

Establishment of Mitomycin C-resistant Non-small Cell Lung Cell Cancer Cell Lines and the Mechanisms of Resistance

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/2297/9329

マイトマイシンC耐性ヒト非小細胞肺癌細胞株の樹立と その耐性獲得機構の検討

金沢大学医学部医学科内科学第三講座 (主任: 松田 保教授)

柴 田 和 彦

非小細胞肺癌におけるマイトマイシンC (mitomycin C, MMC) に対する耐性獲得の機序を明らかにするため, ヒト肺腺癌由来の細胞株PC-9を親株としてMMCに持続接触させることによりMMC耐性株, PC-9/MC2およびPC-9/MC4を樹立した。感受性試験の結果, 耐性株PC-9/MC2およびPC-9/MC4は, MMCに対して各々3.4倍, 5.9倍の耐性度を有していた。これらの耐性株は, 新規インドキノン系抗腫瘍物質EO9に対しては交差耐性を示したが, シスプラチン, ビンデシン, エトポシド, カルボコン, および新規MMC誘導体のKW-2149に対しては交差耐性を示さなかった。アドリアマイシンおよびメナジオンに対しては交差感受性を示した。細胞内の薬剤蓄積量は, 耐性株では親株の約60%に低下していた。細胞質内のDT-ダイアホラーゼ (DT-diaphorase, DTD) 活性はPC-9の 261.5 ± 92.7 nmol/分/mg 蛋白に対し, PC-9/MC2では 13.5 ± 3.2 , PC-9/MC4では 1.3 ± 0.6 に低下していた。NADH:チトクロームb₅還元酵素活性は2種の耐性株とともに親株に比べ有意に低下していた。DTDの選択的阻害剤であるジクマロールの付加により, PC-9のIC₅₀は約2倍に上昇したが, PC-9/MC4では変化がなかった。さらに, ジクマロールの付加はKW-2149に対する感受性には影響を与えなかったが, DTDに対する親和性が高いEO9に対する感受性は親株でも耐性株でも低下した。アルキル化能を持つ代謝産物の生成量は耐性株において耐性度の上昇とともに減少した。DTD活性の低下による薬剤の細胞内活性化の障害が, 比較的DTD活性の高いPC-9においては耐性獲得の機序として重要であると結論された。

Key words mitomycin C, DT-diaphorase, EO9, KW-2149, non-small cell lung cancer

マイトマイシンC (mitomycin C, MMC) は, 非小細胞肺癌に対して単剤で有効である数少ない抗癌剤の一種である。しかし, その耐性獲得機構についての報告は少ない。これまでに, P-糖蛋白の出現による薬剤排出の亢進¹⁾, DNA修復の亢進²⁾, 薬剤解毒機構の亢進³⁾などが報告され, 最近ではいくつかの報告で薬剤の細胞内での活性化の障害がMMCに対する耐性獲得に重要であることが示唆されている⁴⁾⁻⁷⁾。

MMCがその細胞毒性を発揮するためには, 細胞内で還元を受け活性化される必要がある⁸⁾。その還元反応として, キノン環の2個の酸素原子の一方が還元を受け, セミキノラジカルを生成する一電子還元経路¹⁰⁾¹¹⁾と, 両方が一度に還元され水酸化キノラジカルを生じる二電子還元経路¹²⁾⁻¹⁵⁾があるとされている。無あるいは低酸素の条件下では一電子還元が活性化経路として極めて重要とされているが¹⁰⁾¹¹⁾, 好氣的条件下では, セミキノラジカルが酸化を受けて不活化されるために, 相対的に二電子還元による活性化の比重が高まることが報告されている¹⁶⁾。一電子還元を媒介する酵素としては, キサンチン酸化酵素やNADPH:チトクロームP-450還元酵素が知られ¹⁰⁾¹¹⁾, 二電

子還元酵素としては, 以前よりDT-ダイアホラーゼ (DT-diaphorase, DTD) と呼ばれていたNAD(P)H:キノン酸化還元酵素¹⁷⁾¹⁸⁾や, NADH:チトクロームb₅還元酵素¹⁹⁾, キサンチン脱水素酵素¹³⁾が知られている。

肺癌細胞を用いた研究では, DTDの活性とMMC感受性が相関すると報告されているが²⁰⁾, 耐性株を用いてMMC耐性におけるDTDの意義を検討した報告は見当たらない。著者は, 非小細胞肺癌細胞株を用いてMMC耐性株を樹立し, その耐性機構, とくにDTDとの関連につき検討を加えた。

材料および方法

I. 試薬

RPMI1640 培地およびリン酸緩衝生理食塩水 (calcium-free and magnesium-free Dulbecco's phosphate-buffered saline, PBS) (pH 7.4) は, ニッスイ薬品工業 (東京) より購入した。ウシ胎児血清は三光純薬工業 (東京) より購入した。MMC, アドリアマイシン (adriamycin), 7-N-[2-[[2-(γ -L-グルタミルアミノ)-エチル]-ジチオ]-エチル]-マイトマイシンC (7-N-[2-[[2-(γ -L-glutamylamino)-

平成9年2月7日受付, 平成9年4月14日受理

Abbreviations: DIC, dicumarol; DTD, DT-diaphorase; EO9, 3-hydroxymethyl-5-aziridinyl-1-methyl-2-(H-indole-4,7-indione)-propenol; GSH, glutathione; GST, glutathione-S-transferase; MMC, mitomycin C; MTT, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; NSCLC, non-small cell lung cancer; PBS, calcium-free and magnesium-free Dulbecco's phosphate-buffered saline; TTBS, Tris-buffered saline with Tween 20

ethyl]-dithio]-ethyl]-MMC, KW-2149) および 3-水酸化メチル-5-アジリデニル-1-メチル-2-(H-インドール-4,7-インドイオン)-プロペノール (3-hydroxymethyl-5-aziridinyl-1-methyl-2-(H-indole-4,7-indione)-propenol, EO9) は協和発酵工業 (東京) より供与を受けた。³H-MMC は, Arai らによって報告された方法¹⁾により Amersham International (Buckinghamshire, England) で合成されたものを協和発酵工業より供与された。シスプラチン (cisplatin) およびエトポシド (etoposide) は日本化薬 (東京) より, カルボコン (carboquone) およびニムスチン (nimustin) は三共 (東京) より, ビンデシン (vindesine) は Lilly Research Laboratories (Indianapolis, USA) より, それぞれ供与を受けた。メナジオン (2-methyl-1,4-naphthoquinone, menadione), ジクマロール (dicumarol, DIC), ツィーン 20, シアン化カリウム, ジメチルスルフォキシドは和光純薬工業 (大阪) より購入した。他の試薬は特記しないかぎり Sigma Chemical (St. Louis, USA) より購入した。

II. 細胞株

ヒト非小細胞肺癌株 PC-9 は, 東京医科大学早田義博博士らによって肺腺癌の患者から樹立されたものを供与された。培養は 10% の非働化したウシ胎児血清, 100 µg/ml のストレプトマイシン, 100 単位/ml のペニシリンを加えた RPMI1640 培地 (以下, 培養液と略す) を用い, 37°C, 湿潤, 5% CO₂/95% 空気の下で行なった。PC-9 の MMC 耐性株は, 以下に示す方法で分離, 樹立した。すなわち, MMC を 0.01 µg/ml 加えた培養液中で PC-9 を培養し, 継代した。PC-9 と同様な状態で継代可能となった後, 培養液中の MMC 濃度を 0.02 µg/ml に上げ, 薬剤暴露開始から約 4 か月後に, この濃度で継代可能となった細胞を得た。この細胞を 96 穴のマイクロプレートに蒔き, 薬剤を含まない培養液で培養し, 増殖の良好な細胞を選別した。この耐性株を PC-9/MC2 とした。同様に, PC-9/MC2 から 0.04 µg/ml の MMC を含む培養液で継代可能となった細胞を得て, PC-9/MC4 とした。また, 同じ親株を用いて国立がんセンター研究所薬効試験部において樹立された PC-9/CDDP²⁾ は, 同部長の西条長宏先生の御厚意により分与されたものを使用した。各々の耐性株は, それぞれが選択分離された濃度の MMC を含む培養液で 1 年間培養し, 実験に用いるにあたっては, 少なくとも 4 週以上 MMC を含まない培養液中で培養した。

III. 増殖曲線と倍加時間

トリプシン - EDTA 溶液で処理し, 3,000 細胞/ml の濃度に調整した単細胞浮遊液を, 底面積 25 cm² のプラスチック培養フラスコに 10 ml ずつ分注し, 12 日間まで培地の交換を行わずに培養した。培養開始 3 日後から 8 日後までの毎日と 10 日後, 12 日後にトリプシン - EDTA 処理により, 単離細胞を回収し, トリパンブルーで染色し, 非染細胞を生細胞として血球計算板でカウントした。各細胞 1 日につき 3 フラスコずつの生細胞数を算定し, その平均値を求めて片対数グラフにプロットし, 対数増殖期のグラフの傾きから倍加時間を求めた。

IV. 薬剤感受性試験

PC-9 およびその MMC 耐性株 PC-9/MC2, PC-9/MC4 の各種薬剤に対する感受性は, Mosmann らの報告³⁾に若干の変更を加えた以下の方法により検討した。対数増殖期にある細胞をトリプシン - EDTA 処理して回収し培養液に浮遊して 2 × 10⁴/ml に調製し, この細胞浮遊液を 96 穴平底プレートに各穴 100 µl ずつ蒔き, 2 時間静置培養した。その後, 最終濃度の 2 倍の濃

度に希釈した薬剤溶液を各穴に 100 µl ずつ加え, 96 時間培養した。培養後 PBS に溶解し 5 µg/ml とした 3-[4,5-ジメチルチアゾール-2-yl]-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT) 溶液を各穴に 20 µl ずつ加えて 4 時間培養し, 96 穴平底プレートを毎分 2000 回転で 10 分間遠心した後, 上清を注意深く吸引し, ジメチルスルフォキシドを各穴 200 µl ずつ加えてプレート振盪器で 5 分間振盪した。各穴の吸光度を自動吸光度計 EAR 340 AT (SLT, Vienna, Austria) を用いて測定波長 560 nm, 対照波長 660 nm で測定した。薬剤を含まない培養液のみを加えた 6 穴の吸光度の平均値をコントロールとし, それぞれの薬剤を加えた 6 穴の吸光度の平均値をコントロールに対するパーセンテージで表し, 生存率 (%) とした。1 回の実験は同時に 3 個のフラスコから回収した細胞を別々のプレートに蒔き, 3 プレートの生存率の平均値をもってその実験における生存率の値とした。薬剤感受性の指標としての 50% 増殖抑制濃度 (IC₅₀) は, 薬剤濃度の対数変換値と生存率の Hill 変換値 (log [生存率/(100 - 生存率)]) の回帰直線の X 切片として求めた。感受性試験は, 異なる日に最低 3 回行ない, それぞれの試験ごとに求めた IC₅₀ 値の算術平均を各薬剤の IC₅₀ とし, 各細胞株間で比較検討した。薬剤耐性度の指標として, 相対耐性度 (relative resistance, RR) を, 耐性株の IC₅₀ を親株の IC₅₀ で除した値として求めた。

V. 細胞内 MMC 蓄積量の検討

対数増殖期にある細胞をトリプシン - EDTA で処理して 10⁶ 個の細胞を 5 ml の培養液に浮遊させた。³H-MMC (比放射活性 44 Ci/mmol) を非放射性的 MMC で希釈し, 最終濃度 10 µM となるように細胞浮遊液に加えた。30 分から 120 分, 37°C の恒温槽内で振盪しながら培養した後, 毎分 2,000 回転で 5 分間遠心して上清を捨て, 沈渣に氷冷した PBS を加えて 2 回洗浄して, 測定用の細胞沈渣を得た。これに 1 規定の水酸化ナトリウム溶液 0.5 ml を加えて混和し室温に一晩放置して細胞を破壊し, 同量の 1 規定の塩酸を加えて中和した。その後 Amersham の ACSII シンチレーターを 10 ml 加えて放射活性を液体シンチレーションカウンター LSC-700 (Aloka, Arlington Heights, USA) を用いて測定した。

VI. 細胞内還元酵素活性の測定

MMC を還元活性化する酵素として, DTD, NADPH : チトクローム P-450 還元酵素, NADH : チトクローム b₅ 還元酵素の活性を測定した。対数増殖期にある 5 × 10⁶ 個の細胞を, 氷冷した PBS で 2 回洗浄し, 適当な緩衝液を 500 µl 加えて超音波破碎装置 Sonifier 250 (Branson, Danbury, USA) を用いて細胞を破壊し, 4°C, 毎分 14000 回転で 15 分間冷却遠心して得た上清を測定検体とした。DTD 活性は, Ernster らの方法⁴⁾に変更を加えた Benson らの方法⁵⁾によって測定した。緩衝液として 25 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) を用い, 0.07% ウシ血清アルブミン, 0.01% ツィーン 20, 0.2 mM NADPH, 5 µM フラビンアデニンジヌクレオチドを加えた緩衝液内に, 10 ないし 100 µl の検体を加え, 最後に吸光度計内で 2,6-ジクロロフェノールインドフェノールを最終濃度 40 µM となるように加えて 600 nm での吸光度の減衰速度を求めた。この反応を 20 µM の DIC の存在下と非存在下で行ない, その差を求め, 酵素活性を算出した。NADPH : チトクローム P-450 還元酵素活性は, Philips らの方法⁶⁾により測定した。緩衝液として 0.33 M のリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.6) を用い, 1 mM シアン化カリウム, 0.01% ウシ

血清アルブミン, 50 μM チトクローム C, 42 μM NADPH を加えた反応液中に, 検体 100 ml を加え, チトクローム c の吸光度の減衰を 550 nm で測定した. NADH : チトクローム b₅ 還元酵素の活性は Yubisui らの方法²⁹⁾で測定した. 10 mM のリン酸カリウム緩衝液 (pH 6.6) を用い, 0.1 mM NADH, 0.5 mM シアン化鉄(II)カリウムを加えた反応液中に, 50 μl の検体を添加し, 420 nm での吸光度の低下速度から活性を算出した. 検体の蛋白濃度をピシニン酸蛋白測定キット (bicinchoninic acid protein assay kit, Pierce Chemical, Rockford, USA) を用いて求め, 酵素活性はいずれも単位蛋白量当りに換算した.

Ⅶ. 細胞内グルタチオン (glutathione, GSH) 含量およびグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (glutathione-S-transferase, GST) 活性の測定

細胞内 GSH 含量は Griffith らの方法²⁷⁾に準じて測定した. 細胞のペレットにリン酸 EDTA 溶液 (125 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, pH 7.5, 6.3 mM EDTA) を 300 μl 加えて超音波破碎した. これに 5-スルホサリチル酸 12% 溶液を加え, 攪拌した後, 室温で 3 時間放置し, 4 $^{\circ}\text{C}$, 毎分 14,000 回転で 15 分間冷却遠心して上清を採取した. 吸光度測定用のキュベットに 0.3 mM NADPH 溶液 700 μl , 6 mM 5,5'-ジチオ-ビス-2-ニトロベンゼン酸溶液 100 μl , 上清 100 μl , 500 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.5) 100 μl を加え, さらに 2 時間室温で放置した. この反応液にグルタチオン還元酵素 0.5 単位を加え, 412 nm の吸光度を測定した. 上清の代わりに種々の濃度の GSH 溶液を加えることによって標準曲線を求め, この曲線を用いて細胞内の GSH 含量を定量した. 細胞内 GST 活性は, Habig らの方法²⁸⁾により測定した. 細胞のペレットにリン酸カリウム緩衝液 (pH 6.5) を加えて超音波破碎し, 4 $^{\circ}\text{C}$, 毎分 14,000 回転で 15 分間冷却遠心して上清を採取した. これに, 1 mM GSH, 1 mM 1-クロロ-2,4-ジニトロベンゼンを加え, 時間当りの 340 nm での吸光度変化を測定した. GSH 含量, GST 活性はいずれも単位蛋白量当りに換算した.

Ⅷ. DTD 蛋白量の検討

細胞内の DTD 蛋白の量を, マウス抗ヒト DTD モノクローナル抗体 KM1015 を一次抗体としてウェスタンブロットハイブリダイゼーション法で検討した. KM1015 は, 東京大学分子細胞生物学研究所の鶴尾隆博士と協和発酵工業が共同で作成したものを好意により供与された. 細胞を超音波破碎し, その上清を蛋白濃度 0.03 から 3 mg/ml となるように PBS で調製した. これに等量のトリス-SDS-セブラゾル (第一化学薬品, 東京) を加えて 95 $^{\circ}\text{C}$ で 5 分間加熱して蛋白を変性させ, その 20 ml を 10% / 20% ポリアクリルアミドゲル (第一化学薬品) のウェルに注入して, 60 mA の定電流で電気泳動を行なった. 泳動終了後, ゲル上の蛋白質を 66 mA, 1 時間半のプロットティングにより, ポリビニリデンジフルオリド素材の転写膜 (ミリポア, 東京) に転写した. 転写済の膜を 0.1% (v/v) ツイーン 20 を加えた 100 mM トリス緩衝生理食塩水 (Tris-buffered saline with Tween 20, TTBS) 中に移し, 30 分間 2 回洗浄した. 一次抗体 KM1015 を 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度に TTBS で希釈し, この溶液内に転写膜を移し, 30 分間反応させた. 15 分間, 3 回 TTBS で洗浄した後, ビオチン化二次抗体液中で 30 分間反応させ, 再び 3 回の洗浄を繰り返し, アビジン D H と複合体を形成したビオチン化ペルオキシダーゼ H の溶液中で 30 分間反応させた. 3 回の洗浄の後, ペルオキシダーゼ基質として 0.02% 過酸化水素水と 0.1% 3,3-

ジアミノベンジジンニッケルを含む溶液中で 10 分間反応させ, 精製水で洗浄することにより反応を停止させた. 二次抗体以降の反応は, ベクタステインエリート ABC キット, およびペルオキシダーゼ基質キット (ともに Vector, Burlingame, USA) を用いた.

Ⅸ. DIC による薬剤感受性の変化の検討

DTD に対し比較的特異性の高い阻害作用を示す DIC が, PC-9 および耐性株の薬剤感受性に与える影響を MTT を用いた方法で検討した. 薬剤接触時間は 1 時間とした. まず, 96 穴の V 底プラスチックマイクロプレート (Costar, Cambridge, USA) に 50 μl の DIC 溶液または培養液を分注した. DIC は 0.5 N の水酸化ナトリウム水溶液に溶解した後, 前実験で細胞増殖抑制が 10% 未満に留まる最大濃度であった 500 μM まで培養液で希釈した. 水酸化ナトリウムの最終濃度は 0.01 N となるように調製し, コントロールの穴にもこの濃度の水酸化ナトリウムを添加した. 各穴に最終濃度の 4 倍濃度に調製した薬剤溶液を 50 ml 加え, さらに単細胞浮遊液を 100 μl 加え, ピペッティングによって十分に混和した. 1 時間培養した後, 遠心して, 上清を吸引除去し, 薬剤を含まない培養液で 1 回洗浄した. 遠心, 上清除去後各穴に 200 μl の培養液を加え, ピペッティングにより浮遊液とした. この浮遊液を平底のマイクロプレートに移し, 96 時間培養した. それ以降の処理は, 前述の方法にしたがった.

X. アルキル化代謝産物の生成量の検討

MMC のアルキル化代謝産物の生成量を Kennedy らの方法²⁹⁾に若干の変更を加えて測定した. 約 10^7 個の細胞を, 10 mM のリン酸カリウム緩衝液 (pH 6.6) 内で超音波破碎し, その上清に 1 mM NADPH, 1 mM NADH, 0.1% 4-(*p*-ニトロベンジル) ピリジン, 600 μM MMC を加え, 37 $^{\circ}\text{C}$ で 1 時間培養した. 培養後, 氷上に移して 2 ml の氷冷したアセトンを加えることによって反応を停止させ, 1 規定の水酸化ナトリウム 1 ml を加えて発色させた. MMC と 4-(*p*-ニトロベンジル) ピリジンの重合体を酢酸エチル 4 ml で抽出し, 1000 \times g で 2 分間遠心して酢酸エチル相の吸光度を 540 nm で測定した.

XI. 統計学的処理

実験結果は $\bar{x} \pm \text{SD}$ で表現した. 統計学的有意差は, 対応のない t 検定を用い, $p < 0.05$ を有意差ありと判断した.

成 績

I. 細胞倍加時間

培養開始後, PC-9 および PC-9/MC2 は 4 日後に, PC-9/MC4 は 5 日後に対数増殖期に入った (図 1). 細胞倍加時間は, PC-9 が 20 時間, PC-9/MC2 が 24 時間, PC-9/MC4 が 23 時間と, 耐性株で増殖速度の遅延が認められた.

II. 薬剤感受性 (表 1)

MMC の PC-9 に対する IC_{50} は $0.19 \pm 0.04 \mu\text{M}$ であったのに対し, PC-9/MC2 および PC-9/MC4 に対する IC_{50} はそれぞれ 0.64 ± 0.18 , $1.1 \pm 0.6 \mu\text{M}$ であり, 相対耐性は各々 3.4 倍, 5.9 倍であった (図 2A). この耐性は, 薬剤を含まない培地で少なくとも 4 か月間培養しても不変であった. 新たに合成された MMC の誘導体 KW-2149 に対しては PC-9/MC2 および PC-9/MC4 の相対耐性はそれぞれ 1.2 倍, 1.3 倍であり, 有意な交差耐性を示さなかった (図 2B). 一方, 新規のインドロキノ系化合物 EO9 に対しては, 相対耐性は各々 4.9 倍, 4.4 倍とほぼ完全な交差耐性を示した (図 2C). 他の化合物に関しては,

アドリアマイシンの IC_{50} がPC-9で0.40 μ M, PC-9/MC2で0.26 μ M, PC-9/MC4で0.10 μ Mと、耐性株で有意に感受性の亢進が認められた。同様の交差感受性は、メナジオンについても認められた。また、ACNUに対してもPC-9/MC4においてのみ有意な感受性亢進が認められた。実験を行った他の化合物では親株と耐性株との間に明らかな感受性の変化は認められなかった。

Ⅲ. 細胞内MMC蓄積量 (図3)

細胞内のMMC量は、60分後には耐性株で親株の約60%に低下していたが、PC-9/MC2とPC-9/MC4の間には差は認めなかった。また、薬剤の排泄速度には親株と耐性株の間に明らかな差異を認めなかった。

Ⅳ. 細胞内還元酵素活性 (表2)

2,6-ジクロロフェノールインドフェノールを基質として測定

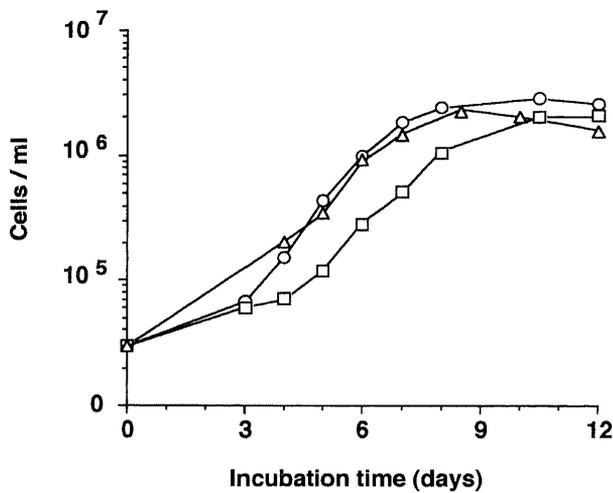


Fig 1. Growth curve of PC-9 cell lines. The average cell counts of three flasks at each day were plotted. ○, PC-9; △, PC-9/MC2; □, PC-9/MC4.

した細胞内DTD活性は、PC-9の261.5 ± 92.7 nmol/分/mg蛋白に対し、PC-9/MC2では13.5 ± 3.2, PC-9/MC4では1.3 ± 0.6と、それぞれ親株の約5%, 0.5%に低下していた。これに対し、NADH:チトクローム b_5 還元酵素活性はいずれの耐性株でも親株の約3分の1に低下していたが、耐性株間では差を認めなかった。NADPH:チトクロームP-450還元酵素活性は、いずれの細胞株でも検出感度以下であった。

Ⅴ. 細胞内GSH含量およびGST活性 (表3)

細胞内GSH含量は各細胞株の間で有意な差を認めなかった。GST活性は、PC-9/MC4でのみ親株に比べ有意な低下が認められた。

Ⅵ. DTD蛋白量

細胞内DTD活性の低下がDTDの量的変化によるものか、変異蛋白による質的变化のためかを明らかにするため、細胞内のDTD蛋白量をウェスタンブロット法を用いて検討した。電気泳動ゲルの各レーンに各細胞株の超音波破砕物を蛋白量として1.5 μ g加えたところ、図4に示すように親株PC-9のレーンでのみ約33kDaの位置に抗DTD抗体と反応するバンドを確認できた。試料の蛋白量を0.3 μ gまで減少させてもこのバンドを確認することができた。一方、耐性株では、PC-9/MC2では5 μ g, PC-9/MC4では30 μ gの蛋白量が同部位にバンドを確認するために必要であった。

Ⅶ. DICによる薬剤感受性の変化 (図5、表4)

薬剤暴露時間を1時間とした場合、PC-9およびPC-9/MC4に対するMMCの IC_{50} 値は、各々12 μ M, 68 μ Mであり、PC-9/MC4の相対耐性度は5.7倍であった。500 μ MのDICの存在下ではPC-9のMMC感受性は、 IC_{50} 値が2.0倍に上昇し、感受性の低下を認めたが、PC-9/MC4ではほとんど不変であった。一方、KW-2149に対しては、DIC添加により、PC-9では感受性に変化を認めなかったが、PC-9/MC4では2.0倍の感受性亢進を認めた。EO9に対する感受性は、DICの添加により著明に低下し、 IC_{50} 値はPC-9で33倍、PC-9/MC4では1.8倍に増加した。その結果、DIC添加時にはEO9の容量反応曲線は、PC-9

Table 1. Sensitivities to various anticancer agents of PC-9 cell lines

Drugs	PC-9		PC-9/MC2		PC-9/MC4	
	IC_{50} values (μ M) ^{a)}	IC_{50} values (μ M)	IC_{50} values (μ M)	RR ^{c)}	IC_{50} values (μ M)	RR
MMC	0.19 ± 0.04 ^{b)}	0.64 ± 0.18*	3.4	1.1 ± 0.6**,**	5.9	
EO9	0.037 ± 0.024	0.18 ± 0.06*	4.9	0.16 ± 0.04*	4.4	
KW-2149	0.093 ± 0.049	0.11 ± 0.04	1.2	0.12 ± 0.04	1.3	
Carboquone	0.017 ± 0.009	0.024 ± 0.010	1.4	0.026 ± 0.010	1.5	
Adriamycin	0.40 ± 0.03	0.26 ± 0.03*	0.65	0.10 ± 0.02**,**	0.25	
Menadione	17 ± 3	9.8 ± 3.8*	0.57	7.3 ± 1.1*	0.42	
Cisplatin	1.3 ± 0.4	1.9 ± 0.7	1.5	1.7 ± 0.6	1.3	
Nimustin	420 ± 50	320 ± 120	0.76	240 ± 60*	0.57	
Vindesine	0.020 ± 0.010	0.021 ± 0.010	1.0	0.016 ± 0.007	0.80	
Etoposide	4.7 ± 28	67 ± 25	1.4	34 ± 16	0.74	

^{a)} Drug concentration that inhibits cell growth by 50% by continuous drug exposure for 96 hr.

^{b)} Each value is \bar{x} ± SD of at least three independent experiments.

^{c)} Relative resistance value = IC_{50} value of resistant cells / IC_{50} value of parental cells.

* $p < 0.05$ as compared to IC_{50} value of PC-9.

** $p < 0.05$ as compared to IC_{50} value of PC-9/MC2.

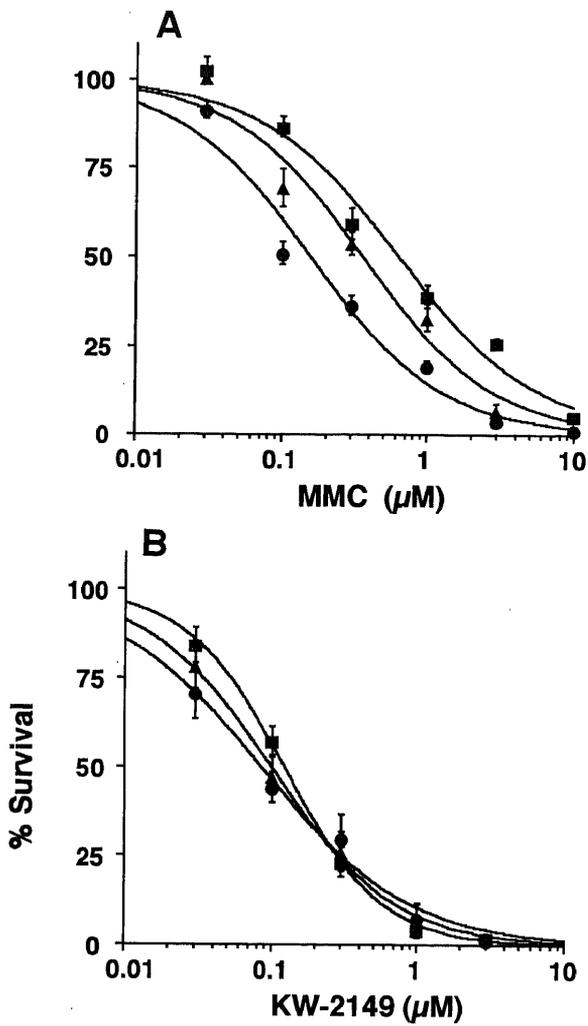


Fig 2. Growth inhibition curve of PC-9 cell lines by 96 hr exposure to MMC (A), KW-2149 (B) and EO9 (C). Surviving fractions were determined by MTT assay as described in Materials and Methods. Points and bars indicate $\bar{x} \pm SD$ of at least three independent triplicate experiments. ●, PC-9; ▲, PC-9/MC2; ■, PC-9/MC4.

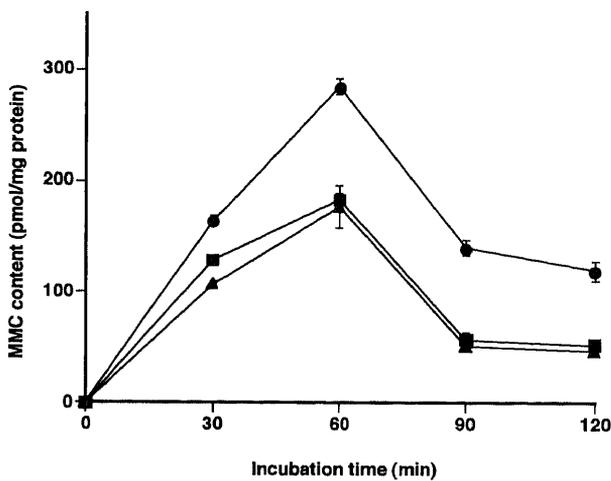


Fig 3. Accumulation of MMC in PC-9 cell lines. The cells of 5×10^6 in number were cultured with $10 \mu M$ [3H]-MMC for the indicated time. Efflux was evaluated by washing the cells with warm fresh medium after 60-min drug exposure and resuspending and incubating the cells in drug-free medium for up to 120 min after addition of the drug. The radioactivity of the cells were measured and $\bar{x} \pm SD$ of three determinations were shown. ●, PC-9; ▲, PC-9/MC2; ■, PC-9/MC4.

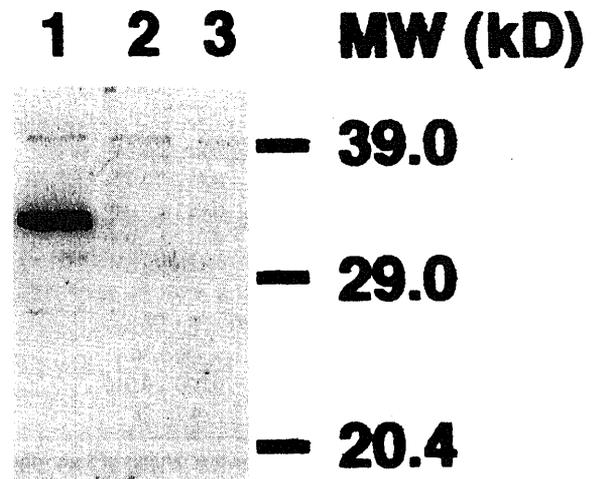


Fig 4. Western blot analysis of DT-diaphorase content of cell sonicates from PC-9 (lane 1), PC-9/MC2 (lane 2) and PC-9/MC4 (lane 3) cells. An amount of $1.5 \mu g$ of cytosolic protein was loaded onto each lane.

Table 2. Activities of flavoenzymes of PC-9 cell lines

Cell lines	Relative resistance	DT-diaphorase activity (μ mol/min/mg protein)	NADPH : cytochrome P-450 reductase activity (μ mol/min/mg protein)	NADH : cytochrome b_5 reductase activity (μ mol/min/mg protein)
PC-9	1	$261.5 \pm 92.7^{a)}$	ND ^{b)}	$2.23 \pm 0.30^{c)}$
PC-9/MC2	3.4	$13.5 \pm 3.2^*$	ND	$0.68 \pm 0.17^{***}$
PC-9/MC4	5.9	$1.3 \pm 0.6^{*,**}$	ND	$0.73 \pm 0.08^{***}$

^{a)} Each value is $\bar{x} \pm$ SD of five determinations.

^{b)} Not detected.

^{c)} Each value is $\bar{x} \pm$ SD of four determinations.

* $p < 0.001$ as compared to the value of PC-9, ** $p < 0.001$ as compared to the value of PC-9/MC2, *** $p < 0.05$ as compared to the value of PC-9.

Table 3. Glutathione-S-transferase activities and glutathione contents of PC-9 cell lines

Cell lines	Relative resistance	Glutathione-S-transferase activity (μ mol/min/mg protein)	Glutathione content (μ mol/mg protein)
PC-9	1	$218 \pm 17^{a)}$	$28.1 \pm 9.6^{a)}$
PC-9/MC2	3.4	161 ± 34	27.0 ± 0.7
PC-9/MC4	5.9	$168 \pm 12^*$	32.0 ± 2.8

^{a)} Each value is $\bar{x} \pm$ SD of five determinations.

* $p < 0.05$ as compared to the value of PC-9.

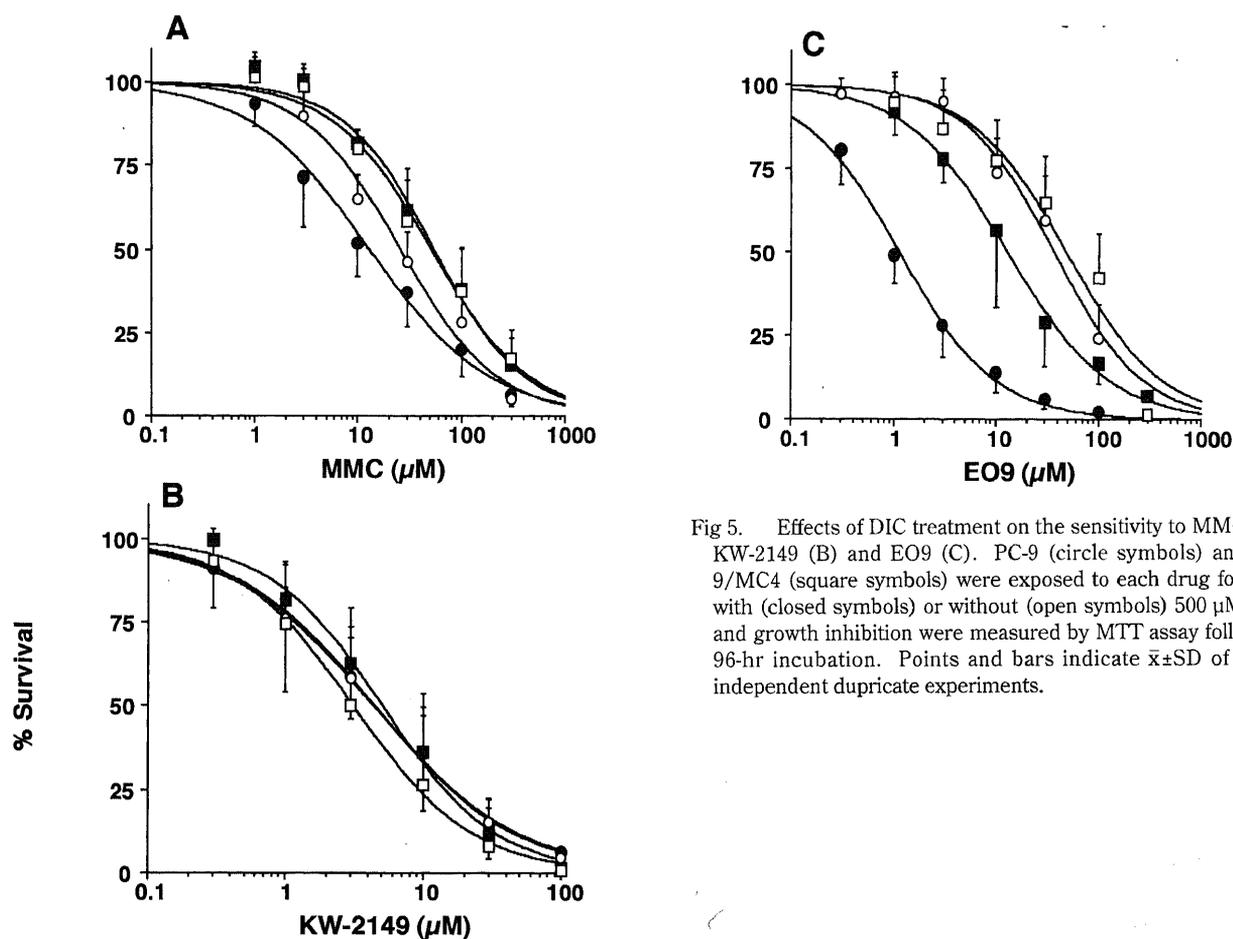


Fig 5. Effects of DIC treatment on the sensitivity to MMC (A), KW-2149 (B) and EO9 (C). PC-9 (circle symbols) and PC-9/MC4 (square symbols) were exposed to each drug for 1 hr with (closed symbols) or without (open symbols) 500 μ M DIC and growth inhibition were measured by MTT assay following 96-hr incubation. Points and bars indicate $\bar{x} \pm$ SD of three independent duplicate experiments.

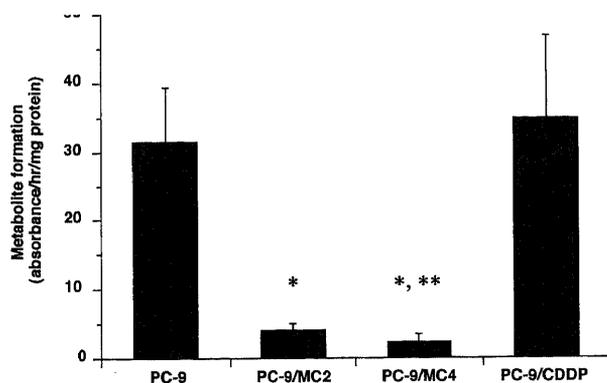


Fig 6. Formation of alkylating metabolites by the cell sonicates of PC-9 cell lines. The amounts of alkylating metabolites after 1 hr incubation were 31.5 ± 7.9 , 4.5 ± 0.6 , 2.3 ± 0.6 and absorbance at 540 nm / hr / mg protein in PC-9, PC-9/MC2, PC-9/MC4 and PC-9/CDDP, respectively. Columns and bars indicate $\bar{x} \pm SD$ of four determinations. *; $P < 0.0001$ in comparison with PC-9. **; $P < 0.05$ in comparison with PC-9/MC2.

と PC-9/MC4 でほぼ同一となった。

Ⅷ. アルキル化代謝産物の生成量 (図 6)

アルキル化代謝産物の生成量は、耐性株では PC-9/MC2 で親株の 14%、PC-9/MC4 で 7.3% と、親株に比べ有意に減少していた。また、高度耐性である PC-9/MC4 では、耐性度の低い PC-9/MC2 に比べ有意に生成量が減少しており、MMC に対する IC_{50} と代謝産物の生成量との間には逆相関が認められた。また、シスプラチン耐性株 PC-9/CDDP では代謝産物生成量は親株の 110% であり、低下は認められなかった。

考 察

今回著者は、非小細胞肺癌の MMC に対する耐性獲得機構を検討する目的で、非小細胞肺癌細胞株を MMC に持続接触させることによってその耐性株を樹立した。これまで、ヒト肺癌細胞から樹立された MMC 耐性株はわれわれが調べた限り報告されていない。得られた耐性株は、臨床的に認められる耐性度とほぼ同等と考えられる数倍の耐性を獲得していた。他剤に対する感受性の検討では、今回使用した既存の抗癌剤に対しては全く交叉耐性を認めなかった。一方、新規のインドロキノン系抗癌剤であり、MMC と共通した生体内活性化機構を有する EO9³⁰⁾ に対しては、MMC と同等以上の耐性を示した。さらに MMC のキノン環の 7N 位に長い側鎖を有し活性化機構が MMC とは異なるとされている KW-2149³¹⁾ に対しては、交叉耐性を認めなかった。以上のことから、著者が樹立した MMC 耐性株の耐性獲得機構として、MMC に特異的な生体内での還元による活性化機構の変化が重要である可能性が示唆された。

MMC の生体内活性化機構は、有酸素下と無酸素下とは異なることとされているが、有酸素下では一部の報告³²⁾³³⁾を除いて DTD による二電子還元経路が重要であるとされている^{34)~36)}。そこで、親株と耐性株とで DTD の細胞内活性を測定し比較検討したところ、耐性株においては耐性度に相関して DTD 活性の低下を認めた。DTD 以外の活性化還元酵素として、NADPH:チトクローム P-450 還元酵素、および NADH:チトクローム b_5 還元酵素の細胞内活性を測定したところ、前者はいずれの細胞株

でも測定感度以下であり、後者は親株と耐性株の間では有意差を認めたものの、2つの耐性株の間では差を認めなかった。これらの結果から、細胞内 DTD 活性の低下が MMC に対する耐性獲得の機序として関与しているものと考えられた。この細胞内 DTD 活性の低下は、ウェスタンブロット法による検討結果から、DTD 蛋白の量的減少によることが確認された。

また、アルキル化代謝産物の生成量は DTD 活性と相関して耐性株で減少しており、 IC_{50} 値とは明瞭な逆相関を示した。同じ親株の PC-9 から樹立されたシスプラチン耐性株である PC-9/CDDP では、この活性代謝産物生成量の減少はみられず、この現象はアルキル化剤耐性に共通ではなく、マイトマイシン耐性株に特異的であることが示唆された。

さらに、DIC による DTD の阻害実験では、PC-9 において MMC に対する感受性の低下を認め、少なくともこの細胞株においては DTD が MMC 感受性を規定する重要な因子の一つであることが確認された。しかし、500 μ M の DIC の存在下でも PC-9 の MMC に対する感受性は PC-9/MC4 に比して依然として高く、また、わずかながら DTD 活性の残存する PC-9/MC4 において DIC による感受性の変化が認められなかったことには、何らかの説明が必要である。500 μ M の DIC は細胞内の DTD 活性を阻害するには十分な濃度と考えられ¹⁷⁾、実際、DTD との親和性が非常に高い EO9³⁰⁾ の感受性は、DIC の存在下で高度耐性株においても明らかに減弱し、両者の容量反応曲線はほとんど一致した。Keyes の報告⁴⁰⁾では、DTD を欠如した細胞や無酸素の条件下では、メカニズムは不明であるが、DTD は MMC 感受性を増強する方向に作用することが示されている。したがって、PC-9/MC4 のように DTD 活性の著明に低下した細胞株では、DIC の添加により、DTD 活性の阻害による感受性減弱作用と無酸素下で見られるような増強作用が相殺し、見かけ上感受性の変化を生じなかった可能性がある。もう一つの可能性として、我々の耐性株における耐性獲得のメカニズムが、DTD 活性の低下という一つの因子ではなく、複数の要素が関与しているのかも知れない。

DTD 活性の低下以外の耐性獲得機序にはいくつかの可能性がある。まず、細胞内への薬剤の蓄積量の低下であるが、ラベル体を用いた検討で、耐性株では親株に比べて、細胞内の薬剤濃度の有意な低下が認められ、細胞内薬剤濃度の低下は耐性獲得機序として関与はしていると考えられる。しかしながら、その低下の程度は親株の約 3 分の 2 であり、Keyes らの報告⁴¹⁾と比較すると数倍の耐性獲得を説明しうほどの変化とは考えがたく、また、耐性度の異なる 2 つの耐性株の間では薬剤の蓄積量に差はなく、少なくとも耐性度の上昇には関与していないと考えられる。薬剤蓄積量低下の機序としては、薬剤排泄速度に明らかな差がみられないこと、アドリアマイシン、エトポシド、ビンデシンに対する交差耐性を認めないことから、P 糖蛋白の発現による薬剤排泄の亢進は否定的である。他の耐性獲得機序に関しては、一般的にアルキル化剤耐性の機序として報告されているものに、グルタチオン系による細胞内解毒機構の亢進や、DNA 修復の亢進があり、これらはこれまで MMC に対する耐性獲得機序としても報告されている^{29)~31)}。後者に関しては今回の検討では不明であるが、前者に関しては細胞内 GSH 量の増加や GST 活性の増加はみられず、著者の樹立した耐性株では耐性獲得の機序としては関与していないものと考えられる。

以上のことから、著者の樹立した MMC 耐性非小細胞肺癌細胞

細胞株においては、その耐性獲得機序として DTD 活性の低下による細胞内での MMC の活性化の障害が最も重要であると結論された。DTD 活性が非小細胞肺癌細胞の MMC に対する感受性規定因子として重要であることが示唆され、DTD に親和性の高い新規抗腫瘍剤 EO9⁴²⁾ の非小細胞肺癌に対する抗腫瘍活性が期待されるとともに、逆に KW-2149 はその活性化が DTD に依存しない⁴³⁾ ことより、MMC や EO9 に抵抗性の非小細胞肺癌においても有効性が期待できる。著者の樹立した細胞株は、これら MMC 関連化合物の開発に有用な情報を提供し、薬剤抵抗性の高い非小細胞肺癌の化学療法の進歩に寄与するものと考えられる。

結 論

MMC 耐性非小細胞肺癌細胞株を樹立し、その耐性獲得機序に関して以下の結果を得た。

1. 本研究で樹立した耐性株 PC-9/MC2 および PC-9/MC4 は、親株 PC-9 に比べ、各々 3.4 倍、5.9 倍の耐性を有していた。
2. 耐性株は、EO9 に対しては交差耐性を示したが、新規 MMC 誘導体である KW-2149 を含む他の抗腫瘍剤に対しては交差耐性を示さなかった。
3. 細胞質内の DTD 活性は、PC-9/MC2 で親株の約 5%、PC-9/MC4 で約 0.5% に低下していた。また、アルキル化代謝産物の生成量は各々約 14%、7% に低下し、耐性株において DTD 活性の低下と薬剤活性化能の低下が明らかとなった。
4. 本研究で樹立した MMC 耐性株における耐性獲得の機序として、細胞内 DTD 活性の低下に基づく細胞内活性化の障害が重要と考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、当研究の御指導、御校閲を賜りました金沢大学第三内科松田保教授、研究中、常に御助言、御指導をいただいた藤村政樹講師、ならびに笠原寿郎助手はじめ呼吸器研究室肺癌グループの諸先生方に深謝いたします。また、マイトマイシン耐性株の樹立に当たり御助言を頂いた国立がんセンター薬効試験部、西條長宏部長、薬剤を御提供いただいた協和発酵工業東京研究所の井上謙吾博士、モノクローナル抗体を御提供いただいた東京大学分子細胞生物学研究所、鶴尾隆教授に心から感謝いたします。

文 献

- 1) Dorr RT, Liddil JD, Trent JM, Dalton WS. Mitomycin C resistant L1210 leukemia cells: Association with pleiotropic drug resistance. *Biochem Pharmacol* 36: 3115-3120, 1987
- 2) Dulhanty AM, Li M, Whitmore GF. Isolation of Chinese hamster ovary cell mutants deficient in excision repair and mitomycin C bioactivation. *Cancer Res* 49: 117-122, 1989
- 3) Dusre L, Rajagopalan S, Eliot HM, Covey JM, Sinha BK. DNA interstrand cross-link and free radical formation in a human multidrug-resistant cell line from mitomycin C and its analogues. *Cancer Res* 50: 648-652, 1990
- 4) Schelber SA, Duval DL, Pardini RS. Relationship between glutathione S-transferase activity and mitomycin C response in two human colon carcinoma cell lines. *Proc Am Assoc Cancer Res* 33: 461, 1992
- 5) Siegel D, Gibson NW, Preusch PC, Ross D. Metabolism of mitomycin C by DT-diaphorase: Role in mitomycin C-induced DNA damage and cytotoxicity in human colon carcinoma cells. *Cancer Res* 50: 7483-7489, 1990
- 6) Hoban PR, Walton MI, Robson CN, Godden J, Stratford JJ, Workman P, Harris AL, Hickson ID. Decreased NADPH: cytochrome P-450 reductase activity and impaired drug activation in a mammalian cell line resistant to mitomycin C under aerobic but not hypoxic conditions. *Cancer Res* 50: 4692-4697, 1990
- 7) Traver RD, Horikoshi T, Danenberg KD, Stadlbauer THW, Danenberg PV, Ross D, Gibson NW. NAD(P)H:quinone oxidoreductase gene expression in human colon carcinoma cells: characterization of a mutation which modulates DT-diaphorase activity and mitomycin sensitivity. *Cancer Res* 52: 797-802, 1992
- 8) Workman P. Keynote address: Bioreductive Mechanisms. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* 22: 631-637, 1992
- 9) Dorr RT. New findings in the pharmacokinetic, metabolic, and drug-resistance aspects of mitomycin C. *Seminars in Oncology* 15: 32-41, 1988
- 10) Keyes SR, Fracasso PM, Heimbrook DC, Rockwell S, Sliger SG, Sartorelli AC. Role of NADPH:cytochrome c reductase and DT-diaphorase in the biotransformation of mitomycin C. *Cancer Res* 44: 5638-5643, 1984
- 11) Pan S, Andrews PA, Glover CJ, Bachur NR. Reductive activation of mitomycin C and mitomycin C metabolites catalyzed by NADPH-cytochrome P-450 reductase and xanthine oxidase. *J Biol Chem* 259: 959-966, 1984
- 12) Begleiter A, Robotham E, Leith MK. Role of NAD(P)H: (quinone acceptor) oxidoreductase (DT-diaphorase) in activation of mitomycin C under hypoxia. *Mol Pharmacol* 41: 677-682, 1992
- 13) Gustafson DJ, Pristos CA. Bioactivation of mitomycin C by xanthine dehydrogenase from EMT6 mouse mammary carcinoma tumors. *J Natl Cancer Inst* 84: 1180-1185, 1992
- 14) Siegel D, Gibson NW, Ross D. DT-diaphorase mediated activation of mitomycin C to DNA crosslinking species dependent on pH. *Proc Am Assoc Cancer Res* 33: 404, 1992
- 15) Siegel D, Beall H, Senekowitsch C, Kasai M, Arai H, Gibson NW, Ross D. Bioreductive activation of mitomycin C by DT-diaphorase. *Biochemistry* 31: 7879-7885, 1992
- 16) Doroshow JH. Reductive activation of mitomycin C: A delicate balance. *J Natl Cancer Inst* 84: 1138-1139, 1992
- 17) Ernster L. DT-diaphorase. *Methods Enzymol* 10: 309-317, 1967
- 18) Ernster L. DT diaphorase: A historical review. *Chemica Scripta* 27A: 1-13, 1987
- 19) Hodnick WF, Sartorelli AC. Reductive activation of mitomycin C by NADH: cytochrome b5 reductase. *Cancer Res* 53: 4907-4912, 1993
- 20) Malkinson AM, Siegel D, Forrest GL, Gazdar AF, Oie HK, Chan DC, Bunn PA, Mabry M, Dykes DJ, Harrison SD, Ross D. Elevated DT-diaphorase activity and messenger RNA content in human non-small cell lung carcinoma: Relationship to the response of lung tumor xenografts to mitomycin C. *Cancer Res* 52: 4752-4757, 1992
- 21) Arai H, Kasai M. Synthesis of [C6-CH₃-¹⁴C] and [C6-CH₃-³H]mitomycin C. *Labelled Comp Radiopharmacol* 29: 903-908,

1991

- 22) Fujiwara Y, Sugimoto Y, Kasahara K, Bungo M, Yamakido M, Tew KD, Saijo N. Determinant of drug exposure in a cisplatin resistant human lung cancer cell line. *Jpn J Cancer Res* 81: 527-535, 1990
- 23) Mosmann T. Rapid calorimetric assay for cellular growth and survival: application of proliferation and cytotoxic assay. *J Immunol Methods* 65: 55-63, 1983
- 24) Benson AM, Hunkeler MJ, Talalay P. Increase of NAD(P)H: quinone reductase by dietary antioxidants: Possible role in protection against carcinogenesis and toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 5216-5220, 1980
- 25) Phillips AH, Langdon RG. Hepatic triphosphopyridine nucleotide-cytochrome *c* reductase: isolation, characterization, and kinetic studies. *J Biol Chem* 237: 2652-2660, 1962
- 26) Yubisui T, Takeshita M. Purification and properties of soluble NADH-cytochrome *b₅* reductase of rabbit erythrocytes. *J Biochem* 91: 1467-1477, 1982
- 27) Griffith OW. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal Biochem* 106: 207-212, 1980
- 28) Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferase. *J Biol Chem* 249: 7130-7139, 1974
- 29) Kennedy KA, Rockwell S, Sartorelli AC. Preferential activation of mitomycin C to cytotoxic metabolites by hypoxic tumor cells. *Cancer Res* 40: 2356-2360, 1980
- 30) Walton MI, Smith PJ, Workman P. The role of NAD(P)H: quinone reductase (EC 1.6.99.2, DT-diaphorase) in the reductive bioactivation of the novel indoloquinone antitumor agent EO9. *Cancer Commun* 3: 199-206, 1991
- 31) Kono M, Saitoh Y, Kasai M, Sato A, Shirahata K, Morimoto M, Ashizawa T. Synthesis and antitumor activity of a novel water soluble mitomycin C analogue; 7-N-{{2-{{2-(γ -L-glutamylamino)ethyl}dithio)ethyl}}-mitomycin C. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 37: 1128-1130, 1989
- 32) Workman P, Walton MI, Powis G, Schlager JJ. DT-diaphorase: questionable role in mitomycin C resistance, but a target for novel bioreductive drugs? *Br J Cancer* 60: 800-802, 1989
- 33) Schlager JJ, Powis G. Mitomycin C is not metabolized by but is an inhibitor of human kidney NAD(P)H:(quinone-acceptor)oxidoreductase. *Cancer Chemother Pharmacol* 22: 126-130, 1988
- 34) Marshall R, Rauth AM, Paterson M. Reply to the letter from Workman *et al.* *Br J Cancer* 60: 803, 1989
- 35) Doroshow J, Akman S, Forrest G. Effect of DT-diaphorase overexpression on mitomycin C toxicity for chinese hamster ovary cells. *Proc Am Assoc Cancer Res* 33: 507, 1992
- 36) Dulhanty AM, Whitmore GF. Chinese hamster ovary cell lines resistant to mitomycin C under aerobic but not hypoxic conditions are deficient in DT-diaphorase. *Cancer Res* 51: 1860-1865, 1991
- 37) Begleiter A, Robotham E, Lacey G, Leith MK. Increased sensitivity of quinone resistant cells to mitomycin C. *Cancer Lett* 45: 173-176, 1989
- 38) Marshall RS, Paterson MC, Rauth AM. Deficient activation by a human cell strain leads to mitomycin C resistance under aerobic but not hypoxic conditions. *Br J Cancer* 59: 341-346, 1989
- 39) Bailey SM, Sugget N, Walton MI, Workman P. Structure-activity relationships for DT-diaphorase reduction of hypoxic cell directed agents: Indoloquinones and diaziridinyl benzequinones. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 22: 649-653, 1992
- 40) Keyes SR. Modification of the metabolism and cytotoxicity of bioreductive alkylating agents by dicoumarol in aerobic and hypoxic murine tumor cells. *Cancer Res* 49: 3310-3313, 1989
- 41) Keyes SR, Rockwell S, Sartorelli AC. Correlation between drug uptake and selective toxicity of porfiromycin to hypoxic EMT6 cells. *Cancer Res* 47: 5654-5657, 1987
- 42) Walton MI, Bibby MC, Double JA, Plumb JA, Workman P. DT-diaphorase activity correlates with sensitivity to the indoloquinone EO9 in mouse and human colon carcinomas. *Eur J Cancer* 28A: 1597-1600, 1992
- 43) Lee J, Naito M, Tsuruo T. Nonenzymatic reductive activation of 7-N-{{2-{{2-(γ -L-glutamylamino)ethyl}dithio)ethyl}}mitomycin C by thiol molecules: a novel mitomycin C derivative effective on mitomycin C-resistant tumor cells. *Cancer Res* 54: 2398-2403, 1994

Establishment of Mitomycin C-resistant Non-small Cell Lung Cancer Cell Lines and the Mechanisms of Resistance

Kazuhiko Shibata, Department of Internal Medicine (III), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920 - J. Juzen Med Soc., **106**, 302 - 311 (1997)

key words : mitomycin C, DT-diaphorase, EO9, KW-2149, non-small cell lung cancer

Abstract

To elucidate the mechanisms of acquired resistance to mitomycin C (MMC) in non-small cell lung cancer (NSCLC), two MMC-resistant NSCLC sublines were established using PC-9 as a parent cell line by continuous exposure to MMC. The sublines, PC-9/MC2 and PC-9/MC4, were 6.4- and 10-fold more resistant to MMC than their parent cell line, respectively, at the IC_{50} value by MTT assay. They exhibited cross-resistance to EO9, but were not resistant to cisplatin, vindesine, etoposide, carboquone, or a novel MMC derivative, KW-2149. They were collaterally sensitive to adriamycin and menadione. Intracellular accumulation of MMC was reduced in the resistant sublines to about 60% of that in the parent cells. Cytosolic DT-diaphorase (DTD) activities were reduced to 13.5 ± 3.2 in PC9/MC2 and 1.3 ± 0.6 in PC-9/MC4 from 261.5 ± 92.7 nmol/min/mg prot. in the parent PC-9. NADH:cytochrome *b*₅ reductase activities in both of the resistant cell lines significantly decreased compared to that in the parent cell line. Addition of dicumarol resulted in two-fold increase in the IC_{50} value in PC-9, whereas the IC_{50} value showed no change in PC-9/MC4. Moreover, dicumarol did not affect the sensitivities to KW-2149 but did decrease the sensitivities to EO9 in both the parent and the resistant cell line. Formation of alkylating metabolite had significantly decreased in the resistant cells parallel to the degree of resistance. It was concluded that deficient drug activation due to decreased DTD activity was important as a mechanism of resistance to MMC in PC-9, a relatively DTD-rich NSCLC cell line.