

ヒト肺腺癌細胞株PC-9における血小板活性化因子受容体拮抗薬のシスプラチン感受性増強効果に関する研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9414

ヒト肺腺癌細胞株 PC-9における血小板活性化因子受容体拮抗薬のシスプラチン感受性増強効果に関する研究

金沢大学医学部医学科内科学第三講座 (主任: 松田 保教授)

日 置 詩 子

抗癌薬の薬剤耐性は、癌化学療法における重要な問題である。本研究では、肺癌細胞のシスプラチン (cis-diamminedichloroplatinum (II), CDDP) 感受性に対する血小板活性化因子受容体拮抗薬の影響とその作用機序を解明する目的で、血小板活性化因子受容体拮抗薬 E6123 (エーザイ株式会社, 東京) がヒト肺腺癌細胞株のCDDP感受性, および感受性規定因子, さらにアポトーシスに与える影響について検討した。細胞株はヒト肺腺癌細胞株 PC-9およびそのCDDP耐性株である PC-9/CDDPを用いた。細胞増殖阻害試験による薬剤感受性の検討では, 細胞増殖に影響しない最大濃度である $500 \mu\text{M}$ の E6123によって, CDDPの50%細胞増殖阻害濃度 (drug concentration inhibiting cell growth by 50%, IC_{50}) はPC-9では $7.57 \pm 0.18 \mu\text{M}$ から $0.62 \pm 0.20 \mu\text{M}$ へと12.2倍 ($p < 0.05$) に, またPC-9/CDDPでは $188.84 \pm 85.11 \mu\text{M}$ から $42.08 \pm 25.19 \mu\text{M}$ へと4.5倍 ($p < 0.05$) というように, 両細胞株ともに有意にCDDPに対する感受性は増強した。アインソログラムを用いた検討では, 両細胞株ともにCDDPとE6123は相乗効果を示した。E6123のCDDP感受性増強効果の機序を解明する目的で, 細胞内プラチナ蓄積量, 細胞内グルタチオン含量およびグルタチオン-S-トランスフェラーゼ活性を測定したが, これらはPC-9, PC-9/CDDPの両細胞株ともに $300 \mu\text{M}$ のE6123の影響を受けなかった。CDDPにより誘導されるアポトーシスに与えるE6123の影響を検討したところ, 両細胞株ともにE6123処理により有意に増強された。さらにアポトーシスを誘導するカスパーゼファミリーのうち, カスパーゼ1, カスパーゼ2およびカスパーゼ3の発現をウエスタンブロッティング法を用いて検討した。 $300 \mu\text{M}$ のE6123処理にてカスパーゼ1の発現は有意に増加したが, カスパーゼ2とカスパーゼ3の発現には変化は認められなかった。以上より, 血小板活性化因子受容体拮抗薬 E6123は, ヒト肺腺癌細胞株 PC-9においてカスパーゼ1蛋白を誘導してアポトーシスを増強し, CDDP感受性を亢進させることが示唆された。

Key words lung cancer, cis-diamminedichloroplatinum (II), platelet activating factor receptor antagonist, apoptosis, caspase

シスプラチン (cis-diamminedichloroplatinum (II), CDDP) は癌化学療法の主要な抗癌薬であるが, その薬剤耐性の克服と感受性の改善は癌化学療法において治療効果を左右する重要な問題である。CDDPの感受性を規定する因子として, 薬剤能動輸送によって抗癌薬の細胞内蓄積を決定するナトリウム・カリウムATPアーゼ (Na^+ , K^+ ATPase^{1,2}), 薬剤の細胞外排出に関与するプロテインキナーゼ C^{3,4}, 解毒機構を担う細胞内グルタチオン (glutathione, GSH) 含量⁵, グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (glutathione-S-transferase, GST)⁶およびメタロチオネイン⁷活性, さらにはDNA障害修復機構⁸が掲げられる。

血小板活性化因子 (platelet activating factor, PAF) はアレルギー性疾患や炎症性疾患に関与する内因性の脂質メディエーターである。癌細胞のCDDP感受性規定因子としてPAFの関与については以下の報告がある。Catalanら⁹は, ラットの脳においてPAF投与により用量依存性に Na^+ , K^+ ATPase活性が阻害さ

れること, またPAF拮抗薬であるPCA-4248投与によって Na^+ , K^+ ATPase活性のPAFによる阻害が抑制されることを報告している。またLariveleら¹⁰は, ネコ気管上皮においてPAFを処理すると気道のムチン分泌が増加し, この際プロテインキナーゼCが活性化されることを報告している。現在までにPAF受容体拮抗薬そのものに抗腫瘍効果が認められるとの報告も散見され, Brutonら¹¹は前骨髄球性白血病細胞株 HL60, 慢性骨髄性白血病細胞株 K562および卵巣癌細胞株 A2780において, PAF受容体拮抗薬であるSDZ 62-434が用量依存性に抗腫瘍活性を発揮したこと, 同じくPAF受容体拮抗薬 WEB2086には全く抗腫瘍活性が認められなかったこと, ヒト癌細胞株において細胞表面のPAF受容体は極めて微量であり, PAF受容体拮抗薬の抗腫瘍活性がPAF受容体数ならびにPAFにより惹起される血小板凝集能とは相関しないことを報告した。同様にDanhauser-Riedelら¹²も, 9種類のPAF受容体拮抗薬が抗腫瘍活性を認め

平成11年1月19日受付, 平成11年2月25日受理

Abbreviations: CDDP, cis-diamminedichloroplatinum (II); DMSO, dimethylsulfoxide; FBS, fetal bovine serum; GSH, glutathione; GST, glutathione-S-transferase; IC, drug concentration inhibiting cell growth; MTT, 3-(4,5dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; PAF, platelet activating factor; PBS, phosphate-buffered saline; TBS-T, tris-buffered saline with Tween20

たこと、これらの薬剤による抗腫瘍活性がPAF受容体の阻害によるものではないことを報告した。またSandvalら¹⁰⁾はラットの実験的肺炎モデルを作成し、PAFがそのアポトーシス増強に深く関わること、PAF受容体拮抗薬投与によってアポトーシスが阻害されることを報告している。

以上の報告から、PAF受容体拮抗薬が癌細胞のCDDP感受性規定因子に何らかの影響を及ぼす可能性、PAF受容体拮抗薬が抗PAF活性とはまったく別の経路で抗腫瘍効果を示す可能性、ならびに癌細胞のアポトーシス誘導においても何らかの役割を有する可能性が示唆される。これらの点を明らかにすることを目的として本研究を実施した。本研究ではヒト肺腺癌細胞株を用い、PAF受容体拮抗薬 E6123がCDDP感受性と感受性規定因子、ならびにCDDPによるアポトーシス誘導に及ぼす影響について検討した。

材料および方法

I. 試薬

RPMI 1640, リン酸緩衝液 (phosphate-buffered saline, PBS) および1%ペニシリン・ストレプトマイシン混合液はニッスイ薬品工業 (東京) より購入した。ウシ胎児血清 (fetal bovine serum, FBS) は三光純薬 (東京) より購入した。CDDPは日本化薬株式会社 (東京) より、E6123 [(S)-(+)-6-(2-chlorophenyl)-3-cyclopropanecarbonyl-8,1-dimethyl-2,3,4,5-tetrahydro-8H-pyrido (4',3:4,5)thieno(3,2-f)(1,2,4)triazolo(4,3-a)(4) diazepine] (図1) はユーザイ株式会社 (東京) よりそれぞれ供与を受けた。ジメチルスルフォキシド (dimethylsulfoxide, DMSO) は和光純薬 (大阪) より、MTT[(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) はSigma (St.Louis, USA) より購入した。

II. 細胞株

国立がんセンター西條長宏先生より供与を受けたヒト肺腺癌細胞株PC-9と、そのCDDP耐性株であるPC-9/CDDPを用いた。細胞は10% FBSと1%ペニシリン・ストレプトマイシンの混合液を加えたRPMI 1640培養液を用いて5% CO₂濃度、37℃の条件に設定した培養器内で培養した。以下の実験の細胞培養は、すべてこの条件の培養器を用いて行った。

III. 薬剤感受性

薬剤感受性は細胞増殖阻害試験により検討した。増殖期にあるPC-9およびPC-9/CDDPの各細胞を回収し、培養液に浮遊させた後、細胞液を 5×10^6 個/mlに調整した。96穴V底マルチブ

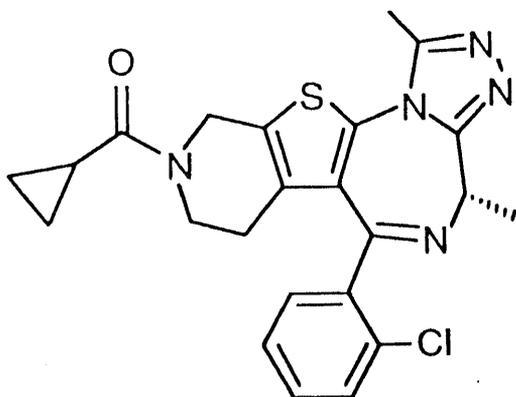


Fig. 1. Chemical structure of E6123.

レート (Coster, Cambridge, USA) の各ウェルに細胞浮遊液100 μ lを注入して約1時間静置した。その上に、単独では細胞増殖に影響を与えない最大濃度500 μ Mもしくは250 μ M (いずれも最終200 μ lにおける濃度) のE6123 (培養液に溶解) 50 μ lまたは培養液50 μ lを注入した三系列のウェルに、さらに200 μ lにおける最終濃度が1 μ M, 3 μ M, 10 μ M, 30 μ M, 100 μ M, 300 μ M, 1000 μ MとなるようCDDP (培養液に溶解) 50 μ lまたは培養液50 μ lを加えた。これを2時間、5% CO₂, 37℃で培養した後、2000回転/分にて10分間遠心して上清を吸引し、新たに培養液200 μ lを加えた。マイクロピペットで攪拌した後、100 μ lを取り出して96穴平底マルチプレート (Falcon, Franklin Lakes, USA) に移した。その後、培養液100 μ lを加えて培養器内に静置した。96時間後にPBSで溶解した5 mg/mlのMTT溶液20 μ lを加え、さらに4時間培養した後、2000回転/分にて10分間遠心して上清を取り除き、沈殿にDMSOを加えて、生成したホルマザン結晶を溶解した。攪拌後、自動吸光度計 (EAR 340 AT, SLT, Vienna, Austria) を用いて、波長660nmのOD値を対照として560nmにおけるOD値を測定した。この値を用いて生存曲線を描き、50%細胞増殖阻害濃度 (drug concentration inhibiting cell growth by 50%, IC₅₀) を求めて薬剤感受性の指標とした。試験は異なった日に3回以上行い、その平均値を求めて測定値とした。

IV. 細胞増殖阻害作用に対する薬剤併用効果の判定

細胞増殖阻害作用に対する薬剤併用効果を評価するため、Steelら¹¹⁾の方法に従ってアイソボグラムを作成した。すなわち前述の細胞生存曲線よりE6123単独の場合、CDDP単独の場合での、IC₅₀, IC₄₀, IC₃₀, IC₂₀, IC₁₀を求め、これをそれぞれのIC₅₀で除した値を算出した。この値をE6123の場合はAとし、CDDPの場合はBとした。1-A, 1-Bを求めグラフ上にx軸にA, y軸に1-Bをプロットして曲線を描いた。また、同グラフ上に、1-Aをx軸に、Bをy軸にプロットした曲線を描いた。さらにIC₄₀, IC₃₀, IC₂₀, IC₁₀を示す濃度のE6123を併用した場合に、両薬剤で50%の増殖阻害を起こすのに必要なCDDPの濃度、すなわちIC_{10.7}, IC_{28.6}, IC_{37.5}, IC_{44.4}を単独の生存曲線より求め、これをIC₅₀で除した値をB'とした。B'をx軸に、先に求めたAをy軸にプロットして曲線を描いた。さらに薬剤未処理細胞をコントロールとし、CDDP 10 μ M, 30 μ M, 100 μ M, 300 μ Mと併用した場合に、両薬剤併用で増殖阻害を起こすのに必要なE6123の濃度を求め、これをE6123単独でのIC₅₀で除した値を算出した。また、CDDP単独でのIC₅₀で10 μ M, 30 μ M, 100 μ M, 300 μ Mを除した値を求め、それぞれを前述のグラフ上にプロットした。先の3本の曲線で囲まれる範囲内に、これらの点が存在する場合を相加効果、曲線下方に存在する場合を相乗効果、曲線上方に存在する場合を相反効果があると判定した。

V. 細胞内CDDP蓄積量の測定

175mm²フラスコ (Falcon) を用いて培養した増殖期にある細胞 5×10^7 個/mlに、最終濃度100 μ Mまたは300 μ MのE6123もしくは溶媒を添加し、さらに最終濃度50 μ MのCDDPを追加して、培養器内にて2時間培養した。その後、水冷したPBSにて2回洗浄した。回収した細胞をソニケーター (SONIFIER 250, Branson, Danbury, CT., USA) を用いて破碎し、原子吸光法にて細胞内プラチナ含量を測定した。

VI. GSH含量およびGST活性の測定

細胞内の薬剤解毒機構に関与するGSH含量とGST活性を測

定した。

各細胞株は175mm³フラスコ (Falcon) にて培養したものを3検体に分け、それぞれ最終濃度100 μ Mまたは300 μ MのE6123もしくは溶媒を添加して培養器内で2時間培養した。その後、氷冷したPBSで2回洗浄して細胞を回収した。GSH量は、Griffith¹⁸⁾の方法を用いて測定した。すなわち細胞にリン酸EDTA溶液 (125 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄, 6.3 mM Na₂EDTA) を300 μ l加えてソニケーターを用いて破碎した。破碎後の検体300 μ lに12%スルフォサリチル酸100 μ lを加え、2時間氷冷した。4°C, 14000回転/分, 15分間の遠心後、吸光度測定容器に上清100 μ lを0.3 mM NADPH, 500 mM KH₂PO₄, 6 mM 5,5'-ジチオビス-2-ジニトロベンゼン, および0.5単位のグルタチオン還元酵素からなる反応液に加え、波長412 nmの吸光度を測定した。既知濃度のGSH溶液により標準曲線を描き、この曲線を用いてGSH量を定量した。GST活性は、Habigら¹⁹⁾の方法を用いて測定した。すなわち、GSH量の測定時と同様のペレットに1 M KH₂PO₄ 500 μ lを加えてソニケーターを用いて破碎した。4°C, 14000回転/分にて10分間遠心し、上清300 μ l, 1 mM GSH 300 μ l, および1 mM 1'-クロロ-2,4-ジニトロベンゼン 60 μ lを吸光度測定容器に入れ混和して、波長340 nmの吸光度を測定した。

Ⅶ. アポトーシスの解析

ヒストン結合DNA断片 (モノヌクレオソーム, オリゴヌクレオソーム) を光度計を用いて検出するエンザイムイムノアッセイ (細胞死検出キット, ベーリンガーマンハイム, 東京) を用いてアポトーシスを定量化した。ヒストン結合DNA断片はアポトーシスの際に細胞質に遊離する²⁰⁾²¹⁾。1 \times 10⁵個/mlに調整した細胞浮遊液500 μ lに、最終濃度100 μ M, または300 μ MのE6123と、最終濃度50 μ Mまたは250 μ MのCDDPを添加し、2時間培養器内に静置した後、遠心、洗浄し、薬剤を含まない培養液を加えて24時間培養した。その後、洗浄したペレットをインキュベーション用緩衝液に浮遊して溶解し、細胞質分画である上清を採取した。ヒストンに対する抗体をマイクロタイタープレートに吸着させ、前述の上清を100 μ l添加した。次に、抗DNA-ペルオキシダーゼをヌクレオソームのDNA部分と反応させ、ペルオキシダーゼの量をABTS (2,2'-azino-di-[3ethylbenzthiazoline sulfonate(6)]) を基質に発光させて吸光度計を用いて測定した。薬剤処理した細胞のペルオキシダーゼ量を未処理の細胞ペルオキシダーゼ量で除した値を% increaseと

してアポトーシスの指標とした。

Ⅷ. カスパーゼの測定

アポトーシス誘導を決定するプロテアーゼであるカスパーゼファミリープロテアーゼとして、カスパーゼ1, カスパーゼ2, カスパーゼ3の発現をウェスタンブロットリング法を用いて半定量した。細胞をCDDP 250 μ M, E6123 300 μ M, または両者に2時間曝露した。培養後、氷冷したPBSで2回洗浄して細胞を回収した。回収した細胞を溶解液[20 mM Tris (pH 7.6), 10 mM EDTA (pH 7.6), 10 mM MgCl₂, 5 mg/ml Na₃VO₄, 2 mM dithiothreitol, 1 mg/ml NaF, 100 mg/ml β -glycerophosphate (Sigma), 10 U/ml aprotinin (Sigma), 1 mM phenylmethylsulfonylfluoride (和光)]に浮遊させ、凍結と融解を4回繰り返して細胞を破壊し、15000回転/分にて15分間遠心した。蛋白が抽出された上清とトリスSDSセパラゾール (0.25 M Tris-HCl, 2% SDS, 30% glycerol, 0.01% bromophenol blue, 第一化学薬品, 東京) を等量混合して95°Cで5分間加熱して、蛋白を変性させた。1レーン当たり30 μ gとなるように蛋白量を調整して10/20 SDSポリアクリルアミドゲル (第一化学薬品) で、60 mAにて電気泳動した。泳動後54 mAで60分間イモビロンPVDFメンブレン (第一化学薬品) に転写させた。このメンブレンを5% スキムミルクを加えた1% Tween20 (和光) 入りトリス塩酸緩衝液 (Tris-buffered saline-Tween 20, TBS-T) (20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 125 mM NaCl, 1% Tween20, TBS-T) にてブロッキング後、1次抗体の抗カスパーゼ1抗体 (Santa Cruz Biotechnology, California, USA), 抗カスパーゼ2抗体 (Transduction Laboratories, Lexington, USA) および抗カスパーゼ3抗体 (Transduction Laboratories) に曝露した。十分量のTBS-Tで10分間、3回洗浄後、5% スキムミルク加TBS-T溶液に溶解させた2次抗体のHRP標識抗ウサギIgG抗体 (Sigma), またはHRP標識抗マウスIgG抗体 (Sigma) に曝露した。再度TBS-Tで10分間、3回洗浄し、ECL (アマシャムジャパン, 東京) にて発色させて撮影した。

Ⅸ. 蛋白質濃度の定量

細胞内CDDP蓄積量, GSH含量, GST活性の測定およびウェスタンブロットリング法においては各群間の蛋白質濃度を一定としたが、その蛋白質濃度の測定はBCAプロテインアッセイキット (Pierce, Rockford, USA) を用いて行った。

X. 統計学的解析

統計学的検討は、対応のないStudentのt検定を用いて2群間

Table 1. E6123 modulation of platinum sensitivity of PC-9 and PC-9/CDDP cell lines

Cell line	IC ₅₀ value ^{a)} (μ M)		Sensitizing effect ^{b)}
	Vehicle	E6123 (500 μ M)	
PC9	7.57 \pm 0.18	0.62 \pm 0.20	12.2
PC9/CDDP	188.84 \pm 85.11	42.08 \pm 25.19	4.5

^{a)} Each value is shown by the \bar{x} \pm SD of the three times independent experiments.

^{b)} Sensitizing effect is IC₅₀ value of control cells/IC₅₀ value of treated cells.

* p < 0.05 compared with the value for the cells treated with vehicle.

検定を行い、危険率5%未満を有意差ありと判定した。数値は $\bar{x} \pm SD$ で表した。

成 績

I. E6123のCDDP感受性に及ぼす影響

細胞増殖阻害試験を用いて評価した、E6123によるCDDP感受性増強効果の成績を表1に示す。E6123処理によってCDDPのIC₅₀は、PC-9では7.57 ± 0.18 μMから0.62 ± 0.20 μMへと12.2倍に、PC-9/CDDPでは188.84 ± 85.11 μMから42.08 ± 25.19 μMへと4.5倍に、有意に(それぞれp < 0.05)感受性は増

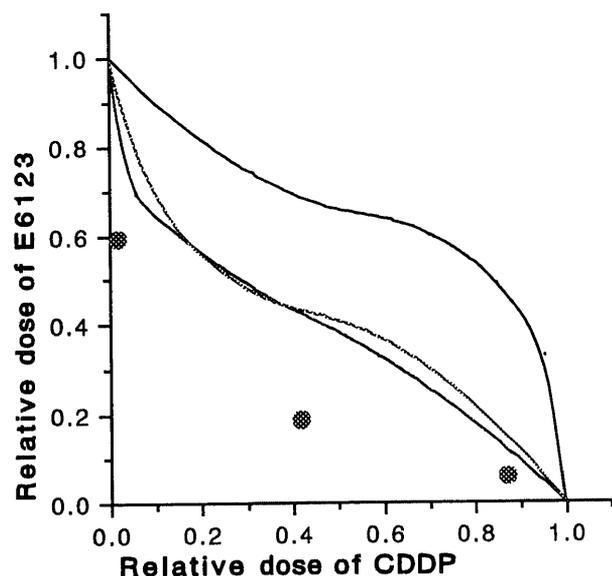


Fig. 2. Isobologram analysis in PC-9 cell line. Data points on the left side of envelope indicate that the effect of E6123 on the CDDP sensitivity is supra-additive.

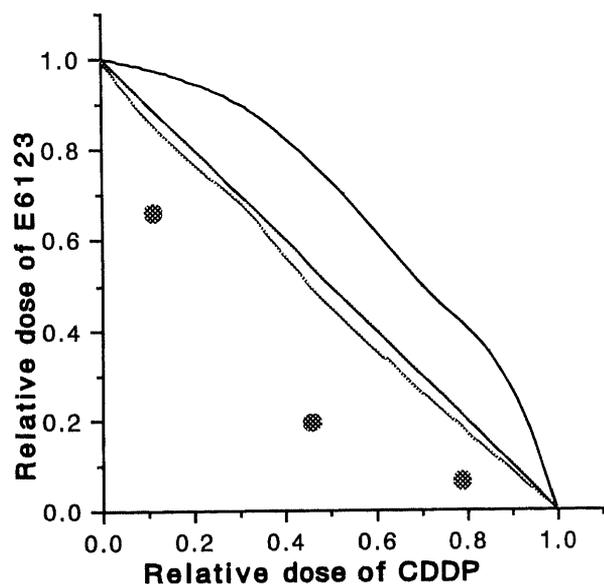


Fig. 3. Isobologram analysis in PC-9/CDDP cell line. Data points on the left side of envelope indicate that the effect of E6123 on the CDDP sensitivity is supra-additive.

強した。

II. 細胞増殖阻害作用に関する薬剤併用の相加相乗相反効果の判定

E6123とCDDPの相加相乗相反効果を検討するためにアインボログラムを作成した。PC-9におけるアインボログラムを図2に示す。各ドットは3曲線の左下方に位置し、両薬剤には相乗効果が認められた。PC-9/CDDPにおけるアインボログラムの結果を図3に示す。各ドットは3曲線の左下方に位置し、両薬剤には相乗効果が認められた。

III. 細胞内CDDP蓄積量の検討

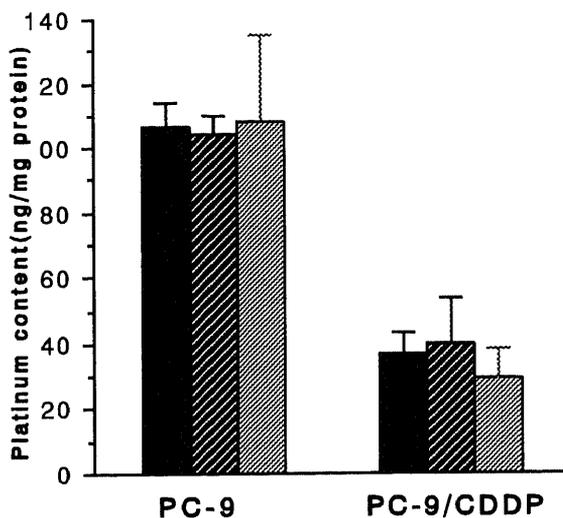


Fig. 4. Accumulation of platinum in PC-9 and PC-9/CDDP cell lines. Each group were treated with 50 μM CDDP and no E6123 or 100 μM or 300 μM E6123 for 2 hr. ■, no E6123; ▨, 100 μM of E6123; ▩, 300 μM of E6123.

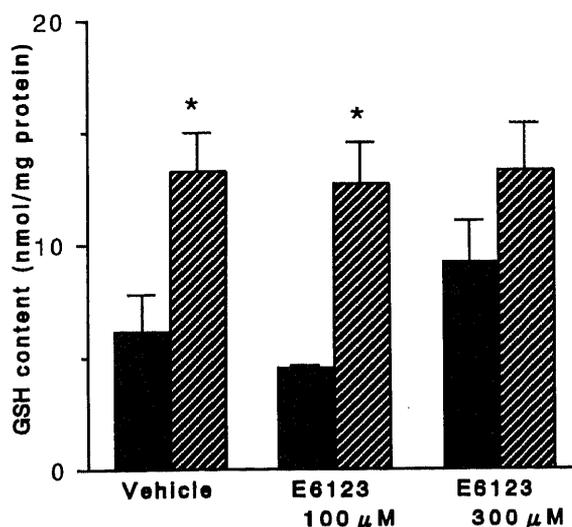


Fig. 5. GSH content in PC-9 and PC-9/CDDP cell lines. Each group were treated with no E6123 or 100 μM or 300 μM E6123 for 2 hr. ■, PC-9; ▨, PC-9/CDDP. *p < 0.05 compared with the value for the PC-9 cells.

細胞内CDDP蓄積量に与えるE6123の影響の成績を図4に示す。PC-9, PC-9/CDDPのいずれの細胞株においても, E6123投与によって細胞内CDDP蓄積量に有意な変化は認められなかった。

IV. GSH含量, GST活性の測定

E6123の細胞GSH含量に与える影響を検討した成績を図5に示す。GSH含量は, E6123未処理では, PC-9の 6.1 ± 1.8 nmol/mg蛋白質に比しPC9/CDDPでは 13.3 ± 2.0 nmol/mg蛋白質に ($p < 0.05$), $100 \mu\text{M}$ のE6123処理ではPC-9の 4.5 ± 0.1

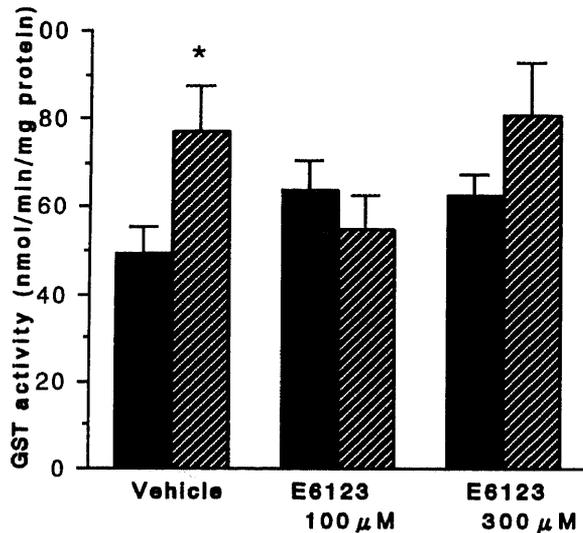


Fig. 6. GST activity in PC-9 and PC-9/CDDP cell lines. Each group were treated with no E6123 or $100 \mu\text{M}$ or $300 \mu\text{M}$ E6123 for 2 hr.

■, PC-9; ▨, PC-9/CDDP.

* $p < 0.05$ compared with the value for the PC-9 cells.

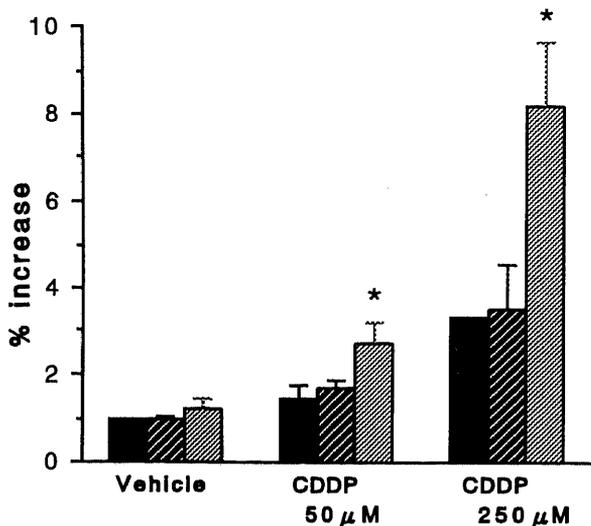


Fig. 7. Induction of apoptosis in PC-9 cell line. Each group were treated with no CDDP or $50 \mu\text{M}$ or $250 \mu\text{M}$ CDDP and no E6123 or $100 \mu\text{M}$ or $300 \mu\text{M}$ E6123 for 2 hr.

■, vehicle; ▨, $100 \mu\text{M}$ of E6123; ▩, $300 \mu\text{M}$ of E6123.

* $p < 0.05$ compared with the value for the cells treated with vehicle.

nmol/mg蛋白質に比しPC-9/CDDPでは 12.7 ± 1.9 nmol/mg蛋白質 ($p < 0.05$) と, PC-9/CDDPにおいて有意に増加していた。しかしE6123処理はPC-9, PC-9/CDDPのいずれの細胞株においてもGSH含量を有意に変化させなかった。

同じく, 細胞GST活性の成績を図6に示す。GST活性は, E6123未処理ではPC-9の 49.5 ± 5.6 nmol/min/mg蛋白質に比しPC-9/CDDPでは 77.6 ± 10.2 nmol/min/mg蛋白質 ($p < 0.05$) と, PC-9/CDDPにおいて有意に増加していた。しかしE6123処理は, PC-9, PC-9/CDDPのいずれの細胞株においてもGST活性を有意に変化させなかった。

V. アポトーシスの誘導

CDDPによるPC-9のアポトーシス誘導に対するE6123の影響について調べた。E6123処理によってPC-9のアポトーシスは有意 ($p < 0.05$) に増強した (図7)。同様にE6123処理によってPC-9/CDDPのアポトーシスも有意 ($p < 0.05$) に増強した (図8)。

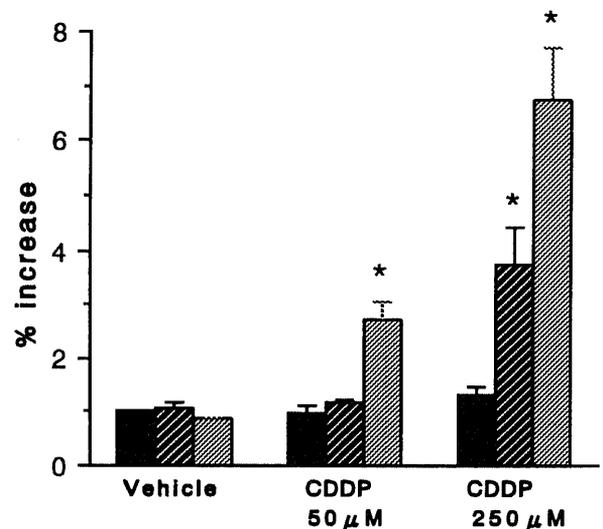


Fig. 8. Induction of apoptosis in PC-9/CDDP cell line. Each group were treated with no CDDP or $50 \mu\text{M}$ or $250 \mu\text{M}$ CDDP and no E6123 or $100 \mu\text{M}$ or $300 \mu\text{M}$ E6123 for 2 hr.

■, vehicle; ▨, $100 \mu\text{M}$ of E6123; ▩, $300 \mu\text{M}$ of E6123.

* $p < 0.05$ compared with the value for the cells treated with vehicle.

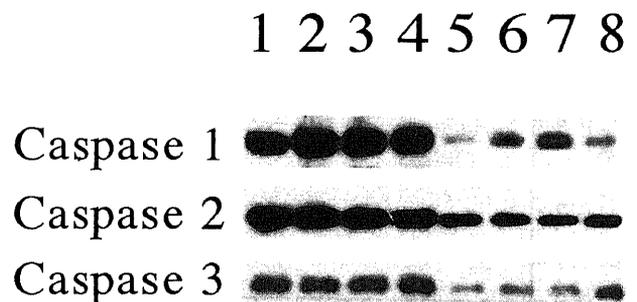


Fig. 9. Western blotting analysis of caspase 1, caspase 2, caspase 3. Lane 1-4, PC-9; lane 5-8, PC-9/CDDP. Lanes 1 and 5, treated with vehicle; lanes 2 and 6, treated with $300 \mu\text{M}$ of E6123; lanes 3 and 7, treated with $250 \mu\text{M}$ of CDDP; lanes 4 and 8, treated with $300 \mu\text{M}$ of E6123 and $250 \mu\text{M}$ of CDDP.

VI. カスパーゼ1, 2, 3の発現

カスパーゼ1, カスパーゼ2およびカスパーゼ3の発現をウエスタンブロッティング法を用いて検討した成績を図9に示す。各細胞株とも、45 kDaに認められるカスパーゼ1の発現はE6123処理によってコントロールに比して有意に増加した。またCDDP処理, E6123とCDDP両薬剤の処理によっても、カスパーゼ1の発現は有意に増加した。カスパーゼ2とカスパーゼ3の発現はE6123処理, CDDP処理さらにE6123とCDDP両薬剤の処理によっても変化しなかった。

考 察

本研究では、ヒト肺腺癌細胞株 PC-9の CDDP感受性、およびCDDP誘導性アポトーシスに対するPAF受容体拮抗薬の影響とその機序を解明する目的で、PAF受容体拮抗薬 E6123がCDDP感受性規定因子、およびCDDP誘導性アポトーシスに与える影響を検討した。E6123はCDDP感受性を増強させ、その機序として、カスパーゼ1の発現を介するCDDP誘導性アポトーシスの増強作用が重要であることが示唆され、CDDPの細胞内蓄積量、GSH含量およびGST活性に対する影響は否定的であった。

肺癌化学療法の際を握るCDDPの感受性を規定するのは薬剤の細胞内蓄積と排出機構が主要な因子である。Na⁺, K⁺ ATPaseはCDDPの細胞内への能動輸送を司る。Andrewsら⁹⁾は卵巣癌細胞株2008とそのCDDP耐性株におけるCDDPの細胞内蓄積量を検討し、CDDP耐性株は親株に比してNa⁺, K⁺ ATPase活性が低下すること、Na⁺, K⁺ ATPase阻害薬であるウアバイン投与によりCDDPの細胞内蓄積量が低下することを報告した。また、CDDPの細胞外への薬剤排出には解毒機構を担うGSH, GST, メタロチオネインおよびプロテインキナーゼC等が関与するが、Fujiwaraら⁸⁾はCDDP耐性株PC-9/CDDPではGSHが増加していることを報告し、Kasaharaら¹⁰⁾はCDDP耐性ヒト小細胞肺癌細胞株において、メタロチオネイン量が耐性度と比例して増加していることを報告した。Grunickeら⁶⁾は、プロテインキナーゼC阻害薬がCDDP感受性を改善させることを報告した。

近年、CDDPの感受性に対する脂質メディエーターの関与を示唆する報告が散見され、Kasaharaら²⁹⁾はヒト肺癌細胞株において、トロンボキサン受容体拮抗薬S-1452の投与によってCDDPの感受性が亢進し、その機序としてNa⁺, K⁺ ATPase活性の増加を報告した。また坂東ら²⁹⁾は、トロンボキサン受容体拮抗薬がヒト非小細胞肺癌細胞株においてCDDP感受性を改善させるが小細胞肺癌細胞株においては感受性に影響を与えず、これが非小細胞肺癌と小細胞肺癌における臨床上的化学療法に対する反応性の違いであると考察した。

脂質メディエーターの一つであるPAF受容体拮抗薬に関しては、抗癌薬感受性に関する報告はないものの、先述の抗腫瘍活性を有するという報告¹⁰⁾、Maggiら²⁴⁾のヒト子宮内膜癌細胞株HEC-1AにおいてPAFが産生されており、PAF受容体拮抗薬L659,989によってその産生は抑制され、細胞増殖も阻害されたという報告、前述のNa⁺, K⁺ ATPase, プロテインキナーゼCに対する影響に関する報告¹²⁾¹³⁾がある。

本研究では、PAF受容体拮抗薬 E6123がヒト肺腺癌細胞株のCDDP感受性を増強させた機序として、CDDPの細胞内蓄積、GSH含量、およびGST活性には有意な変化を認めなかったこ

とから、E6123がNa⁺, K⁺ ATPase活性の低下や解毒機構の不活化を介して感受性を増強した可能性は否定された。

近年、抗癌薬による癌細胞のアポトーシス誘導が注目されており²⁵⁻²⁹⁾、Ormerodら²⁸⁾はCDDPがヒト卵巣癌細胞株のアポトーシスを誘導することを報告し、Henkelsら³⁰⁾はCDDP感受性卵巣癌細胞株 A2780, CDDP耐性株 CP70, およびC30のいずれにおいても、CDDPはアポトーシスを誘導することを報告した。またToledano³¹⁾らは、ヒトリンパ芽球細胞株においてPAFがオキシダントを介して細胞のアポトーシスを抑制すること、その抑制がPAF受容体拮抗薬WEB 2170によって阻害されることを報告しており、本研究の結果と同様に、PAFとアポトーシス制御の関連を示唆しており興味深い。

以上の報告からはE6123によるCDDP感受性増強効果がCDDPの細胞内蓄積や排出機構の変化を介する可能性や、抗腫瘍活性の変化に基づく可能性が示唆されたものの、本実験系においては、E6123がCDDPによる癌細胞のアポトーシス誘導を増強させることがCDDPの感受性を改善させた主因であると考えられた。

アポトーシス誘導には各種のプロテアーゼが関与し、その中でもカスパーゼファミリーはアポトーシス決定から実行に至るまでの過程で重要な役割を果たしている³⁴⁻³⁷⁾。本研究では、E6123によってCDDPによる癌細胞のアポトーシス誘導が有意に増強したことより、そのアポトーシス誘導増強効果の機序を明らかにする目的で、アポトーシス関連蛋白であるカスパーゼファミリーの中のカスパーゼ1, 2, 3に関して検討を加えた。その結果、両細胞株とも45 kDaに認められるカスパーゼ1の発現がE6123によって有意に増強したが、カスパーゼ2とカスパーゼ3の発現には変化を認めなかった。殺細胞効果を認めない濃度のE6123によって誘導されたカスパーゼ1がCDDPによる癌細胞のアポトーシスを増強させるシグナルを発生し、これがCDDPによる癌細胞のアポトーシス実行段階に伝達される可能性が推察された。

アポトーシスの誘導、実行の主経路であるカスパーゼカスケードの最終実行段階には、カスパーゼ3の役割が重要であるとの報告も散見される³⁸⁻⁴¹⁾。しかし本研究では、カスパーゼ3の発現に変化を認めなかったことより、カスパーゼ3を介さず、カスパーゼ1自体から実行されるカスパーゼカスケードの存在が推察された。Gansaugeら⁴²⁾は、腫瘍細胞において45kDaに認められるカスパーゼ1前駆体の発現量が正常細胞と比較して増加していること、活性型の発現量は極めて僅かであり培養時間により左右され、45 kDaに認められるカスパーゼ1前駆体の発現量こそが正常細胞と比較して癌細胞で認められる主な差異であり重要であると報告した。またKondoら⁴³⁾は、神経膠芽腫細胞株のCDDP誘導性アポトーシスにおけるカスパーゼ1の発現の重要性を報告している。本研究の結果からも、カスパーゼ1前駆体の発現が細胞死に重要な意味を有するシグナルである可能性が示唆され、カスパーゼ1の周辺または上、下流のシグナルの解析が望まれる。

本研究では、前述のPAF受容体拮抗薬が直接的に抗腫瘍活性を示した報告¹⁰⁾と比べ、細胞増殖に影響しない濃度のE6123がCDDPにより誘導されるアポトーシスを増強した点が大変興味深い。前述のBrutonら¹⁰⁾による抗腫瘍活性の検討においても、SDZ 62-434では認められた抗腫瘍効果がWEB2086では認められず、PAF受容体機能を介さない別の経路の関与を示唆しているが、

本研究のE6123によるCDDPの感受性増強効果と癌細胞のアポトーシス増強効果についても、PAF受容体機能を介さない経路が関与している可能性があり、抗癌薬感受性改善薬としてのPAF受容体拮抗薬 E6123の薬効と薬理動態に関する検討が今後のさらなる課題と思われる。

結 論

ヒト肺腺癌細胞株 PC-9のCDDP感受性とCDDP誘導性アポトーシスに対するPAF受容体拮抗薬 E6123の影響を検討し、以下の結論を得た。

1. ヒト肺腺癌細胞株 PC-9およびその耐性株 PC-9/CDDPにおいて、E6123はCDDP感受性を増強した。
2. E6123処理によって、細胞内CDDP蓄積量、GSH含量、およびGST活性の変化は認められなかった。
3. CDDP感受性増強の機序として、E6123処理によってCDDPによる癌細胞のアポトーシス誘導が増強されることが一因と考えられた。
4. E6123により増加したカスパーゼ1のシグナル伝達が、CDDPによる癌細胞のアポトーシス誘導の増強に関与する可能性が示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました恩師松田 保教授に深甚なる謝意を表します。終始、直接御指導いただきました金沢大学医学部附属病院第三内科藤村政樹講師、笠原寿郎助手、坂東琢磨博士に心より感謝の意を捧げます。また、御協力いただきました第三内科教室員各位に厚く御礼申し上げます。

尚、本研究の要旨の一部は、第57回日本癌学会総会(横浜, 1998年10月)、第39回日本肺癌学会総会(金沢, 1998年10月)において発表した。

文 献

- 1) Andrews PA, Mann SC, Huynh HH, Albright KD. Role of the Na^+ , K^+ ATPase-adenosine triphosphatase in the accumulation of cis-diamminedichloroplatinum (II) in Human ovarian carcinoma cells. *Cancer Res* 51: 3677-3681, 1991
- 2) Ohmori T, Morikage T, Sugimoto Y, Fujiwara Y, Kasahara K, Nisio K, Ohta S, Sasaki Y, Takahashi T, Saijo N. The mechanism of the difference in cellular uptake of platinum derivatives in non-small cell lung cancer cell line (PC-14) and its cisplatin-resistant subline (PC-14/CDDP). *Jpn J Cancer Res* 84: 83-92, 1993
- 3) Ohmori T, Nisio K, Ohta S, Kubota N, Adachi M, Komiya K, Saijo N. Ouabain-resistant non-small-cell lung cancer cell line shows collateral sensitivity to cis-diamminedichloroplatinum (II) (CDDP). *Int J Cancer* 57: 111-116, 1994
- 4) Gately DP, Howell SB. Cellular accumulation of the anticancer agent cisplatin: a review. *Br J Cancer* 67: 1171-1176, 1983
- 5) Perego P, Casati C, Gambetta RA, Soranzo S, Zunino F. Effect of Modulation of protein kinase C activity on cisplatin cytotoxicity in cisplatin-resistant and cisplatin-sensitive human osteosarcoma cells. *Cancer Letters* 72: 53-58, 1993
- 6) Grunicke H, Hofmann J, Utz I, Uberall F. Role of protein kinases in antitumor drug resistance. *Ann Hematol* 69: S1-S6, 1994

- 7) Basu A, Lazo JS. Sensitization of human cervical carcinoma cells to cis-diamminedichloroplatinum (II) by Bryostatin 1. *Cancer Res* 52: 3119-3124, 1992
- 8) Fujiwara Y, Sugimoto Y, Kasahara K, Bungo M, Yamakido M, Tew KD, Saijo N. Determinants of drug response in a cisplatin-resistant human lung cancer cell line. *Jpn J Cancer Res* 81: 527-535, 1990
- 9) Tew KD, Bomber AM, Hoffman SJ. Etacrynic acid and piroprost as enhancers of cytotoxicity in drug resistant and sensitive cell lines. *Cancer Res* 48: 3622-3625, 1988
- 10) Kasahara K, Fujiwara Y, Nisio K, Ohmori T, Sugimoto Y, Komiya K, Matsuda T, Saijo N. Metallothionein content correlates with the sensitivity of human small cell lung cancer cell lines to cisplatin. *Cancer Res* 51: 3237-3242, 1991
- 11) Eastman A, Schulte N. Enhanced DNA repair as a mechanism of resistance to cis-diamminedichloroplatinum (II). *Biochemistry* 27: 4730-4734, 1988
- 12) Catalan RE, Martinez AM, Aragonés MD, Fernandez I, Miguel BG, Calcerrada MC, Perez MJ. Platelet activating factor inhibits Na^+ , K^+ ATPase activity in rat brain. *Neurosci Res* 19: 241-244, 1994
- 13) Larive'e P, Levine SJ, Martinez A, Wu T, Logun C, Shelhamer JM. Platelet-activating factor induces airway mucin release via activating of protein kinase C to membranes. *Am J Respir Cell Mol Biol* 11: 199-205, 1994
- 14) Bruton VG, Workman P. In vitro antitumor activity of the novel imidazoisoquinoline SDZ 62-434. *Br J Cancer* 67: 989-995, 1993
- 15) Danhauser-Riedl S, Felix SB, Houlihan WJ, Zafferani M, Steinhauser G, Oberberg D, Kalvelage H, Busch R, Rastetter J, Berdel WE. Some antagonists of platelet activating factor are cytotoxic for human malignant cell line. *Cancer Res* 51: 43-48, 1991
- 16) Sandval D, Gukovskaya A, Reavey P, Gukovsky S, Sisk A, Braquet P, Pandol SJ, Poucell-Hatton S. The role of neutrophils and platelet-activating factor in mediating experimental pancreatitis. *Gastroenterology* 111: 1081-1091, 1996
- 17) Steel GG, Peckman MJ. Exploitable mechanisms in combined radiotherapy-chemotherapy: the concept of additivity. *Int J Radiat Oncol* 5: 85-91, 1979
- 18) Griffith OW. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal Biochem* 106: 207-212, 1980
- 19) Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases. *J Biol Chem* 249: 7130-7139, 1974
- 20) Burgoyne LA, Hewish DR, Mobbs J. Mammalian chromatin substructure studies with the calcium-magnesium endonuclease and two-dimensional polyacrylamide-gel electrophoresis. *Biochem J* 143: 67-72, 1974
- 21) Duke RC, Cohen JJ. IL-2 Addiction: Withdrawal of growth factor activates a suicide program in dependent T cells. *Lymphokine Res* 5: 289-299, 1986
- 22) Kasahara K, Fujimura M, Bando T, Shibata K, Shirasaki H, Matsuda T. Modulation of sensitivity to cis-diammine-

- dichloroplatinum (II) by thromboxane A2 receptor antagonists in non-small-cell lung cancer cell lines. *Br J Cancer* 74: 1553-1558, 1996
- 23) 坂東琢磨. ヒト肺癌培養細胞株のシスプラチン耐性機構におけるトロンボキサン受容体の役割. *十全医会誌* 104: 750-757, 1995
- 24) Maggi M, Bonaccorsi L, Finetti G, Carloni V, Muratori M, Laffi G, Forti G, Serio M, Baldi E. Platelet-activating factor mediates an autocrine proliferative loop in the endometrial adenocarcinoma cell line HEC-1A. *Cancer Res* 54: 4777-4784, 1994
- 25) Ohmori T, Podack ER, Nishio K, Takahashi M, Miyahara Y, Takeda Y, Kubota N, Funayama Y, Ogasawara H, Ohira T, Ohta S, Saijo N. Apoptosis of lung cancer cells caused by some anti-cancer agents (MMC, CPT-11, ADM) is inhibited by bcl-2. *Biochem Biophys Res Commun* 192: 30-36, 1993
- 26) Evans DL, Dive C. Effects of cisplatin on the induction of apoptosis in proliferating hepatoma cells and nonproliferating immature thymocytes. *Cancer Res* 53: 2133-2139, 1993
- 27) Kataoka S, Naito M, Tomida A, Tsuruo T. Resistance to antitumor agent-induced apoptosis in a mutant of human myeloid leukemia U937 cells. *Exp Cell Res* 215: 199-205, 1994
- 28) Ormerod MG, O'Neill CF, Robertson D, Harraps KR. Cisplatin induces apoptosis in a human ovarian carcinoma cell line without concomitant internucleosomal degradation of DNA. *Exp Cell Res* 211: 231-237, 1994
- 29) Chen Z, Naito M, Mashima T, Tsuruo T. Activation of actin-cleavable interleukin 1 β -converting enzyme (ICE) family protease CPP-32 during chemotherapeutic agent-induced apoptosis in ovarian carcinoma cells. *Cancer Res* 56: 5224-5229, 1996
- 30) Takeda M, Kobayashi M, Shirato I, Osaki T, Endou H. Cisplatin-induced apoptosis of immortalized mouse proximal tubule cells is mediated by interleukin-1 β converting enzyme (ICE) family proteases but inhibited by overexpression of bcl-2. *Arch Toxicol* 71: 612-621, 1997
- 31) Henkels KM, Turchi JJ. Induction of apoptosis in cisplatin-sensitive and -resistant human ovarian cancer cell lines. *Cancer Res* 57: 4488-4492, 1997
- 32) Semiya H, Mashima T, Toho M, Tsuruo T. c-Jun NH2-terminal kinase-mediated activation of interleukin-1 converting enzyme/CED-3-like protease during anticancer drug induced apoptosis. *J Biol Chem* 272: 4631-4636, 1997
- 33) Toledano B, Bastien Y, Noya F, Baruchel S, Mazer B. Platelet-activating factor abrogates apoptosis induced by cross-linking of the surface IgM receptor in a human B lymphoblastoid cell line. *J Immunol* 158: 3705-3715, 1997
- 34) Miura M, Zhu H, Rotello R, Hartweig EA, Yuan J. Induction of apoptosis in fibroblasts by IL- β -converting enzyme, a mammalian homolog of the *C. elegans* cell death gene ced-3. *Cell* 75: 653-660, 1993
- 35) Ibrado AM, Huang Y, Fang G, Liu L, Bhalla K. Overexpression of bcl-2 or bcl-xL inhibits Ara-C-induced CPP32/Yama protease activity and apoptosis of human acute myelogenous leukemia HL-60 Cells. *Cancer Res* 56: 4743-4748, 1996
- 36) Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 326: 1-16, 1997
- 37) Henkart PA. ICE family proteases: mediators of all apoptotic cell death?. *Immunity* 4: 195-201, 1998
- 38) Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: Requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86: 147-157, 1996
- 39) Erhardt P, Cooper GM. Activation of the CPP32 apoptotic protease by distinct signaling pathways with differential sensitivity to bcl-xL. *J Biol Chem* 271: 17601-17604, 1996
- 40) Armstrong RC, Aja T, Xiang J, Gaur S, Krebs JF, Hoang K, Bai X, Korsmeyer SJ, Karanewsky DS, Fritz LC, Tomaselli KJ. Fas induced activation of the cell death-related protease CPP32 is inhibited by bcl-2 and by ICE family protease inhibitors. *J Biol Chem* 271: 16850-16855, 1996
- 41) Missec C, Dutilleul V, Fassy F, Dju-Hercend. Evidence for CPP32 activation in the absence of apoptosis during T Lymphocyte stimulation. *J Biol Chem* 272: 13459-13462, 1997
- 42) Gausauge S, Gausauge F, Yang Y, Muller J, Seufferlein T, Ramadani M, Beger HG. Interleukin 1 β -converting Enzyme (Caspase-1) Is overexpressed in adenocarcinoma of the pancreas. *Cancer Res* 58: 2703-2708, 1997
- 43) Kondo S, Barna BP, Morimura T, Takeuchi J, Yuan J, Akbasak A, Barnett GH. Interleukin-1 β -converting enzyme mediates cisplatin induced apoptosis in malignant glioma cells. *Cancer Res* 55: 6166-6171, 1995

Effect of a Platelet Activating Factor Receptor Antagonist on Sensitivity to Cis-diamminedichloroplatinum (II) in Human Pulmonary Adenocarcinoma Cell Lines Utako Heki, Department of Internal Medicine (III), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — J. Juzen Med Soc., **108**, 224 — 232 (1999)

Key words lung cancer, cis-diamminedichloroplatinum (II), platelet activating factor receptor antagonist, apoptosis, caspase

Abstract

Drug resistance to anticancer agents is one of the major causes of cancer treatment failure. The purpose of this study was to evaluate the effect of a platelet activating factor receptor antagonist, (S)-(+)-6-(2-chlorophenyl)-3-cyclopropanecarbonyl-8,1-dimethyl-2,3,4,5-tetrahydro-8H-pyrido(4',3:4,5)thieno(3,2-f)(1,2,4)triazolo(4,3-a)(1,4)diazepine (E6123), on the sensitivity to cis-diamminedichloroplatinum (II) (CDDP) and elucidate the mechanism of the E6123-induced sensitization in a human pulmonary adenocarcinoma cell line, PC-9 and PC-9/CDDP, a CDDP resistant subline. For PC-9 treated with E6123 at the maximum concentration that did not influence cell growth, the CDDP concentration that inhibited cell growth by 50% (IC_{50}) was $0.62 \pm 0.20 \mu M$, which compares to $7.57 \pm 0.18 \mu M$ without the E6123 treatment. The sensitivity to CDDP was thus 12.2-fold enhanced by the E6123 treatment ($p < 0.05$). For PC-9/CDDP, the IC_{50} to CDDP was $188.84 \pm 85.11 \mu M$ without the E6123 treatment, whereas it was $42.08 \pm 25.19 \mu M$ for treatment with $300 \mu M$ of E6123, a 4.5-fold enhancement of sensitivity to CDDP ($p < 0.05$). Analysis by isobologram showed that E6123 and CDDP had a synergic effect in each cell line. To assess the mechanism of sensitization by E6123, cellular platinum accumulation, intracellular glutathione content (GSH), glutathione-S-transferase activity (GST) and CDDP-induced apoptosis were evaluated. Cellular platinum accumulation was significantly higher in PC-9 cells but there was no significant change with E6123 treatment. Although GSH content and GST activity were inherently higher in PC-9/CDDP, there was no significant change caused by E6123 treatment. CDDP-induced apoptosis was enhanced by E6123 treatment in each cell line. As caspase proteases have been reported to play an important role in drug-induced apoptosis, caspase-1, caspase-2 and caspase-3 proteins were examined by Western blotting analysis. Expression of caspase-1, but not of caspase-2 and caspase-3, was enhanced by combined treatment with E6123 and CDDP in both the PC-9 and PC-9/CDDP cells. These results suggest that an overexpression of caspase-1 caused by the E6123 treatment enhances the death signal of CDDP-induced apoptosis, and that this is the mechanism of the synergic effect of E6123 and CDDP.