mRNA、SCN3A mRNA、SCN5A mRNA、SCN8A mRNA、SCN9A mRNA 値は、対数変換し、一元配置分散分析後、Tukey 検定を行った。高 Na 環境下の PHT 処置で得られた SCN3A mRNA 値は、対数変換し、二元配置分散分析後、対応のある t 検定と Tukey 検定を適宜行った。それぞれ P 値 0.05 未満を有意差ありと判定した。統計学的解析には GraphPad Prism 6.0 を用いた。

第3節 実験結果

4.3.1 VGSC サブユニット遺伝子発現の比較

Lu-165 細胞における SCN3A、SCN5A、SCN8A、SCN9A、 $\beta 1$ 各 mRNA 発現は、SCN3A mRNA が最も高発現を示した。SCN3A mRNA (1.00 ± 0.12) の発現量を 1 とし他の VGSC mRNA と相対的な発現量を比較した結果を Fig 6 に表した。

Lu-165 細胞では今回検討した 5 つの VGSC サブユニットがすべて発現を認め、最も発現が低かったのは SCN5A (0.19 ± 0.04) だった (Fig 6)。

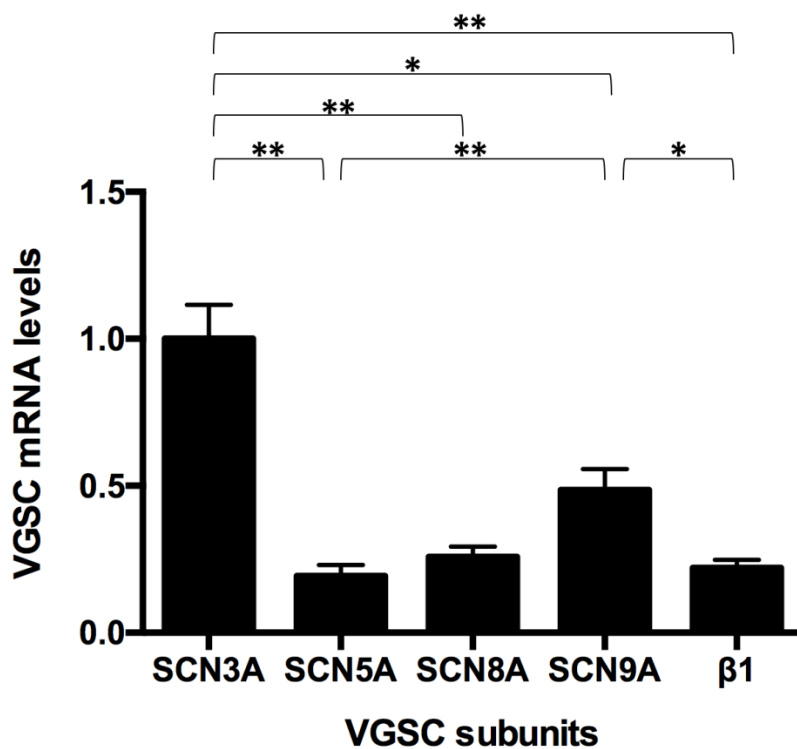


Fig 6. Lu-165 細胞における VGSC mRNA 発現の比較

Lu-165 細胞を無血清培地下で 48 時間後に VGSC サブユニット発現レベルを RT-PCR 法で検出した。SCN3A mRNA 発現量を 1 とし、他の VGSC mRNA 発現量を比較表示した。* $P < 0.05$ 、

** $P < 0.01$ (n=6)

4.3.2 高 Na 環境下 PHT 処置による SCN3A mRNA の変化

4.3.1 より、高 Na 環境下での PHT 処置による細胞内 SCN3A mRNA の変化を Fig 7 に表した。

PHT 未処置 Na 非負荷群の SCN3A mRNA 発現を 1 とし、相対的な比較を行ったところ、SCN3A mRNA は PHT 未処置 Na 非負荷群での 1.00 ± 0.79 と比較し、Na + 10 mEq/L 群で 1.30 ± 0.07 、Na + 20 mEq/L 群で 1.00 ± 0.03 と Na 負荷による影響は見られなかった。PHT 処置時は未処置時と比較し、Na + 10 mEq/L 群で 0.60 ± 0.03 、+ 20 mEq/L 群で 0.56 ± 0.01 で SCN3A mRNA 発現量の有意な減少が認められた (Fig 7)。

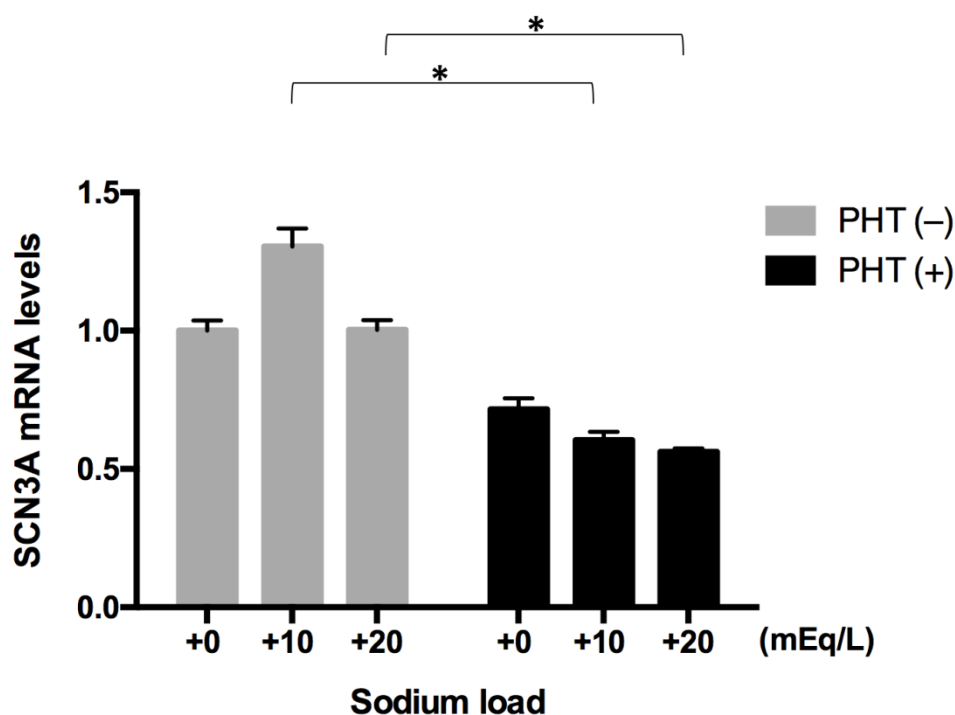


Fig 7. 高 Na 環境下 PHT 処置による SCN3A mRNA の変化

Lu-165 細胞に高 Na 環境下で PHT を 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で無血清培地下 48 時間処置し、RT-PCR 法で SCN3A mRNA 遺伝子発現を検出した。* $P < 0.05$ (n=6)

第4節 考察

これまで、SCLCにVGSCサブユニットが発現しているか不明であった。今回、Lu-165細胞における5つのVGSCサブユニット($\beta 1$ 、SCN3A、SCN5A、SCN8A、SCN9A)遺伝子発現を検討したところ、すべてのサブユニットが発現していたが、SCN3A mRNAが最も高発現を示した。さらに、SCN3A mRNAはPHTにより高Na環境下で抑制されたことから、PHTの作用ターゲットのひとつである可能性が高いと考えられた。PaulらはSCN3Aを高発現させたCHO細胞でPHT処置がNa電位を抑制することを見出した¹⁵⁾。したがって、Lu-165細胞のNa負荷とPHTに対する感受性には、少なくともSCN3Aが関与している可能性が示唆される。

なお、本研究では今回、Lu-165細胞における細胞生存率に対するPHT処置と高Na環境の影響を検討していないため、細胞生存率とAVP産生・分泌との関連については不明である。また、今回検討しなかった残りのVGSCサブユニットの重要性についても検討の余地がある。さらに、PHT処置と高Na環境下のNaイオンの動態や細胞の電位変化の解析による裏付けも重要と考えられる。VGSCには多型が多いため、Lu-165細胞においてSCN3Aを始めとするVGSCサブユニット多型およびノックダウンによる解析も、PHT感受性との関連で重要と思われる。なお、本研究で主として使用したPHT濃度は、25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であり治療域よりわずかに高い。よってLu-165細胞におけるAVP遺伝子発現と分泌に関しては、PHTのVGSC抑制以外の機序を介する可能性を完全には否定できない。

総括

本研究において、以下の結論を得た。

1. Lu-165 細胞は AVP mRNA を発現し Copeptin を分泌した。
2. PHT は、Lu-165 細胞において直接的に AVP 遺伝子発現と Copeptin 分泌の減少をもたらした。
3. Lu-165 細胞における AVP 遺伝子発現は高 Na 環境に反応しないが、Copeptin 分泌は高 Na 環境で亢進した。PHT は高 Na 環境下の AVP 遺伝子発現を抑制しなかったが、Copeptin 分泌を抑制した。
4. Lu-165 細胞では 5 つの VGSC サブユニット β 1、SCN3A、SCN5A、SCN8A、SCN9A の遺伝子発現が認められ、SCN3A の発現が最も高かった。
5. Lu-165 細胞における SCN3A mRNA の発現は高 Na 環境に反応しないが、PHT により高 Na 環境下の SCN3A mRNA の発現が抑制された。

これらの結果は、Lu-165 細胞において VGSC が AVP mRNA の発現と Copeptin の分泌に重要な役割を果たしている可能性が考えられるものである。したがって、Lu-165 細胞における VGSC に関連する PHT 感受性分子は異所性 AVP 産生腫瘍の創薬ターゲットになり得る可能性がある。今後、PHT 作用点のより詳細な探索を通じ、AVP 産生における PHT 感受性のメカニズムを標的にした創薬を目指したい。

謝辞

本研究を遂行し学位論文をまとめるに当たり、終始懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました、明治薬科大学薬効学研究室 教授 庄司 優 先生に深く感謝申し上げます。

本論文作成に際し、懇切なる御指導、御教鞭を賜りました、明治薬科大学学生体機能分析学研究室 教授 兎川 忠靖 先生、同大学生化学研究室 教授 紺谷 圏二 先生に深く感謝致します。

本研究の遂行に当たり、貴重な御指導、御助言を賜りました、明治薬科大学薬効学研究室 准教授 三田 充男 先生、同大学薬効学研究室 准教授 菱沼 滋 先生、同大学臨床薬剤学研究室 准教授 野澤 玲子 先生に心より感謝申し上げます。

本研究を進めるに当たり、多くの御協力を頂きました、明治薬科大学薬効学研究室 学部生の皆様に心より御礼申し上げます。

明治薬科大学大学院研究科薬学専攻在学中にあたりまして、本研究にご理解ご協力を賜りました、国立研究開発法人国立がん研究センター東病院 薬剤部 薬剤部長 山口 正和 先生、国立研究開発法人国立がん研究センター東病院 薬剤部 前薬剤部長 齋藤 真一郎 先生、独立行政法人地域医療機能推進機構 東京城東病院 薬剤科長 谷島 秀樹 先生、医療法人社団康心会 康心会 汐見台病院 薬剤科長 伊藤 博之 先生に感謝申し上げます。

参考文献

- 1) 厚生労働省, 平成 27 年人口動態統計月報年計(概数)の概況, 2016, pp. 10-13.
- 2) 清水英治, 山本晃義, 日本内科学会雑誌, 88, 152-159 (1999).
- 3) Andrew J. G., Seth M. S., J. Garrett R., David P. B. Jr., John B., Phong T. L., Alfreda S., Ruby P., James L. M., Daniel C. I., Bruce E. J., *Cancer. Res.*, 53, 67-74 (1993).
- 4) 山本信之, 赤松広朗, 宿谷威仁, 三浦理, 釧持広知, 新版肺癌内科診療マニュアル, 医薬ジャーナル社, 東京, 2015, pp. 281-284.
- 5) 村瀬孝司, 医学のあゆみ, 247, 537-541 (2013).
- 6) Edward S., Desmond C., James B., *J. Biol. Chem.*, 260, 10236-10241 (1985).
- 7) Nils G. M., Joachim S., Christine A., Andreas B., *Clin. Chem.*, 52, 112-119 (2006).
- 8) Iwashita N., Nara N., Sato R., Nakatogawa T., Kobayashi S., Zama S. Mita M, Hishinuma S, Shoji M., *Tohoku. J. Exp. Med.*, 239. 213-221 (2016).
- 9) Wang C. B., Zong M., Lu S. Q., Tian Z., *J. Diabetes. Complications.*, 30, 1532-1536 (2016).
- 10) Alan M., Christian M., Sean-Xavier N., Robert H. C., Nils G. M., James M., Richard M. N., Gary V., Lori B. D., Judd E. H., Fred S. A., Chad C., John T. N., Donald S., Christopher d., Christopher H., Deborah B. D., John C. S., Gary H., Alexander T. L., Inder A., Alan H. B. W., Jana P., Oliver H., Stefan E., Paul C., Allan S. J., W. Frank P., *J. Am. Coll. Cardiol.*, 62, 150-160 (2013).
- 11) 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業 間脳下垂体機能

障害に関する調査研究班, バゾプレシン分泌過剰症 (SIADH) の診断と治療の手引き, 2010, pp. 1-2.

12) Guzek J. W., Russel J. T., *Acta. Pharmacol. Toxicol. (Copenh).*, 341-344 (1974).

13) 大日本住友製薬, アレビアチン注 250mg 添付文書, 2015, pp. 1-5.

14) Kruger L.C., Isom L. L., *Cold. Spring. Harb. Perspect. Biol.*, 8,6 (2016).

15) Lucas P. T., Meadows L. S., Nicholls J., Ragsdale D. S., *Epilepsy. Res.*, 64, 77-84 (2005).

16) Ming Y., David J. K., Lindsey A. W., Rohan M., Jeffrey D. C., *Breast. Cancer. Res. Treat.*, 134, 603-615 (2012).

17) Terasaki T., Matsuno Y., Shimosato T., Yamaguchi K., Ichinose H., Nagatsu T., Kato K., *Jpn. J. Cancer. Res.*, 85, 718-722 (1994).

18) Verbeeck M.A., Sutanto W., Burbach J.P., *Mol. Endocrinol.*, 6, 795-801(1991).

19) Ishibashi M., Fujisawa M., Furue H., Maeda Y., Fukayama M., Yamaji T., *Cancer. Res.*, 13, 3442-3446(1994).

20) Tanaka M., Cummins T. R., Ishikawa K., Black J. A., Ibata Y., Waxman S.G., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 96, 1088-1093 (1999).

21) Carrie D. H., Bi-Dar W., Kristin C., Russell W., May S., Jacqueline O., Vyomesh P., Daniel T. B., Christina M. A., J. Silvio G., Tim G. H., Norman H. L., *Sci Rep*, 5, 1-16(2015).

22) Kimura T., Abe K., Ota K., Omata K., Shoji M., Kudo K., Matsui K., Inoue M., Yasujima M., Yoshinaga K., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 5, 1003-1010 (1986).