

Ehrlich 腹水癌細胞における Adriamycin 耐性と その克服に関する研究

岡山大学医学部放射線医学教室 (指導: 平木祥夫教授)

井 上 信 浩

(平成 2 年 3 月 27 日受稿)

Key words : Adriamycin, Adriamycin 耐性細胞, Cepharanthine, Hyperthermia

緒 言

癌化学療法において、治療中に抗癌剤が効かなくなる現象は広く認められ、この抗癌剤耐性の問題は治療上の大きな障害となっている¹⁾。そのメカニズムとして癌細胞が抗癌剤に対して抵抗性を獲得する細胞レベルでの耐性獲得が重要と考えられている¹⁾。ひとつの抗癌剤に耐性化した癌細胞が、構造も、作用機序もまったく異なる他の抗癌剤に対しても同時に耐性となる多剤耐性という現象は、獲得耐性のなかでも興味もたれ、さまざまな角度から研究が進められている²⁻⁸⁾。多剤耐性を示す細胞は、細胞内抗癌剤蓄積、保持能が低下しており、抗癌剤の細胞外排泄が亢進している。細胞内に抗癌剤が取り込まれても、外に能動的に排泄し、細胞内抗癌剤濃度を低く保つと考えられている⁹⁻¹³⁾。抗癌剤耐性の克服に関しても、さまざまな研究が行なわれている¹⁴⁾¹⁵⁾¹⁶⁾。カルシウム拮抗剤、カルモジュリン阻害剤は耐性細胞における亢進した抗癌剤の排泄を阻害し、抗癌剤の効果を増強する¹⁴⁾¹⁷⁾¹⁸⁾¹⁹⁾。また Biscoclaurin Alkarioid である Cepharanthine (CEP)²⁰⁾²¹⁾ も抗癌剤の細胞外への排泄を抑制し、その効果を増強する¹⁵⁾²²⁾²³⁾。Hyperthermia (加温) は最近注目されている癌の治療法である。加温により細胞膜の透過性が増大し、抗癌剤の流入が促進され、その効果を増強する¹⁶⁾²⁴⁾。

Adriamycin (ADR) は、現在臨床で高頻度に用いられる抗癌剤で、二重鎖 DNA の塩基間に intercalate し、DNA の転写および複製機能を

阻害する Anthracycline 系の抗生物質である²⁵⁾。その効果の発現には、細胞内への取り込みが不可欠であり、細胞内蓄積を増加させることにより、その殺細胞効果を増強することが可能と考えられる²⁶⁾²⁷⁾。今回著者は、ADR に対する耐性を克服する目的で、Ehrlich 腹水癌細胞 (EATC) から ADR に対する耐性株を樹立し、この ADR 耐性細胞 (ADR 耐性 EATC) とその親株 (Wild EATC) を用いて、加温及び CEP による ADR の細胞内流入促進、排泄抑制と、これらによる ADR の殺細胞効果の増強について検討し、耐性克服の可能性について考察した。

材 料 と 方 法

1. 細胞及び培養

使用した細胞は、Ehrlich 腹水癌細胞 (EATC) (岡山大学医学部佐藤二郎教授供与) である。EATC を $0.01\mu\text{g/ml}$ の濃度の ADR を含む培養液で 24 時間処理し、その後 ADR を含まない新しい培養液に交換して培養すると、増殖する細胞が認められた。この増殖して得られた細胞に同様の処理を 5 回行うと、生き残った細胞は、 $0.01\mu\text{g/ml}$ の濃度の ADR を含む培養液中で増殖可能であった。培養液中の ADR 濃度を漸増しながら同様の処理を繰り返し、 $0.2\mu\text{g/ml}$ 、 $0.5\mu\text{g/ml}$ 、 $1.0\mu\text{g/ml}$ 、 $2.0\mu\text{g/ml}$ の濃度の ADR を含む培養液中で増殖可能な ADR 耐性 EATC (各々、0.2ADR 耐性 EATC、0.5ADR 耐性 EATC、1.0ADR 耐性 EATC、2.0ADR 耐性 EATC とした) を樹立した。ADR 処理を加えていないものを wildEATC とした。継代培養

は、Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) (日本製薬) に Penicillin (100単位/ml) (明治製菓), Streptomycin (100 μ g/ml) (明治製菓) および10% Calf serum (Gibco) を添加した培養液を使用し、37.0 $^{\circ}$ Cにて5%CO₂+95% airのCO₂ incubatorで行った。各ADR耐性EATCは、それぞれの耐性を示す濃度のADRを含む培養液中で培養した。実験には、20代以上継代した細胞を用い、細胞を5 \times 10⁵個/シャーレに播種し、2~5日後に対数増殖期にある細胞を使用した。各ADR耐性EATCは、細胞内ADR取り込み量を測定する実験及びADRの殺細胞効果の実験では、1週間前よりADRを含まない培養液中で培養して使用した。

2. 薬 剤

Adriamycin (ADR) (協和発酵), Cepharanthine (CEP) (化研生薬)はいずれも蒸留水に溶解し1mg/mlに調整して冷凍保存したものを、実験の都度解凍し直ちに使用した。ADRの使用はyellow light下で行った。CEPはADR処理前20分に添加した。ADRの細胞外排泄に関する実験では、ADR処理後に添加した。

3. 加 温

加温処理は恒温水槽で行った。温度は基準温度計で計測し、43.0 \pm 0.05 $^{\circ}$ Cでコントロールされた。

4. 増 殖 曲 線

WildEATCと各ADR耐性EATCを10⁵個細胞/シャーレに播種し、シャーレ当りの細胞数を毎日計測して増殖曲線を得た。

5. DNA ヒストグラム

対数増殖期のWildEATCと各ADR耐性EATCを採取し、cold phosphate buffer saline (PBS) で洗滌し、冷70%エタノールで固定した(-20 $^{\circ}$ C, 24時間以上)。エタノール除去後PBSで洗滌して細胞を浮遊させ、これに等量の1% RNase (Sigma) 液を加え37.0 $^{\circ}$ Cで30分間 incubationした。PBSで洗滌してRNaseを除去し、再びPBSに細胞を浮遊させ、Propidium iodide (PI) (Sigma) を50 μ g/mlの濃度になるように添加した。40 μ m ナイロンメッシュで濾過し、Flow cytometry (FCM) を用いて10,000個の細胞からDNA量を測定し、DNAヒスト

グラムを得た。FCMはEPICS753 (Coulter社) を用いた²⁸⁾。

6. 細胞内 ADR 取り込み量の測定

ADRは488nmで励起すると556nmと582nmにピークをもつ蛍光を発する蛍光物質であることから、FCMを用いて細胞1個当りの取り込み量を測定することができる。WildEATCと各ADR耐性EATCをそれぞれ培養液中で1 \times 10⁵個/mlに調整し、ADR処理後細胞を洗滌し、PBSにて細胞浮遊液とし、0 $^{\circ}$ Cに保ち、40 μ m ナイロンメッシュで濾過し、直ちにFCMを用いて細胞内ADR取り込み量を測定した。FCMはEPICS753を用い、488nmで励起し530nm以上の蛍光量を20,000個の細胞で測定した。得られたヒストグラムから細胞1個当りの平均蛍光量を求め、この値よりコントロールの平均蛍光量を差し引いた量を平均細胞内ADR量とした²⁹⁻³³⁾。

7. コロニー形成法

コロニー形成法は二重軟寒天培養法を使用した。0.3%軟寒天中に細胞を播種後、CO₂ incubator中にて10~20日間培養し、細胞数50個以上のコロニー数を計測し、コロニー形成率を求めた。各ADR耐性EATCは、耐性を示す濃度のADRを含む培地中でのコロニー形成率を求め百分率(%)で表した。WildEATCは、ADRを含まない培地ならびに各濃度のADRを含む培地中でのコロニー形成率を求め%で表した。

8. 殺細胞効果

殺細胞効果はコロニー形成法にて求めた。ADR及びCEP処理を行ったものは、処理後DMEMにて5回洗滌した後、コロニー形成法を行った。

結 果

1. 増殖曲線とDNAヒストグラム

WildEATCと各ADR耐性EATCの増殖曲線(図1)から倍加時間を求めた(表1)。ADR耐性EATCの増殖速度はWildEATCより遅く、高濃度のADRに耐性を示す細胞ほど増殖速度が遅かった。

対数増殖期のWildEATCと各ADR耐性EATCのDNAヒストグラムを図2に示す。ADR耐性EATCではS期の細胞分画の減少とG₂+

M 期の細胞分画の増加が見られ、DNA 量 8C の細胞が出現していた。

2. コロニー形成能

ADR 耐性 EATC の耐性を示す濃度中でのコロニー形成率は、高濃度の ADR に耐性を示す細胞ほど減少していた。WildEATC のコロニー形成率は67.4%で、各濃度の ADR を含む培地中では全くコロニー形成はみられなかった (表 2)。

3. 細胞内 ADR 取り込み量の経時的变化

WildEATC 及び各 ADR 耐性 EATC に1.0 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ の濃度の ADR を37.0 $^{\circ}\text{C}$ にて処理し(30分, 60分, 90分, 120分), 細胞内 ADR

取り込み量を測定した(図3, 表3, 4)。WildEATC, 各 ADR 耐性 EATC 共に, 細胞内 ADR 取り込み量は時間とともに増加した。しかし, ADR 耐性 EATC では, 細胞内 ADR 取り込み量が著明に低下しており, 耐性度の高い細胞ほど低下が著しかった。

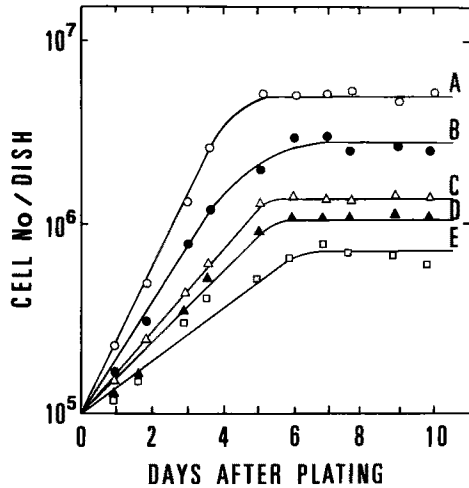


図1 Wild EATC と ADR 耐性 EATC の増殖曲線
 A : WildEATC
 B : 0.2ADR 耐性 EATC
 C : 0.5ADR 耐性 EATC
 D : 1.0ADR 耐性 EATC
 E : 2.0ADR 耐性 EATC

表1 WildEATC と ADR 耐性 EATC の倍加時間

細胞の種類	倍加時間(hr)
WildEATC	19
0.2ADR 耐性 EATC	26
0.5ADR 耐性 EATC	33
1.0ADR 耐性 EATC	37
2.0ADR 耐性 EATC	47

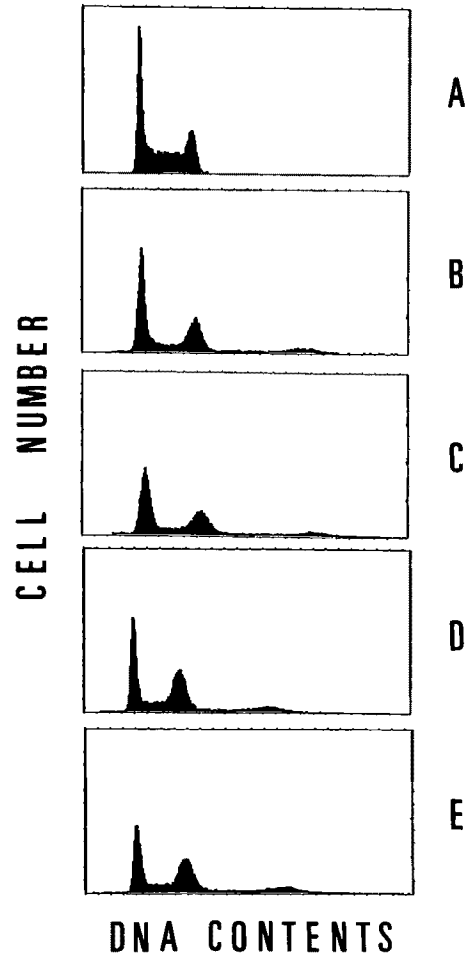


図2 対数増殖期の WildEATC と ADR 耐性 EATC のDNA ヒストグラム
 A : WildEATC
 B : 0.2ADR 耐性 EATC
 C : 0.5ADR 耐性 EATC
 D : 1.0ADR 耐性 EATC
 E : 2.0ADR 耐性 EATC

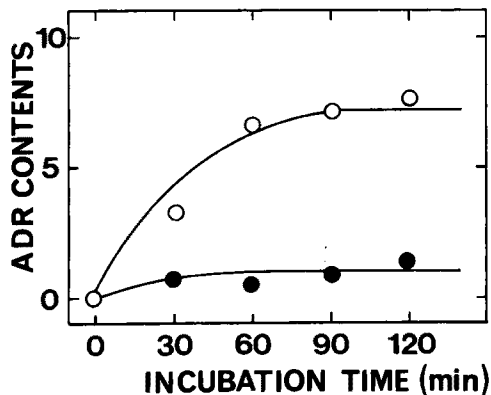
4. ADR の細胞内取り込み後の排泄に対する CEP の効果

WildEATC 及び1.0ADR 耐性 EATC を10 $\mu\text{g/ml}$ の濃度の ADR で37.0℃, 60分間処理した後, 細胞を洗條し ADR を含まない新しい培養液に交換し, 30分, 60分, 120分, 240分後に細胞内 ADR 残存量を測定した. ADR 耐性 EATC では, ADR 処理単独では細胞内 ADR 取り込み量が著しく低下しているため, CEP(10 $\mu\text{g/ml}$) を併用して ADR を取り込ませた.

WildEATC, 1.0ADR 耐性 EATC 共に培養液交換直後より細胞内からの ADR の流出が認

表2 WildEATC と ADR耐性 EATC のコロニー形成能

細胞の種類	培地中の ADR 濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	コロニー形成率 (% Mean \pm SD)
WildEATC	0	67.4 (\pm 3.8)
	0.2	0
	0.5	0
	1.0	0
	2.0	0
0.2ADR 耐性 EATC	0.2	39.0 (\pm 4.0)
0.5ADR 耐性 EATC	0.5	16.2 (\pm 2.3)
1.0ADR 耐性 EATC	1.0	13.5 (\pm 2.3)
2.0ADR 耐性 EATC	2.0	7.0 (\pm 2.5)



められた. WildEATC では, 培養液交換直後(0分)の細胞内 ADR 取り込み量を100%とすると, 培養液交換240分後には46.9%に減少していた.

表3 WildEATC と ADR 耐性 EATC の細胞内 ADR 取り込み量の経時的变化 (ADR 1.0 $\mu\text{g/ml}$, 37.0℃)

細胞の種類	ADR 処理時間 (min)				
	0	30	60	90	120
WildEATC	0	3.29	6.48	7.14	7.53
0.2ADR 耐性 EATC	0	2.72	2.73	2.98	3.30
0.5ADR 耐性 EATC	0	1.15	1.87	2.62	1.99
1.0ADR 耐性 EATC	0	0.73	0.52	0.77	1.43
2.0ADR 耐性 EATC	0	0.66	1.66	1.14	1.28

表中の数値は平均細胞内 ADR 蛍光量を示す.

表4 WildEATC と ADR 耐性 EATC の細胞内 ADR 取り込み量の経時的变化 (ADR 10 $\mu\text{g/ml}$, 37.0℃)

細胞の種類	ADR 処理時間 (min)				
	0	30	60	90	120
WildEATC	0	34.10	53.51	60.73	61.01
0.2ADR 耐性 EATC	0	11.14	11.70	13.37	16.30
0.5ADR 耐性 EATC	0	8.04	9.05	9.87	10.55
1.0ADR 耐性 EATC	0	6.19	7.24	7.49	10.30
2.0ADR 耐性 EATC	0	7.23	9.17	8.76	9.10

表中の数値は平均細胞内 ADR 蛍光量を示す.

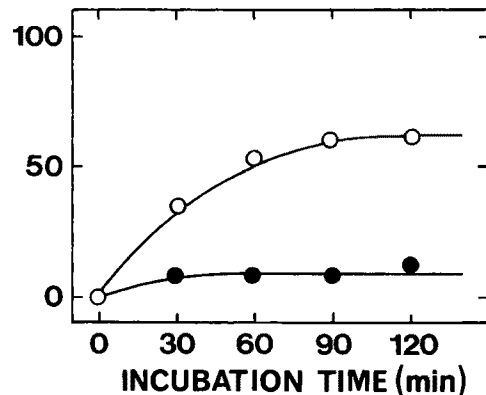


図3 WildEATC と1.0ADR 耐性 EATC の細胞内 ADR 取り込み量の経時的变化

○ WildEATC

● 1.0ADR 耐性 EATC

図左: ADR 処理濃度1.0 $\mu\text{g/ml}$, 37.0℃

図右: ADR 処理濃度10 $\mu\text{g/ml}$, 37.0℃

交換培養液に CEP (10 μ g/ml) を添加すると培養液交換240分後には83.7%の ADR が細胞内に残存していた (図 4)。1.0ADR 耐性 EATC では、細胞内 ADR 量は240分後には、27.7%に減少していた。交換培養液に CEP (10 μ g/ml) を添加すると、培養液交換240分後には72.4%の ADR が細胞内に残存していた (図 5)。ADR 耐

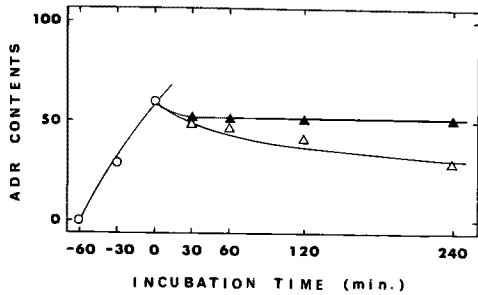


図 4 WildEATC における ADR の細胞外排泄に対する CEP の効果
ADR (10 μ g/ml) で37.0 $^{\circ}$ C, 60分間処理した後、ADR を含まない新しい培養液に交換し、各時間に細胞内 ADR 残存量を測定した。
 Δ 交換培養液に CEP (10 μ g/ml) を添加しない場合
 \blacktriangle 交換培養液に CEP (10 μ g/ml) を添加した場合

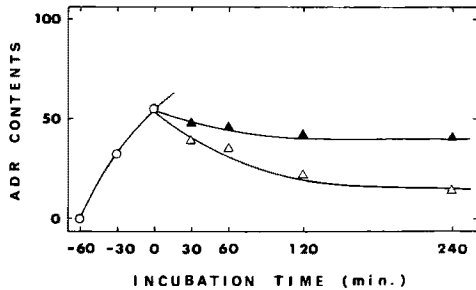


図 5 1.0ADR 耐性 EATC における ADR の細胞外排泄に対する CEP の効果
ADR (10 μ g/ml) と CEP (10 μ g/ml) を併用して37.0 $^{\circ}$ C, 60分間処理した後、ADR を含まない新しい培養液に交換し、各時間に細胞内 ADR 残存量を測定した。
 Δ 交換培養液に CEP (10 μ g/ml) を添加しない場合
 \blacktriangle 交換培養液に CEP (10 μ g/ml) を添加した場合

性 EATC は、WildEATC と比較して、ADR の細胞外排泄が亢進していた。また、CEP 処理によって、ADR の細胞外排泄が抑制された。

5. 細胞内 ADR 取り込み量に対する CEP の濃度効果

1.0ADR 耐性 EATC の細胞内 ADR 取り込み量に対する CEP の濃度依存性を検討した。CEP の処理濃度は0.2 μ g/ml, 0.5 μ g/ml, 1.0 μ g/ml, 2.0 μ g/ml, 5.0 μ g/ml, 10 μ g/ml, 20 μ g/ml で、ADR (10 μ g/ml) 処理20分前に加えた。37.0 $^{\circ}$ C で90分間処理した。CEP 0.2 μ g/ml では僅かな細胞内 ADR 取り込み量の増加が認められた。処理濃度が上昇するとともに取り込み量の増加がみられ、10 μ g/ml 以上ではプラトーに達した (図 6)。

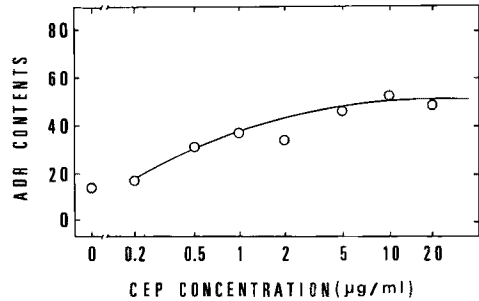


図 6 細胞内 ADR 取り込み量に対する CEP の濃度効果
1.0ADR 耐性 EATC に ADR (10 μ g/ml) を37.0 $^{\circ}$ C, 90分間処理した。
CEP は ADR 処理20分前に添加した。

表 5 ADR 非存在下での培養期間と細胞内 ADR 取り込み量

ADR 非存在下での培養期間(週)	細胞内 ADR 取り込み量 (Fluorescent intensity)
0	13.54
4	11.11
8	12.14
12	8.72
16	10.45
20	12.40

ADR は10 μ g/mlで、37.0 $^{\circ}$ Cにて60分間処理した。

6. 耐性の安定性

1.0ADR 耐性 EATC を ADR を含まない培養液中で培養し (4 週間, 8 週間, 12 週間, 16 週間, 20 週間), 細胞内 ADR 取り込み量 (ADR 10 μ g/ml, 37.0 $^{\circ}$ C, 60 分間処理) を測定した. ADR 非存在下で 20 週間培養したが, 細胞内 ADR 取り込み量の増加はみられなかった (表 5).

7. 細胞内 ADR 取り込み量に対する加温及び CEP の効果

WildEATC 及び 1.0ADR 耐性 EATC に 10 μ g/ml の濃度の ADR を以下の 4 群で処理し, 細胞内 ADR 取り込み量を測定した. 37.0 $^{\circ}$ C (コントロール), 43.0 $^{\circ}$ C (加温処理), 37.0 $^{\circ}$ C にて CEP (10 μ g/ml) を添加 (CEP 処理), 43.0 $^{\circ}$ C にて CEP (10 μ g/ml) を添加 (加温と CEP の併用処理) の 4 群で, 処理時間は 30 分, 60 分, 90 分, 120 分であった. WildEATC では, 加温処

理により細胞内 ADR 取り込み量は増加し, 120 分処理で 37.0 $^{\circ}$ C と比較して 1.8 倍の取り込み量増加を示した. CEP 処理では 1.2 倍, 加温処理と CEP 処理を併用すると 2.0 倍 (加温処理と比較すると 1.1 倍), 取り込み量増加を示した (図 7).

1.0ADR 耐性 EATC では, 37.0 $^{\circ}$ C での細胞内 ADR 取り込み量は WildEATC と比較して著しく低下していた. CEP 処理により, 取り込み量が増加 (120 分処理で 37.0 $^{\circ}$ C と比較して 6.0 倍) し, WildEATC に CEP 処理をした場合とほぼ同量の取り込み量を示した. 加温処理でも取り込み量が増加したが (120 分処理で 2.6 倍), CEP 処理ほどの増加は示さなかった. 加温処理と CEP 処理を併用すると著明な取り込み量の増加がみられ (120 分処理で 10.8 倍), WildEATC に同様の処理をした場合とほぼ同量の取り込み量を示した (図 8).

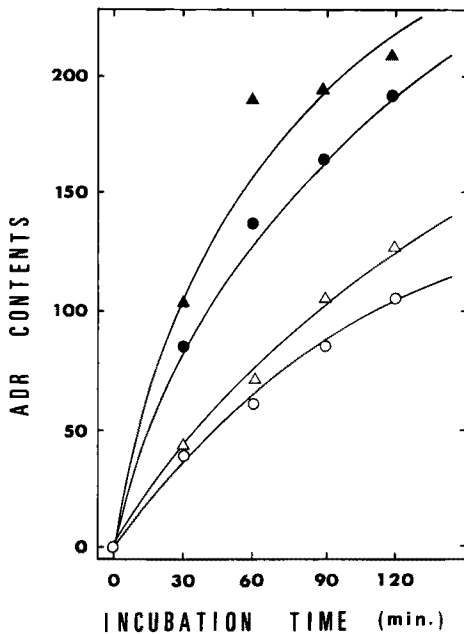


図 7 WildEATC の細胞内 ADR 取り込み量に対する加温及び CEP の効果
○ 37.0 $^{\circ}$ C (コントロール)
● 43.0 $^{\circ}$ C (加温処理)
△ CEP 10 μ g/ml (CEP 処理)
▲ 43.0 $^{\circ}$ C, CEP 10 μ g/ml 併用 (加温と CEP の併用処理)
ADR は 10 μ g/ml で処理した.

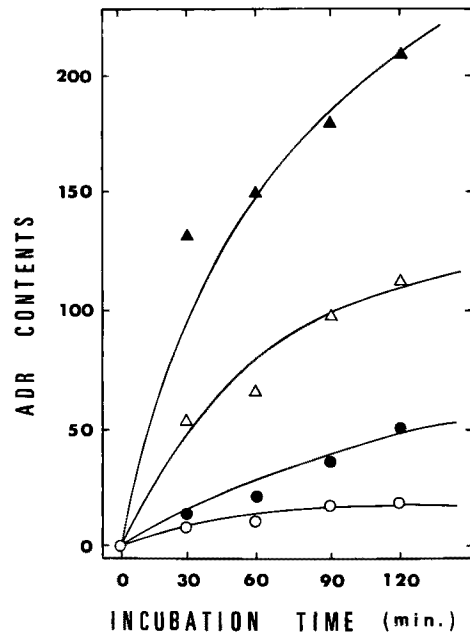


図 8 1.0ADR 耐性 EATC の細胞内 ADR 取り込み量に対する加温及び CEP の効果
○ 37.0 $^{\circ}$ C (コントロール)
● 43.0 $^{\circ}$ C (加温処理)
△ CEP 10 μ g/ml (CEP 処理)
▲ 43.0 $^{\circ}$ C, CEP 10 μ g/ml 併用 (加温と CEP の併用処理)
ADR は 10 μ g/ml で処理した.

表6 ADR の殺細胞効果に対する加温及び CEP による修飾

処理の種類	コロニー形成率(%、Mean±SD)	
	WildEATC	1.0ADR 耐性 EATC
コントロール	47.34±3.33(100)	22.17±0.29(100)
ADR	0.26±0.03(0.54)	19.34±2.26(87.2)
ADR と加温併用	0.07±0.01(0.15)	11.84±1.45(53.4)
ADR と CEP 併用	0.21±0.05(0.44)	9.30±1.66(42.0)
ADR、加温、CEP 三者併用	0.06±0.02(0.13)	2.80±0.73(12.6)
加温	27.67±1.26(58.5)	12.50±1.81(56.4)
CEP	45.84±3.33(96.8)	19.84±2.85(89.5)
加温と CEP 併用	28.17±3.68(59.5)	10.84±1.76(48.9)

()はコントロールに対する百分率、処理時間は30分、ADR 処理濃度は1.0 μ g/ml、加温処理は43.0 $^{\circ}$ C、CEP 処理は10 μ g/ml、各処理後コロニー形成法を行った。

8. ADR の殺細胞効果に対する加温及び CEP による修飾

WildEATC 及び1.0ADR 耐性 EATC に、1.0 μ g/mlの濃度の ADR を以下の4群で処理した後、コロニー形成法を行い、ADR の殺細胞効果を検討した。37.0 $^{\circ}$ C (ADR 単独処理)、43.0 $^{\circ}$ C (ADR と加温の併用処理)、37.0 $^{\circ}$ Cにて CEP (10 μ g/ml) を添加 (ADR と CEP の併用処理)、43.0 $^{\circ}$ Cにて CEP (10 μ g/ml) を添加 (ADR、加温、CEP の三者併用処理) の4群で、処理時間は30分であった。何ら処理しないものをコントロールとし、加温 (43.0 $^{\circ}$ C) 処理及び CEP (10 μ g/ml) 処理単独での殺細胞効果も検討した (表6)。

WildEATC では、ADR 単独処理の殺細胞効果と比較して、加温併用で3.6倍、CEP 併用で1.2倍、加温と CEP 併用で4.2倍に殺細胞効果が増強された。この殺細胞効果の増強には、加温および CEP 単独での殺細胞効果が影響している。これらを除いて、ADR の殺細胞効果に対する修飾を検討した。加温は2.1倍、CEP は1.2倍、加温と CEP の併用は2.5倍それぞれ ADR の殺細胞効果を増強していた。ADR の殺細胞効果に対する修飾は、CEP より加温の効果が高く、加温と CEP を併用しても加温の効果を僅かに高める程度であった。これは細胞内 ADR 取り込み量に対する効果とよく一致していた (図7)。

1.0ADR 耐性 EATC では、ADR 単独の殺細胞効果と比較して、加温併用で1.6倍、CEP 併用で2.1倍、加温と CEP 併用で6.9倍に殺細胞効果が増強された。加温および CEP 単独での殺細胞効果を除き ADR の殺細胞効果に対する修飾を検討すると、CEP は ADR の殺細胞効果を1.9倍増強したが、加温は単独では ADR の殺細胞効果を増強しなかった。しかし、加温と CEP を併用すると ADR の殺細胞効果を3.4倍増強した。ADR の殺細胞効果に対する修飾は、加温より CEP の効果が高く、加温と CEP を併用するとさらに効果が著しかった。これは細胞内 ADR 取り込み量に対する効果と一致していたが、細胞内 ADR 取り込み量の増加ほどには殺細胞効果を増強しなかった (図8)。

考 察

癌化学療法中に出現する抗癌剤耐性を克服することは、重要な課題である。今回著者は、抗癌剤耐性を克服するために、現在高頻度に用いられる抗癌剤の一つである ADR に対する耐性細胞の樹立を試みた。ADR に対する耐性細胞はいくつか報告されているが²⁵⁾¹¹⁾¹³⁾³⁶⁾、著者は、EATC を用いて、各種濃度の ADR 存在下で増殖可能な ADR 耐性株を樹立した。この ADR 耐性 EATC と WildEATC の差異を検討することによって、耐性の克服に有用な知見が得られると考えた。ADR 耐性 EATC は増殖速度が遅く (図1、表1)、S 期が減少し、G₂+M 期が増加し、DNA 量 8C の細胞が出現していた (図2)。また、コロニー形成能は低下していた (表2)。ADR 耐性 EATC では分裂増殖を繰り返す細胞集団中に、一部増殖不能な集団が現れ、残りの細胞集団が分裂増殖しているものと考えられる。

抗癌剤耐性獲得の機構として、抗癌剤の細胞外への排泄亢進による、細胞内の抗癌剤蓄積保持の低下が報告されている⁹⁻¹³⁾。著者の実験でも、ADR 耐性細胞は、ADR の細胞外への排泄亢進が認められ (図4、5)、細胞内 ADR 取り込み量は著しく低下し、耐性度の高い細胞ほど取り込み量が低下していた (図3、表3、4)。今回著者の樹立した ADR 耐性 EATC の耐性獲得

機構は、ADR の細胞外への排泄亢進による細胞内 ADR 蓄積保持の低下と考えられる。また、ADR 非存在下で20週間培養しても、細胞内 ADR 取り込み量は増加しなかった(表5)。一度獲得した耐性はかなり長期間安定した状態にあると思われる²¹⁵⁾。

ADR の殺細胞効果の発現には、細胞内へ取り込まれることが不可欠である。細胞内 ADR 取り込み量は、細胞内への流入と細胞外への流出の差で示される。そこで、細胞内への流入を促進し、細胞外への流出を抑制すれば、細胞内 ADR 蓄積が増加し、その殺細胞効果を高めることができると考えられる²⁶⁾²⁷⁾。

耐性細胞の細胞膜上には、特殊な糖蛋白質(P-glycoprotein: PG)が多量に存在していることが報告されており、このPGは、能動輸送によって細胞内の抗癌剤を細胞外へ排泄するポンプの作用を持った蛋白質であると考えられている³⁴⁻³⁸⁾。Verapamil等のカルシウム拮抗剤やCEPは、PGの排泄機能を抑制することが報告されている¹⁴⁾¹⁵⁾¹⁷⁾¹⁸⁾¹⁹⁾²²⁾²³⁾。著者の実験でも、CEPは、ADRの細胞外排泄を抑制することが認められ(図4, 5, 6)、ADR耐性EATCの低下した細胞内 ADR 取り込み量をWildEATCとほぼ同量にまで高めた(図7, 8)。

一方、細胞内へのADRの流入は、細胞外のADR濃度や温度に影響され、受動輸送であると考えられている³⁾⁴⁾³²⁾。加温は細胞膜の透過性を増大させ、抗癌剤の流入を促進することが報告されている¹⁶⁾²⁴⁾。著者の実験では、WildEATCは、43.0℃の加温処理によって細胞内 ADR 取り込み量が増加したが、ADR耐性EATCでは、43.0℃の加温処理を行ってもWildEATCと比較して細胞内 ADR 取り込み量の増加は僅かであった(図7, 8)。これは、ADR耐性EATCの細胞膜に存在すると考えられるPGの排泄機能が、43.0℃の加温処理では抑制されず、盛んに排泄が行われているためと考えられる。しかし、加温とCEPを併用すると、著しい細胞内 ADR 取り込み量の増加が認められた。これは、加温による細胞内へのADR流入促進と、CEPによる細胞外へのADR排泄抑制のため、細胞内 ADR 取り込み量が著しく増加したものと考

えられる²⁶⁾²⁷⁾。

細胞内 ADR 取り込み量と ADR の殺細胞効果の関係を検討すると、細胞内 ADR 取り込み量を増加させると、ADR の殺細胞効果が増強された(表6)⁷⁾¹⁶⁾³⁰⁾。WildEATCでは細胞内 ADR 取り込み量と ADR の殺細胞効果はよく一致していたが、ADR耐性EATCでは ADR 取り込み量の増加ほどには ADR の殺細胞効果は増強されなかった。これは、加温及び CEP によって ADR の細胞内蓄積は増加するが、処理後に ADR が細胞外へ排泄され、ADR の細胞内保持が低下するためと考えられる。加温による ADR 蓄積の増加は僅かであり、処理後の排泄による ADR 保持の低下のため、殺細胞効果は増強されなかったと考えられる。CEPによって ADR 蓄積を増加させると、殺細胞効果は増強され、さらに加温と CEP を併用すると、殺細胞効果は著しく増強された。

著者の実験で、加温と CEP の併用は、ADR耐性細胞の細胞内 ADR 蓄積を増加し、殺細胞効果を増強することが認められた。加温と CEP を併用することは、抗癌剤の細胞内蓄積を増加させ、その殺細胞効果を増強することから、耐性克服に有用な方法と考えられる。加温と CEP を併用して抗癌剤の細胞内蓄積を増加させ、さらに細胞内保持を増加させることが出来れば、抗癌剤耐性の克服も可能と考えられ、今後、実験腫瘍等での研究から検討を加えたい。

結 語

癌化学療法において癌細胞の抗癌剤耐性は大きな障害であり、耐性の克服は重要な課題である。

Ehrlich 腹水癌細胞から Adriamycin (ADR) に耐性を示す耐性株を樹立し、この耐性細胞を用いた実験から以下の知見を得た。

耐性細胞は増殖速度が遅く、対数増殖中の細胞集団に DNA 量 8C の population が出現していた。耐性細胞では ADR の細胞外排泄が亢進しており細胞内 ADR 取り込み量は著しく低下していた。Cepharanthine (10 μ g/ml: CEP) はこの排泄を抑制し、ADR 取り込み量を増加させ、ADR の殺細胞効果を増強した。加温 (43.0℃)

は ADR の細胞内流入を促進し ADR 取り込み量を増加させたが、単独では排泄の亢進のため殺細胞効果を増強しなかった。しかし、加温と CEP を併用すると、加温による流入促進と CEP による排泄抑制によって ADR 取り込み量が著しく増加し、殺細胞効果を増強した。

以上の結果から、加温と CEP の併用は ADR の殺細胞効果を増強し耐性の克服に有用であると考えられた。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました平木祥夫教授に深甚なる謝意を捧げるとともに、終始研究の御指導をいただいた岡山大学医療技術短期大学部川崎祥二教授に深謝いたします。また快く御協力下さいました教室員諸兄の方々に心から感謝の意を表します。

本論文の要旨の一部は第 6 回日本ハイパーサーミア学会（平成元年11月、東京）において発表した。

文 献

- 1) Lane M : Clinical problems of resistance to cancer chemotherapeutic agents. *Fed Proc* (1979) **38**, 103—107.
- 2) Danb K : Development of resistance to adriamycin (NSC123127) in Ehrlich ascites tumor. *Cancer Chemother Rep* (1972) **56**, 321—326.
- 3) Skovsgaard T : Transport and binding of daunorubicin, adriamycin and rubidazole in Ehrlich ascites tumor cells. *Biochem Pharmacol* (1977) **26**, 215—222.
- 4) Tapiero H, Fourcade A, Vaigot P and Farhi JJ : Comparative uptake of adriamycin and daunorubicin in sensitive and resistant Friend leukemia cells measured by flow cytometry. *Cytometry* (1982) **2**, 298—302.
- 5) Giavazzi R, Scholar E and Hart IR : Isolation and preliminary characterization of an adriamycin-resistant murine fibrosarcoma cell line. *Cancer Res* (1983) **43**, 2216—2222.
- 6) Willingham MC, Cornwell MM, Cardarelli CO, Gottesman MM and Pasten I : Single cell analysis of daunomycin uptake and efflux in multidrug-resistant and sensitive KB cells : effects of verapamil and other drugs. *Cancer Res* (1986) **46**, 5941—5946.
- 7) 長岡 栄, 川崎祥二, 狩野裕一, 中村英典, 中西 敬, 佐々木功典 : 各種細胞における Adriamycin の取り込み, 排泄及び感受性の解析. *日癌治療会誌* (1986) **21**, 991—997.
- 8) Tsuruo T : Mechanisms of multidrug resistance and implications for therapy. *Jpn J Cancer Res* (1988) **79**, 285—296.
- 9) Danb K : Active outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascites tumor cells. *Biochim Biophys Acta* (1973) **323**, 466—483.
- 10) Skovsgaard T : Mechanism of resistance to daunorubicin in Ehrlich ascites tumor cells. *Cancer Res* (1977) **38**, 1785—1791.
- 11) Inaba M and Johnson RK : Uptake and retention of adriamycin and daunorubicin by sensitive and anthracycline-resistant sublines of P388 leukemia. *Biochem Pharmacol* (1978) **27**, 2123—2130.
- 12) Inaba M, Kobayashi H, Sakurai Y and Johnson RK : Active efflux of daunorubicin and adriamycin in sensitive and resistant sublines of P388 leukemia. *Cancer Res* (1979) **39**, 2200—2203.
- 13) Nishimura T, Suzuki H, Muto K and Tanaka N : Mechanism of adriamycin resistance in a subline of mouse lymphoblastoma L5178Y cells. *J Antibiot* (1979) **32**, 518—522.
- 14) Tsuruo T, Iida H, Tsukagoshi S and Sakurai Y : Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. *Cancer Res* (1981) **41**, 1967—1972.

- 15) Shiraishi N, Akiyama S, Nakagawa M, Kobayashi M and Kuwano M : Effect of bisbenzylisoquinoline (Biscoclaurine) alkaloids on multidrug resistance in KB human cancer cells. *Cancer Res* (1987) **47**, 2413—2416.
- 16) Nagaoka S, Kawasaki S, Sasaki K and Nakanishi T : Intracellular adriamycin uptake, retention and cytotoxic effect of adriamycin combined with hyperthermia in vitro. *Jpn J Cancer Res* (1986) **77**, 205—211.
- 17) Tsuruo T, Iida H, Tsukagoshi S and Sakurai Y : Increased accumulation of vincristine and adriamycin in drug-resistant tumor cells following incubation with calcium antagonists and calmodulin inhibitors. *Cancer Res* (1982) **42**, 4730—4733.
- 18) Tsuruo T, Iida H, Tsukagoshi S and Sakurai Y : Potentiation of vincristine and adriamycin effects in human hemopoietic tumor cell lines by calcium antagonists and calmodulin inhibitors. *Cancer Res* (1983) **43**, 2267—2272.
- 19) 佐々木功典, 長岡 栄, 村上知之, 川崎祥二, 高橋 学 : 細胞のアドリアマイシン取り込みに及ぼすカルシウム拮抗剤の影響. *癌と化療* (1985) **12**, 966—968.
- 20) Utsumi K, Miyama M, Sugiyama K and Sasaki J : Effect of biscoclaurin alkaloid on the cell membrane related to membrane fluidity. *Acta Histochem Cytochem* (1976) **9**, 59—68.
- 21) Watanabe S : Inhibition of platelet aggregation by cepharanthine is accomplished during the early, membrane-related activation process. *Acta Med Okayama* (1984) **38**, 101—115.
- 22) 長岡 栄, 川崎祥二, 佐々木功典, 中西 敬 : アルカロイド(セファランチン)によるアドリアマイシンの細胞内取り込みおよび排泄の修飾. *医のあゆみ* (1985) **133**, 260—261.
- 23) Nagaoka S, Kawasaki S, Karino Y, Sasaki K and Nakanishi T : Modification of cellular efflux and cytotoxicity of adriamycin by biscoclaurin alkaloid in vitro. *Eur J Cancer Clin Oncol* (1987) **23**, 1297—1302.
- 24) 川崎祥二, 佐々木功典, 長岡 栄, 江部和勇, 中西 敬, 高橋 学 : Adriamycin の細胞内取り込みへの hyperthermia の影響. *日医放線会誌* (1984) **44**, 727—731.
- 25) Zunino F, Gambetta R, DiMarco A and Zaccara A : Interaction of daunomycin and its derivatives with DNA. *Biochim Biophys Acta* (1972) **277**, 489—498.
- 26) 柏谷尚子 : Ehrlich 腹水癌細胞の薬剤耐性細胞における温熱による Adriamycin の効果増強とその修飾. *岡山医誌* (1989) **101**, 315—325.
- 27) 水田昭文 : Adriamycin の殺細胞効果の加温および Cepharanthine による修飾. *岡山医誌* (1989) **101**, 303—314.
- 28) Gray JW, Dolbeare F, Pallavicini MG, Beisker W and Waldman F : Cell cycle analysis using flow cytometry. *Int J Radiat Biol* (1986) **49**, 237—255.
- 29) Krishan A and Ganapathi R : Laser flow cytometric studies on the intracellular fluorescence of anthracyclines. *Cancer Res* (1980) **40**, 3895—3900.
- 30) Durand RE and Olive PL : Flow cytometry studies of intracellular adriamycin in single cells in vitro. *Cancer Res* (1981) **41**, 3489—3494.
- 31) Muirhead KA, Schmitt TC and Muirhead AR : Determination of linear fluorescence intensities from flow cytometric data accumulated with logarithmic amplifiers. *Cytometry* (1983) **3**, 251—256.
- 32) 佐々木功典, 高橋 学, 川崎祥二, 長岡 栄, 中西 敬 : Flow Cytometry による細胞の Adriamycin 取り込み排出の解析. *日癌治療会誌* (1984) **19**, 1028—1031.
- 33) 佐々木功典, 高橋 学, 長岡 栄, 川崎祥二 : Flow cytometry による 3 T 3 細胞内アドリアマイシンの測定. *日癌治療会誌* (1985) **20**, 66—70.

- 34) Gerlach JH, Endicott JA, Juranka PF, Henderson G, Sarangi F, Deuchars KL and Ling V : Homology between P-glycoprotein and a bacterial haemolysin transport protein suggests a model for multidrug resistance. *Nature* (1986) **324**, 485—489.
- 35) Hamada H, Hagiwara K, Nakajima T and Tsuruo T : Phosphorylation of the M_r170,000 to 180,000 glycoprotein specific to multidrug-resistant tumor cells : effects of verapamil, trifluoperazine and phorbol esters. *Cancer Res* (1987) **47**, 2860—2865.
- 36) Sugimoto Y and Tsuruo T : DNA-mediated transfer and cloning a human multidrug-resistant gene of adriamycin-resistant myelogenous leukemia K562. *Cancer Res* (1987) **47**, 2620—2625.
- 37) Fojo AT, Ueda K, Slamon DJ, Pohlack DG, Gottesman MM, and Pastan I : Expression of a multidrug-resistant gene in human tumors and tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* (1987) **84**, 265—269.
- 38) Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I and Willingham MC : Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* (1987) **84**, 7735—7738.

Studies on overcoming resistance in adriamycin-resistant Ehrlich ascites tumor cells by hyperthermia and cepharanthine

Nobuhiro INOUE

Department of Radiology,

Okayama University Medical School,

Okayama 700, Japan

(Director : Prof. Y. Hiraki)

Adriamycin (ADR)-resistant Ehrlich ascites tumor cells (EATC) were established by repeated exposure to ADR. Using these resistant cells, the modification of the killing effect of ADR by hyperthermia and cepharanthine (CEP) was evaluated.

The killing effect of ADR depended on the intracellular uptake and retention of ADR. ADR-resistant EATC had an enhanced acquired capacity that increased the efflux of intracellular ADR. Therefore, the intracellular uptake and retention of ADR were decreased. CEP inhibited the efflux of intracellular ADR and increased the intracellular retention of ADR, thereby enhancing the killing effect of ADR. Hyperthermic treatment increased the influx of ADR, but the killing effect of ADR was not enhanced by hyperthermia alone because of the increased efflux of intracellular ADR. However, with the combination of hyperthermia and CEP, hyperthermia accelerated the influx of ADR, and CEP suppressed the efflux of intracellular ADR. Then the intracellular uptake and retention of ADR were further increased, and the killing effect of ADR was markedly enhanced. Thus the combined use of hyperthermia and CEP reduced the resistance to ADR.

These findings suggest that ADR resistance in cancer cells can be overcome by the combination of ADR, hyperthermia and CEP.