

## シスプラチン耐性細胞におけるメタロチオネイン遺伝子の発現と 細胞内在性金属の関与

田 和 理 市, 立 花 陽 子, 堀 部 紗 世  
(広島国際大薬学部・薬物生体分析学\*)

### **Metallothionein Gene Expression in the Cisplatin Resistant Cells and the Effect of Cellular Endogeneous Metal**

Riichi TAWA, Yoko TACHIBANA and Sayo HORIBE

*Laboratory of Medicinal and Biochemical Analysis, Faculty of Pharmaceutical Science,  
Hiroshima International University*

#### Summary

It has been reported that the cellular  $\text{Cu}^{2+}$  ion and metallothionein (MT) expression contribute to the acquisition of cisplatin (CDDP)-resistance phenotype in the tumor cells. However, the mechanism of cellular MT induction by CDDP has not been clear. Previously, we reported that the nuclear proteins prepared from HeLa cells with the elevated MT level after treatment of 12-*O*-tetradecanoyl phorbol-13-acetate (TPA) or the tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) bind to the metal responsive elements (MREs) as the regulatory DNA sequences in human MT-IIA gene promoter, in the presence of  $\text{Cu}^{2+}$  ion. In this study, the copper effect on binding of MREs to the nuclear proteins extracted from CDDP-resistant HeLa cells which were maintained for 3 months in Dulbecco's modified Eagle (DMEM) medium supplemented with 10 % FBS and 1  $\mu\text{M}$  or 5  $\mu\text{M}$  CDDP. The expression level of MT-IIA mRNA in CDDP-resistant cells was compared with that of the normal HeLa cells, the resistant cells expressed more MT-IIA mRNA than the HeLa cells. The plasmid constructed the human MT-IIA promoter gene in puC19 were digested with the restriction enzymes. The bindings of linear DNA fragments produced by the enzyme digestion to the nuclear extracts prepared from the CDDP-resistant cells or the cells treated with 1  $\mu\text{M}$  CDDP for 1 h in the presence of  $\text{Cu}^{2+}$  ion, was examined by the gel-mobility shift assay. It was suggested that  $\text{Cu}^{2+}$  ion may play an important role in the binding of the proteins in nuclear extracts prepared these cells to 3'-end DNA fragments of MRE<sub>d</sub>.

抗腫瘍性白金錯体であるシスプラチン (CDDP) は固形ガンの治療に用いられている。しかし、治療中に耐性が生じ、CDDPの治療効果を著しく低下させることが問題となっている<sup>1, 2)</sup>。現在、ガン細胞のCDDPに対する耐性獲得には重金属を解毒するメタロチオネイン (MT) の発現誘導が関与すると考えられているが、CDDPによるMTの発現誘導メカニズムについては明らかでない。一方、MT遺伝子の5'上流のプロモーター領域の解析から、重金属依存性の転写制御を担うDNA配列 (Metal responsive elements, MREs) が複数個 (MRE<sub>a</sub>~MRE<sub>g</sub>) 存在することが証明された<sup>3)</sup>。また我々は、ヒトMT-IIAを高発現誘導したHeLa細胞から抽出した核タンパク質中に、 $\text{Cu}^{2+}$ に対して濃度依存的にMREsと結合するタンパク質を検出し<sup>4)</sup>、細胞内の $\text{Cu}^{2+}$ がMTの発現誘導に関係する知見を得た。また、CDDP投与により血清中の $\text{Cu}^{2+}$ 濃度が変化することが報告されている<sup>5)</sup>。これらのことより、CDDPによる耐性獲得には $\text{Cu}^{2+}$ の関与する

\*所在地：広島県呉市広古新開5-1-1 (〒737-0112)

可能性が考えられた。そこで本研究では、CDDPに対して耐性を獲得したHeLa細胞からの抽出核タンパク質とMREsとの結合においてCuが関与するかどうかについて検討した。

## 実験方法

### 1. 細胞

ヒト子宮頸がん由来HeLa細胞はDMEM (10% FBS) を用いて培養した。1  $\mu$ M CDDPを1時間時暴露した細胞、および1  $\mu$ Mまたは5  $\mu$ M CDDPを含むDMEM中で3ヶ月間細胞を培養し、CDDP存在下で増殖する細胞株 (1  $\mu$ M または5  $\mu$ M HeLa/CDDP) をCDDP耐性細胞として用いた。

### 2. 細胞増殖阻害実験

HeLaおよび1  $\mu$ Mおよび5  $\mu$ M HeLa/CDDP耐性細胞に対するCDDPの細胞増殖抑制作用は、CDDP添加72時間後の生細胞をWST-1法を用いて測定することにより評価した。

### 3. プラスミド

ヒトMT-IIAプロモーター遺伝子 (845 bp) を含むプラスミド (3495 bp) を構築し (pKB8), 大腸菌DH5 $\alpha$ に導入したのからGenElute<sup>TM</sup> Plasmid Maxpre Kit (Sigma) を用いて精製した。

### 4. 核タンパク質

細胞からの核タンパク質はNuclear Extract Kit (Active Motif) を用いて調製した。タンパク質濃度はBradford protein assayを用いて算出した。

### 5. ゲルシフト法

pKB8を*Bst*X Iにより消化し、脱酵素・脱塩して直鎖pKB8を作成した。次に、直鎖pKB8を種々の制限酵素で消化断片化して、脱酵素・脱塩したものに、HeLa細胞核タンパク質とそれぞれ0, 100, 250, 500, 1000, 2000  $\mu$ M CuCl<sub>2</sub>溶液の存在下、反応液 (6 mMリン酸緩衝液pH 7.4, 10% Glycerol, 1 mM DTT, 0.05 mg/mL BSA, 2 mM MgCl<sub>2</sub>) を加えて、37 $^{\circ}$ C, 20分間反応した。反応後の核タンパク質-DNA複合体の生成は、0.8%アガロースゲル電気泳動にて観察した。

### 6. MT-IIA mRNA発現量

各細胞からGenElute<sup>TM</sup> Mammalian Total RNA Kit (Sigma-Aldrich) を用いて、全RNAを抽出した。その後、MT-IIAのmRNA発現量は、RT-PCR法により評価した。なお、PCRで使用したプライマー配列は、Table 1に示す通りである。

**Table 1** Gene-specific oligonucleotide as PCR primers

| Gene                     | Forward Primer           | Reverse Primer              | Base Pair <sup>a)</sup> | Reference |
|--------------------------|--------------------------|-----------------------------|-------------------------|-----------|
| MT-IIA                   | 5'-ccgactctagccgctctt-3' | 5'-gtggaagtcgcgttctttaca-3' | 240 - 473               | (5)       |
| $\beta_2$ -microglobulin | 5'-acccactgaaaaagatga-3' | 5'-atcttcaaacctccatgatg-3'  | 303 - 418               | (6)       |

<sup>a)</sup>Area amplified are referred to the sequences deposited at GenBank with accession numbers as follows:  
NM005953  
MT-IIA) and BC032589 ( $\beta_2$ -microglobulin)

## 結果と考察

本研究では、まずHeLaおよびHeLa/CDDP細胞増殖に対するCDDPの阻害効果について検討した。HeLa細胞、1  $\mu$ Mおよび5  $\mu$ M HeLa/CDDP耐性細胞の50%細胞増殖阻害濃度 (IC<sub>50</sub>値) は、それぞれ0.37  $\mu$ M, 7.08  $\mu$ Mおよび16.2  $\mu$ Mであった。また、1  $\mu$ Mおよび5  $\mu$ M HeLa/CDDP耐性細胞におけるHeLa細胞に対する相対的なCDDP耐性は、それぞれ19.1倍および43.8倍であった (Table 2)。

CDDP耐性細胞におけるMT-IIA mRNAの変化について、RT-PCR反応後、電気泳動し、Quantity One (Bio-RAD) を用いてHeLa細胞と比較してその発現量を解析したところ、1  $\mu$ Mおよび5  $\mu$ M HeLa/CDDP耐性細胞においてはMT-IIA mRNAの発現量がHeLa細胞に比べて有意に増加した。ついで、MT-IIA 遺伝子プロモーター領域を含むプラスミド pKB8を *Bss*HIIで切断処理して生成した直鎖DNA断片とHeLa細胞、1  $\mu$ M CDDPで1時間処理したHeLa細胞、1  $\mu$ M および5  $\mu$ M HeLa/CDDP耐性細胞からの核タンパク質との結合について検討した。1  $\mu$ M CDDPで1時間処理したHeLa細胞 および1  $\mu$ M HeLa/CDDP耐性細胞では、1000 bp付近にDNA-核タンパク質複合体を示唆するバンドを観察したが、5  $\mu$ M HeLa/CDDP耐性細胞においては新しいバンドは観察できなかった。

次に、CDDP耐性細胞からの抽出核タンパク質とMT遺伝子のMREsとの結合におけるCu<sup>2+</sup>の関与について検討するために、pKB8を *Bss*HIIで切断処理して生成された制限酵素消化DNA断片とHeLa細胞、1  $\mu$ M CDDPで1時間処理したHeLa細胞、1  $\mu$ M および5  $\mu$ M HeLa/CDDP耐性細胞からの核タンパク質とCu<sup>2+</sup>存在下における結合性について、ゲルシフト法により検討した。1  $\mu$ M CDDPで1時間処理したHeLa細胞では、500  $\mu$ Mおよび1000  $\mu$ M Cu<sup>2+</sup>存在下においてCu<sup>2+</sup>非存在下と比べてDNA-核タンパク質複合体を示唆するバンドを1000 bp付近に検出した。また、1  $\mu$ M HeLa/CDDP耐性細胞の場合には、500  $\mu$ M Cu<sup>2+</sup>存在下では、未処理と比較してDNA-核タンパク質複合体の生成を示唆するバンドを有意に検出した。

同様に、pKB8を *Eco*52 Iおよび *Sac* IIでそれぞれ切断処理したものと、1  $\mu$ M CDDPで1時間処理したHeLa細胞、1  $\mu$ M HeLa/CDDP耐性細胞からの核タンパク質はCu<sup>2+</sup>の濃度に依存した結果を与えず、DNA-核タンパク質の複合体を示唆するバンドを観察した。しかし、HeLa細胞において、*Eco*52 Iおよび *Sac* IIによってそれぞれ切断生成したDNA (MRE<sub>d-g</sub>およびMRE<sub>e-g</sub>) -核タンパク質との複合体を示唆するバンドは、Cu<sup>2+</sup>に対して濃度依存的な増加傾向を示した。

以上の結果をまとめるとFig. 1とTable 3となり、1  $\mu$ Mおよび5  $\mu$ M HeLa/CDDP耐性細胞はHeLa細胞に比べてMT-IIA mRNAが高発現しており、MT-IIAタンパク質との結合を介して細胞中のCDDPを排泄する可能性が示唆された。また、CDDPで短時間処理したHeLa細胞あるいは低濃度のCDDPに対するHeLa耐性細胞からの核タンパク質中にはCu<sup>2+</sup>に依存した形で重金属依存性DNA配列の一つであるMRE<sub>d</sub>の3'末端と結合するタンパク質の存在が示唆された。

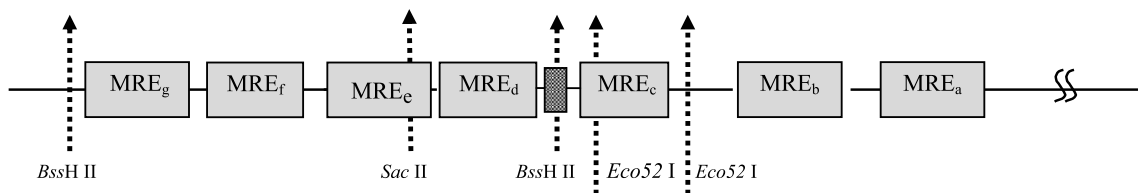
**Table 2** IC<sub>50</sub> values of the HeLa, 1  $\mu$ M HeLa/CDDP-resistant and 5  $\mu$ M HeLa/CDDP-resistant cells for CDDP

|                     | CDDP                        |                    |
|---------------------|-----------------------------|--------------------|
|                     | IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M) | R.R. <sup>a)</sup> |
| HeLa                | 0.37 $\pm$ 0.06             |                    |
| 1 $\mu$ M HeLa/CDDP | 7.08 $\pm$ 2.16             | 19.1 **            |
| 5 $\mu$ M HeLa/CDDP | 16.2 $\pm$ 1.31             | 43.8 **            |

<sup>a)</sup> Relative resistance: IC<sub>50</sub>  $\pm$  S.D. (n = 4 or 8)

\*\* *p* < 0.01 significantly different from HeLa cells.

A) MREs located upstream of the human *MT-IIA* gene



B) Sequences of MREs

| MRE | MREs Sequences |   |      |         |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|-----|----------------|---|------|---------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
|     |                |   | Core | GC-rich |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| a   | G              | C | T    | T       | T | G | C | T | T | T | G | C | T | T | T | G | C | T | T | T |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| b   | C              | T | G    | C       | C | T | G | C | A | C | T | G | T | C | C | C | G | T | C | C | C | G | T | C | C | C | G | C | G | T | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C |
| c   | C              | C | C    | A       | G | T | T | G | C | G | C | G | C | G | C | G | G | G | C | C | G | G | G | C | C | G | G | G | C | C | G | G | C | C | G | G | C | C | G |   |
| d   | C              | C | G    | G       | G | T | T | G | C | G | C | C | C | G | G | C | C | C | C | C | C | G | G | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C |   |
| e   | G              | G | C    | T       | C | T | T | G | C | A | C | A | C | G | G | G | C | C | C | C | G | G | G | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C |   |
| f   | C              | C | C    | G       | C | T | T | G | C | A | C | C | C | A | G | C | C | C | C | C | A | G | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C | C |   |
| g   | A              | G | C    | T       | G | T | T | G | C | A | C | A | C | G | G | C | G | G | C | G | G | C | G | G | C | G | G | C | G | G | C | G | G | C | G | G | C | G | G |   |

Fig. 1 MREs of the human *MT-IIA* gene.

Table 3 DNA fragments and the recognized regions in MREs by the restriction enzymes, and the indication of the binding of the nuclear proteins from HeLa cells and the CDDP-resistant cells to the DNA fragments

|               | Fragments (bp) | Recognized regions | Gel shift  |  |                                |                                |
|---------------|----------------|--------------------|------------|--|--------------------------------|--------------------------------|
|               |                |                    | HeLa cells | HeLa cells treated with 1 μM CDDP for 1 hr | 1 μM HeLa/CDDP-resistant cells | 5 μM HeLa/CDDP-resistant cells |
| <i>BssHII</i> | 216            | -                  | + (→)      | + (↑)                                      | + (↑)                          | -                              |
|               | 409            | MRE <sub>e-g</sub> |            |  |                                |                                |
|               | 2870           | MRE <sub>a-b</sub> | -          | -  | -                              | -                              |
| <i>Eco52I</i> | 58             | -                  | + (↑)      | + (→)                                      | + (→)                          | + (→)                          |
|               | 630            | MRE <sub>d-g</sub> |            |  |                                |                                |
|               | 2807           | MRE <sub>a-b</sub> | -          | -  | -                              | -                              |
| <i>SacII</i>  | 589            | MRE <sub>e-g</sub> | + (↑)      | + (→)                                      | + (→)                          | + (→)                          |
|               | 2906           | MRE <sub>a-d</sub> | -          | -  | -                              | -                              |

↑ : DNA binding with the nuclear proteins depending on Cu<sup>2+</sup>

→ : no effect by Cu<sup>2+</sup>

- : the bands were not detected.

参考文献

- 1) Yang Ya-Y, Robbins PD, Lazo JS (1998) Differential transactivation of human metallothionein-IIa in cisplatin-resistant and -sensitive cells. *Oncology Res* 10: 85 - 98.
- 2) Nakano M, Aoki-Sogawa C, Sogawa N, Mishima K, Yamachika E, Mizukawa N, Fukunaga J, Kawamoto T, Sawaki K, Gugahara T, Furuta H (2003) Expression pattern of cisplatin-induced metallothionein isoforms in squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 23: 299 - 304.
- 3) Andrews GK, Bittel D, Dalton T, Hu N, Chu W, Daggett M, Li Q, Johnson J (1999) New insights into the mechanisms of cadmium regulation of mouse metallothionein-I gene expression, ed. by Klaassen C, Birkhäuser Verlag, Basel/Switzerland: pp. 227 - 232.

- 4) 田和理市, 桜井 弘 (2004) メタロチオネイン遺伝子発現における銅イオンによるメタルシグナリング機構. *Trace Nutrients Res* 21 : 137-140.
- 5) Matsumoto S, Tanaka T, Kurokawa H, Matsuno K, Hayashida Y, Takahashi T (2007) Effect of copper and role of the copper transporters ATP7A and CTR1 in intracellular accumulation of cisplatin. *Anticancer Res* 27: 2209-2216.
- 6) Koizumi S, Suzuki K, Ogra Y, Yamada H, Otsuka F (1999) Transcriptional activity and regulatory protein binding of metal-responsive elements of the human metallothionein-IIA gene. *Eur J Biochem* 259: 635-642.
- 7) Kim WJ, Kakehi Y, Hirai M, Arao S, Hiai H, Fukumoto M, Yoshida O (1995) Multidrug resistance-associated protein-mediated multidrug resistance modulated by cyclosporin A in a human bladder cancer cell line. *Jpn J Cancer Res* 86: 969-977.