

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

【背景】 小細胞肺癌（以下 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。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。

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臨床上重要である。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、その一つ AVP 分泌過剰症（以下 SIADH）は低 Na 血症を引き起こす。

AVP の下垂体後葉（正所性）からの分泌は、生理的に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神経分泌ニューロンが刺激されて亢進する。これに対し、腫瘍からの異所性分泌は、浸透圧などの調節を受けない自律性で、正所性分泌の 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、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 となり、AVP と Copeptin が等モルで下垂体後葉から分泌される。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でき、様々な疾患の予後予測マーカーとして注目されている。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、低 Na 血症の改善を目指したものである。AVP の過剰を改善する薬剤は、現時点で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フェニトイン（以下 PHT）が知られていた。PHT の投与で低 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。vitro においても、AVP 分泌を PHT が抑制したと報告がある。よって、PHT は下垂体の AVP 産生・分泌を抑制する可能性が高いが、SCLC における異所性 AVP 分泌を PHT が抑制するか不明であった。

PHT が作用する電位依存性 Na チャネル（以下 VGSC）は 9 種の α サブユニット、5 種の β サブユニットが現在まで同定されているが、SCLC における VGSC の発現は報告がなく、SCLC での PHT の作用の有無および機序も不明であった。

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 は Copeptin を分泌することを確かめ、次に PHT が SCLC における Copeptin 分泌と AVP mRNA の発現および抑制するか否かを検討する。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。

【方法】 SCLC 細胞は Lu-165 細胞、Lu-24 細胞、Lu-134A 細胞、MS-1 細胞を用い、細胞培養の培地としては RPMI1640 を使用し、95% air、5% CO₂、37°C 環境下で培養した。Copeptin 濃度は、培養液上清 300 μ L から C18 SEP-Column により抽出後、EIA キットを用い、Peninsula Laboratories 社推奨プロトコルで測定した。AVP、VGSC サブユニットの mRNA 発現量は、回収した SCLC 細胞から、FastLane Cell cDNA Kit を用い、cDNA を合成した。Micro Amp Fast Optical 96-Well Reaction Plate に Master Mix, RNase-free Water, Gene Assay に合成した cDNA を加

え、ABI 7500 FAST リアルタイム PCR システムと測定目的の mRNA および 18S rRNA 特異的プライマー/プローブを用い、Threshold Cycle (以下 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。

統計解析：測定値は、平均値±標準誤差で示した。Copeptin 値、AVP mRNA 値は対数変換し、一元配置分散分析後、Tukey 検定および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。

1. SCLC 細胞間における AVP mRNA 発現の比較

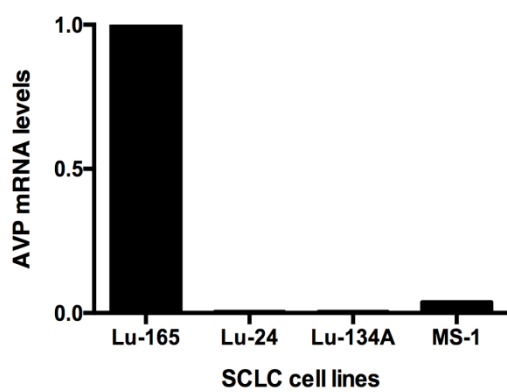


Fig 1 4 種の SCLC 細胞間における AVP mRNA 発現の比較(n=1)

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。最も高発現となったのは Lu-165 細胞で、Lu-165 細胞の AVP mRNA 発現量を 1 とした相対的な比較では、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 細胞と比較しほとんど認められなかった (Fig.

1)。したがって、以後の検討には Lu-165 細胞を用いることとした。

2. 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

PHT を 3 濃度 (5、10、25 μ g/mL) で無血清下 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 μ g/mL 群では、 5.4 ± 0.1 pmol/L、

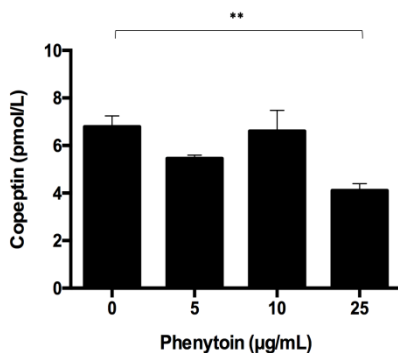


Fig 2 PHT 処置による Copeptin 濃度の変化(n=4)

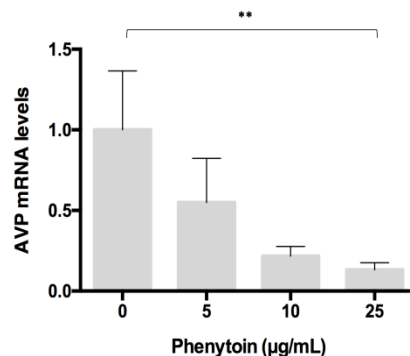


Fig 3 PHT 処置による細胞内 AVP mRNA の変化(n=5)

PHT 10 μ g/mL 群では 6.6 ± 0.9 pmol/L、PHT 25 μ g/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 μ g/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)。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)。

3. 高 Na 環境下 PHT 処置(25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)による Copeptin 濃度、細胞内 AVP mRNA の変化

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、Na +20 mEq/L 群では 17.7 ± 1.2 pmol/L と Na 濃度依存的に有意に増加した。PHT 処置時には、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)。AVP mRNA は、PHT 未処置 Na 非負荷群の発現を 1 とし相対的な比較を行ったところ、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 負荷の影響は見られなかった。PHT 処置時は、PHT 未処置時と比較し Na 非負荷群で 0.46 ± 0.34 、Na + 10 mEq/L 群では 0.40 ± 0.22 と AVP mRNA 発現量の有意な減少 ($P < 0.05$) が認められた (Fig 5)。

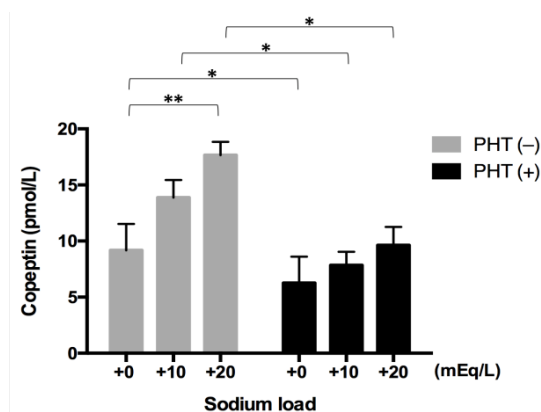


Fig 4 高 Na 環境下 PHT 処置による Copeptin 濃度の変化(n=4)

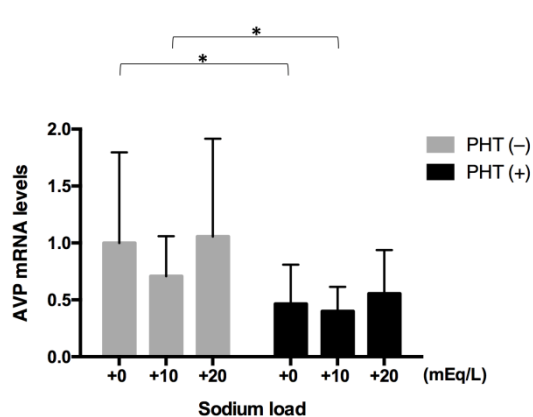


Fig 5 高 Na 環境下 PHT 処置による細胞内 AVP mRNA の変化(n=6)

4. 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

Lu-165 細胞において今回検討した 5 つの VGSC サブユニットがすべて発現しており、SCN3A mRNA で最も高発現が認められた。SCN3A mRNA (1.00 ± 0.12)

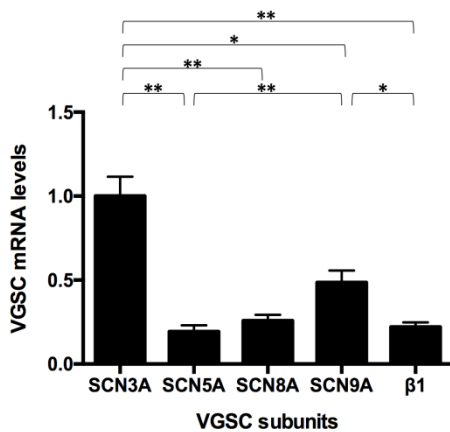


Fig 6 Lu-165 細胞における VGSC mRNA 発現の比較(n=6)

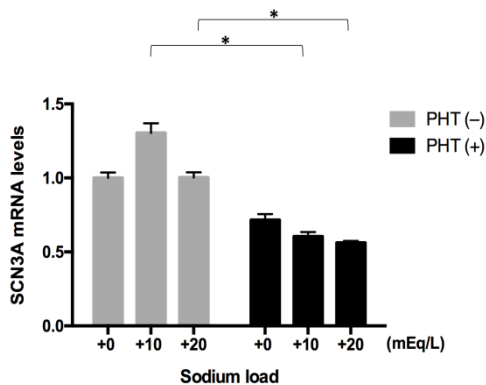


Fig 7 高 Na 環境下 PHT 処置による SCN3A mRNA の変化(n=6)

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ところ、最も発現が低かったのは SCN5A (0.19 ± 0.04) だった (Fig 6)。そこで、高 Na 環境下での PHT 処置による細胞内 SCN3A mRNA の変化を検討した。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、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、Na + 10 mEq/L 群で 0.60 ± 0.03 、+ 20 mEq/L 群で 0.56 ± 0.01 と SCN3A mRNA 発現量の有意な減少が認められた (Fig 7)。

【考察】 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不明であった。今回、Lu-165 細胞が AVP mRNA を発現し Copeptin を分泌しており、さらに治療域よりわずかに高い濃度の PHT が細胞内 AVP mRNA と培養液 Copeptin 濃度を減少させることも明らかになった。これまで SCLC における AVP 産生・分泌に対する PHT の高 Na 環境下での影響についても不明であった。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・産生が増加した一方で、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。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。よって、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、視床下部脳下垂体系の 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。

これを前提に推論すれば Lu-165 細胞における Copeptin 分泌の PHT 感受性分子群が AVP 分泌調節の創薬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 環境は適さないと思われ、今後低 Na 環境も含めた詳細な検討を要する。また、SCLC では VGSC サブユニットが発現しているか不明であったが、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、特に SCN3A mRNA が最も高発現を示した。この 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考えられた。なお今回の研究では、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 サブユニット多型の解析も、PHT 感受性との関連で必須である。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検討する必要がある。

【総括】 今回の結果は、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ことを強く示唆するものである。今後 PHT 作用点のより詳細な探索が必要であるが、Lu-165 細胞における PHT 感受性分子は異所性 AVP 産生の創薬ターゲットになり得る可能性がある。

《参考文献》

- 1) Ohta T., Mita M., Hishinuma S., Ishii-Nozawa R., Takahashi K., Shoji M., *Frontiers in Endocrinology.*, doi: 10.3389/fendo.2017.00094