

Inhibition of Potentially Lethal Damage Repair after Cisplatin Treatment with Caffeine in Human Osteosarcoma Cells

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/2297/8337

ヒト骨肉腫培養細胞におけるシスプラチン投与後の DNA 損傷からの回復現象とカフェインによる抑制

金沢大学医学部整形外科科学講座 (主任: 富田勝郎教授)

安 竹 秀 俊

(平成4年3月16日受付)

ヒト骨肉腫培養細胞におけるシスプラチン投与後の DNA 損傷からの回復現象の発現と、これに対するカフェインの阻害作用、およびカフェインの作用機序について検討した。骨肉腫細胞を定常状態にまで培養してからシスプラチンを投与し、その後低栄養状態の培養液で培養すると、シスプラチン投与後すぐにコロニーを形成させたものと比較して、時間の経過とともにコロニー形成率の上昇が見られた。また、このとき細胞毒性を示さない濃度の 1mM カフェインを低栄養状態の培養液に加えて培養すると、時間依存性にコロニー形成率の著明な低下が見られた。細胞周期の変動を調べたところ、シスプラチン投与後は24時間後まで徐々にS期の蓄積が見られ、その後 G₂/M 期の蓄積に変わり、さらに低栄養状態で72時間まで培養すると、しだいにこの蓄積は解除され回復現象を表わす結果が得られた。しかし、カフェインを添加するとS期の蓄積は見られず G₂/M 期の蓄積が見られ、時間の経過とともにこの蓄積は増加し回復現象は認められなかった。一方、シスプラチン投与後の DNA 合成を ³H-チミジンの取り込みで調べると、シスプラチン投与後24時間までコントロールの約25%に抑制されるが、カフェインの添加により有意に回復した。また、オートラジオグラフィで細胞当たりの DNA 合成を比較したところ、シスプラチン投与後のカフェイン添加によってグレイン数はシスプラチン単独と比べて有意に増加していた。一方、シスプラチン投与後の DNA 結合プラチナ量を原子吸光法で調べると、投与後12時間までにプラチナ量は急激に減少し、その後徐々に減少するという2相性の変化を示した。また、カフェイン添加でも同様にプラチナ量は減少した。したがって骨肉腫細胞の DNA からのプラチナ除去修復にはカフェインは影響しないと考えられる。本研究では骨肉腫培養細胞において、シスプラチン投与後に低栄養状態に保つことによりその生存率の回復が観察された。また、1mM のカフェイン添加によって回復が抑制され、シスプラチンの効果を相乗的に増強する結果を得た。以上の結果からシスプラチンによって障害を受けた DNA はS期において合成遅延をきたすが、カフェイン添加により障害をもつ DNA を鋳型とする DNA 合成が促進され、障害を致命的にすることがシスプラチン、カフェインの相乗効果を説明すると考えられる。

Key words caffeine, cisplatin, DNA repair, human osteosarcoma

骨肉腫の治療成績は化学療法の進歩にともない飛躍的に向上している。最近では術前のシスプラチンの動脈内注入療法が効果的とされ^{1)~3)}、各施設で行われているが、現在のところ5年生存率は50~60%であり^{4)~6)}、その効果にも限界がある。シスプラチンは DNA の2本鎖のうち一本鎖上の隣接するグアニン残基と鎖内架橋を形成することによって DNA 合成阻害を起こすと考えられている⁷⁾。シスプラチンは正常細胞の DNA に対しても同様に架橋を形成するが、修復能が活発であるため障害作用はほとんど出現しない⁸⁾。抗癌剤に対する耐性を考える場合、骨肉腫細胞においても DNA 修復機構が働き、シスプラチンの作用が十分発揮されていないことが推察される。実際、ヒト骨肉腫培養細胞において放射線による DNA 損傷後には回復現象が見られることが報告されており^{9)~10)}、臨床的に骨肉腫が放射線に低感受性であることの理由の一つとなっている。一方キサンチン誘導体であるカフェインを、放射線あるいは紫外線照射後に

投与することにより、先の回復現象は抑制され、細胞致死効果の増強が見られることが示されている^{11)~12)}。またアルキル化剤やシスプラチンの投与後にカフェインを添加しても細胞致死効果の増強が見られることも報告されている^{13)~16)}。これは主としてカフェインが DNA 修復阻害作用を持つためと考えられている^{17)~18)}が、具体的な作用機序は不明である。今回、細胞過密 (confluent) 状態にあるヒト骨肉腫培養細胞を用いて、臨床に近似した条件下でシスプラチンを投与し、その後の生存率の回復とカフェイン添加による回復現象の抑制、およびカフェインの作用機序を検討した。

対象および方法

1. 対数増殖期におけるシスプラチンとカフェインの併用効果

ヒト骨肉腫培養細胞株 osteogenic sarcoma Takase (OST, 当

Abbreviations: CIA, chloroform-isoamyl alcohol; DMEM, Dulbecco's modified Eagle medium; DP, delayed plating; EDTA, ethylene diaminetetraacetic acid; IP, immediate plating; OST, osteogenic sarcoma Takase strain; PBS, phosphate buffered saline; PCA, perchloric acid; SDS, sodium dodecyl sulfate; STE, saline-Tris-EDTA; TCA, trichloroacetic acid; TE, Tris-EDTA

教室にて樹立¹⁹⁾), HOS (大日本製薬, 大阪), U-2OS (住友製薬研究所, 大阪) を 60mm ディッシュファルコン (Becton Dickinson & Co. Oxnard, USA) に400個づつ播種し, 10%仔牛胎児血清 (Hazleton, St. Lenexa, USA) を加えた培養液 (Dulbecco's modified Eagle medium) (日本製薬, 東京) で4~5時間培養してディッシュに定着していることを顕微鏡下に確認したのちに, 各濃度のシスプラチン (日本製薬, 東京) を投与し1時間接触させた。その後, 0.16M 磷酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline, PBS) (日本製薬) で洗浄し, 培養液を加えて2週間培養した。このとき 1mM のカフェイン (無水カフェイン) (和光純薬, 大阪) を, シスプラチン処理後24時間および2週間持続して培養液内に加えた。培養は全て37°C, 5% CO₂, 水蒸気飽和の状態で行なった。2週間後ギムザ染色を行ない, 肉眼で確認できるコロニーをカウントした。

II. 細胞過密状態の骨肉腫細胞におけるシスプラチンとカフェインの併用効果

5X10⁶個の OST 細胞を 60mm ディッシュに播種し, 5~6日間毎日培養液を交換しながら培養を行なった。その後細胞が過密状態になったところで 5 μg/ml, および 10 μg/ml のシスプラチンを1時間接触させ PBS で洗浄した。以下, 次のように実験を行なった。

1. 直ちにトリプシン (Flow Laboratories, Mclean, USA) で細胞をはがして, 400個づつディッシュに細胞を植え込み, 2週間後のコロニーをカウントする (immediate plating, IP)。

2. 2.5%仔牛胎児血清を含む培養液 (低栄養培養液) に, 1mM カフェインを加えたものと加えないものとで培養しながら, 経時的にトリプシンで細胞をはがして, 1. と同様にコロニーを形成させ2週間後にカウントを行った (delayed plating, DP)。

3. 1, 2でトリプシン処理してはがした細胞を, フローサイトメトリー CS-20 (昭和電光, 東京) を用いて DNA ヒストグラムを求め細胞周期上の変化を解析した。細胞を4°Cの70%エタノールで30分以上固定した後1000回転で5分間遠沈し, 500mlの蒸留水にクロモマイシン A₃ (武田薬品, 大阪) 10mg と塩化マグネシウム (和光純薬) 1.5g を溶解した液を 2ml 入れ, 30分間4°Cの冷蔵庫内に静置して細胞を染色した。また標準試料としてニワトリ赤血球を用い, レーザー光は 457.9nm (アルゴンレーザー) を用いた。

III. シスプラチン投与後の DNA 合成に対するカフェインの効果

1. 相対的 DNA 合成量の検討

細胞の DNA 合成量をチミジンの取り込みで測定し, シスプラチン投与後の変化とカフェイン添加の影響について比較検討した。OST 細胞 5X10⁶個を 60mm ディッシュにまき, ¹⁴C-チミジン ([^{2-¹⁴C}] チミジン; 1.85MBq, アマシャムジャパン株式会社, 東京) を 0.37KBq/ml 加え3日間培養した。細胞をトリプシン処理してはがし, 直径 20mm のカバースリップ (三光純薬, 東京) を入れた 35mm ディッシュに 1X10⁶個づつ播種して4日間培養し, ほぼ細胞過密の状態とした。ついで 5 μg/ml のシスプラチンを1時間接触させ PBS で洗浄後 1mM カフェインの存在, あるいは非存在下で低栄養培養液にて培養を行なった。0時間, 6時間, 12時間, 18時間, 24時間後に ³H-チミジン ([メチル-³H] チミジン; 37MBq, アマシャムジャパン株式会社) 0.185MBq/ml で30分間標識した。カバースリップを取

り出し PBS で洗った後に100%メタノール固定を行ない, 乾燥後5%過塩素酸 (perchloric acid, PCA) で5分間処理した。さらにプレートを乾燥後70%エタノールで洗い, 乾燥したあと液体シンチレーションカウンター LSC-3100 (アロカ, 東京) で ³H と ¹⁴C の値を測定し, ¹⁴C あたりの ³H の値をコントロールとの比で求めた。

2. 細胞あたりの DNA 合成量の検討

各細胞あたりの DNA 合成量をオートラジオグラフィ法を用いて表わし, シスプラチンとカフェインの効果を比較検討した。OST 細胞をチェンバースライド (Lab-Tec chamber slide, Nunc, Naperville, USA) にまき, 5日間培養液を交換しながら細胞過密状態になるまで培養した。ついで 5 μg/ml のシスプラチンを1時間接触させたあと PBS で洗浄し, 1mM カフェインの存在, 非存在下で低栄養培養液にて培養した。経時的にスライドを取り出して 0.37MBq/ml の ³H-チミジンを1時間接触させたあと, 1. と同様にメタノール固定, PCA 処理を行なって乾燥した。その後暗室内で42°Cに融解したオートラジオグラフィ用エマルジョン NR-M2 (コニカ, 東京) にスライドを浸し, 乾燥させてからシリカゲル入りの暗箱に入れ, 4°Cの冷蔵庫内で7日間露光させた。ついでスライドを20°Cの現像液コニカドール X (コニカ, 東京) で7分間浸して現像し, さらに20°Cの定着液フジフィックス (フジ, 東京) で10分間定着した。5分間水で洗浄後乾燥し, ギムザ染色を行なった後顕微鏡下で細胞当たりのグレインを数えた。50個以上の細胞を数え, その平均値を求めた。

IV. シスプラチン投与後の DNA 結合プラチナの修復動態に及ぼすカフェインの効果

OST 細胞 1X10⁶個を 150mm ディッシュにまき, 7日間培養し, 細胞過密状態になったところで 10 μg/ml のシスプラチンを1時間接触させた。PBS で洗浄後, 1mM カフェインの存在, 非存在下で低栄養培養液にて培養した。経時的にディッシュを取り出し Mizuno ら²⁰⁾の方法に準じて DNA の抽出を行なった。すなわち, まず 1%ドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecylsulfate, SDS) を含む食塩-Tris-エチレンジアミン4酢酸 (ethylenediamine tetraacetic acid, EDTA (Saline-Tris-EDTA, STE) 緩衝液 (0.1M NaCl, 10mM Tris-HCl (pH8.0), 1mM EDTA (pH8.0)) 2ml をディッシュに加えて細胞を溶解し, これをラバーポリスマンで集め, プロテナーゼ K (proteinase K) (Merk, Dalmstadt, Germany) 200 μg/ml を加えて37°Cで24時間処理した。次に飽和フェノール (フェノールを 0.1M Tris-HCl (pH7.4) にて飽和したもの) を加え20分間蛋白分解を行ない, 遠心したあと上清を集めクロロホルム-イソアミルアルコール (chloroform-isoamyl alcohol, CIA) 液 (クロロホルム24容量に対してイソアミルアルコール1容量の割合で混合したもの) を加えて20分間振盪し, 再び遠心して上清を集めた。この操作をもう1度繰り返した後, 氷冷エタノールを加えて DNA を沈殿させ, 遠心し乾燥させた。ついで DNA に Tris-EDTA (TE) 緩衝液 (10mM Tris-HCl (pH8.0), 1mM EDTA (pH8.0)) 1ml を加え溶解し, 1mg/ml の RNA 分解酵素 A (Sigma, ST. Louis, USA) 50 μg/ml を加え37°Cで1時間 RNA の分解を行なった。再びフェノール, CIA で処理後, 5M の塩化ナトリウムを最終濃度 250mM となるように加え, エタノール沈殿し乾燥させた。DNA の定量は Burton の変法²¹⁾に従った。すなわち乾燥した DNA に 5%トリクロル酢酸 (trichloroacetic acid, TCA)

200 μ l を加え 80°C で 20 分間溶解した。その一部を 5% TCA で 100 倍希釈した DNA 溶液 2ml に対し、ジフェニルアミン試薬 (1.5g ジフェニルアミンを 100ml の氷酢酸に溶解し、1.5ml の濃硫酸を加えたものにアセトアルデヒドを 16mg/ml となるように加えた試薬) を 4ml 加え、30°C で 20 時間反応させた。ついで吸光度計 UV-160A (島津製作所、京都) にて 600m μ の吸収を測定した。あらかじめ作成しておいたウシ胸腺 DNA (Sigma) による吸光度の標準曲線から抽出した DNA 量を求めた。一方、DNA 溶液内のプラチナ含量は原子吸光計 Zeeman z-8100 型 (日立、東京) を用いて測定した。

V. 統計学的検討法

各実験の有意差検定には、分散分析のあと Dunnett 法または Scheffe の多変比較法を用い、 $p < 0.05$ を有意とした。

成 績

I. 対数増殖期におけるヒト骨肉腫培養細胞に対するシスプラチンとカフェインの効果

OST 細胞では、各濃度のシスプラチンを接触後に、細胞毒性のほとんど無い濃度の 1mM カフェインを持続接触することにより、コロニー形成率は著明に抑制された。例えばシスプラチン 2.0 μ g/ml および 5.0 μ g/ml を投与した時、非投与群のそれを 1.0 とした場合 0.53、および 0.21 となるが、カフェインの併用によりそれぞれ 0.059、0.0013 と約 10 倍、および 160 倍の細胞致死効果の増強が示された。また、シスプラチン接触後 24 時間カフェイン処理を行なっても、シスプラチン 2.0 μ g/ml、5.0 μ g/ml でそれぞれ 0.27、0.075 と約 2 倍、3 倍の効果増強を示した (図 1)。

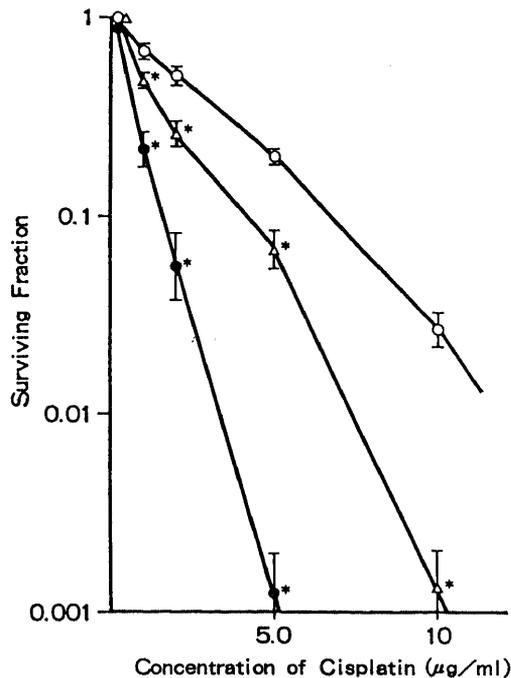


Fig. 1. The synergistic effect of cisplatin and caffeine on OST cells in the exponential phase. The cells were seeded for colony formation and several hours later they were treated with cisplatin. \circ , cisplatin alone; \triangle , cisplatin followed by 1 mM of caffeine treatment for 24 hr; \bullet , cisplatin followed by continuous-1 mM of caffeine treatment. *, $p < 0.05$ vs cisplatin alone.

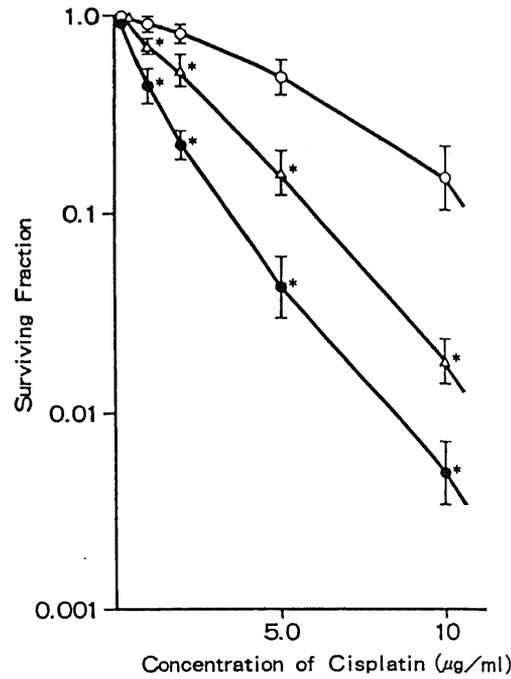


Fig. 2. The synergistic effect of cisplatin and caffeine on U-2OS cells in the exponential phase. The cells were seeded for colony formation and several hours later they were treated with cisplatin. \circ , cisplatin alone; \triangle , cisplatin followed by 1 mM of caffeine treatment for 24 hr; \bullet , cisplatin followed by continuous-1 mM of caffeine treatment. *, $p < 0.05$ vs cisplatin alone.

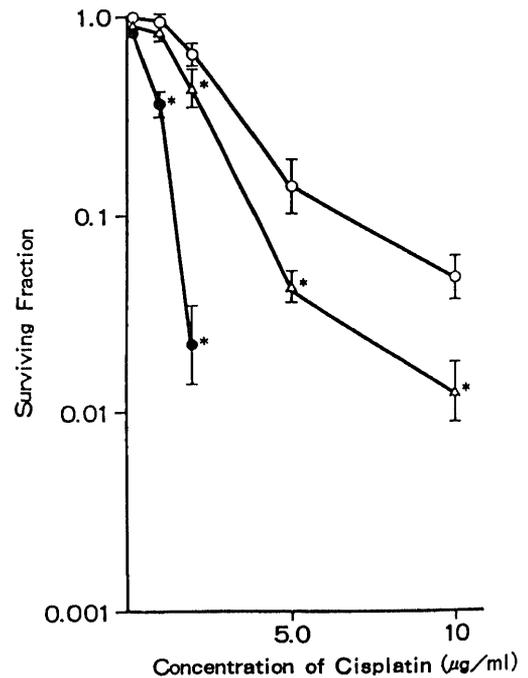


Fig. 3. The synergistic effect of cisplatin and caffeine on HOS cells in the exponential phase. The cells were seeded for colony formation and several hours later they were treated with cisplatin. \circ , cisplatin alone; \triangle , cisplatin followed by 1 mM of caffeine treatment for 24 hr; \bullet , cisplatin followed by continuous-1 mM of caffeine treatment. *, $p < 0.05$ vs cisplatin alone.

他のヒト骨肉腫由来の細胞である HOS, U-2OS でもシスプラチンとカフェインの併用効果を見たところ, OST と同様に 1mM のカフェインを薬剤接触後に持続投与することにより, 著明なコロニー形成率の抑制効果が認められた. またカフェイン24時間処理によってもシスプラチン単独投与と比較して有意に抑制率の増強が認められた (図2, 3).

Ⅱ. 細胞過密状態におけるシスプラチンとカフェインの効果
 ほぼ細胞過密状態になるまで培養した OST 細胞にシスプラチンを投与し, すぐに細胞を播種した IP では, コントロールを1とした場合, シスプラチン 5.0 μ g/ml, 10 μ g/ml ではそれぞれ 0.21, 0.057 とほぼ対数増殖期にある細胞と同じ程度の生存率が得られた. しかしシスプラチン処理につづいて低栄養状態の培養液で種々の時間培養後, 細胞を播種しコロニーを形成させた DP では, 培養時間とともに生存率が有意に上昇した. すなわちシスプラチン 5.0 μ g/ml, および 10 μ g/ml 投与後, 24時間低栄養培地で培養すると IP と比較し両者ともそれぞれ約1.8倍の生存率の上昇が見られた. また72時間培養群では, それぞれ IP と比較し3.4倍, および7倍の生存率の上昇となった. しかし72時間以上低栄養状態で培養を続けても生存率はそれ以上上昇しなかった. 一方, 低栄養培養液に 1mM カフェインを添加すると生存率の上昇は見られず, 逆に対数増殖期でのシスプラチンとカフェインの併用効果と同様に, コロニー形成率が著明に抑制された. またこの抑制効果は時間依存性であり, 72時間まではカフェイン添加時間が長いほどコロニーの形成は抑制され, シスプラチン 10 μ g/ml 投与では IP と比較して約33倍, カフェインを加えずに低栄養培養液で培養した DP と比較すると約230倍もコロニー形成率が抑制された (図4).

Ⅲ. シスプラチン投与後の細胞周期の変動とカフェインの効果

OST 細胞に 5.0 μ g/ml のシスプラチンを投与後, DNA ヒス

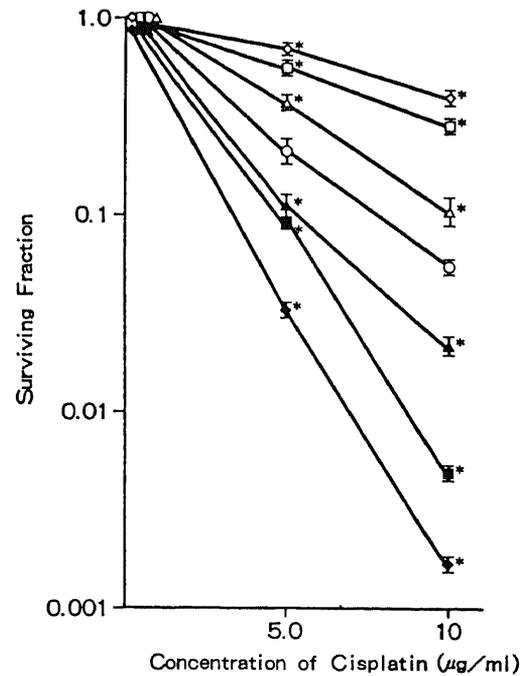


Fig. 4. The synergistic effect of cisplatin and caffeine on the killing of OST cells in plateau phase. The cells were cultured up to confluency and then treated with various concentrations of cisplatin. The cells were seeded for colony formation immediately thereafter (○), after 24 hr incubation in a low nutrient medium (△), after 48 hr incubation in a low nutrient medium (□), after 72 hr incubation in a low nutrient medium (□), after 24 hr incubation in a low nutrient medium with 1 mM of caffeine (▲), after 48 hr incubation in a low nutrient medium with 1 mM of caffeine (■), or after 72 hr incubation in a low nutrient medium with 1 mM of caffeine (■), *, $p < 0.05$ vs immediate plating.

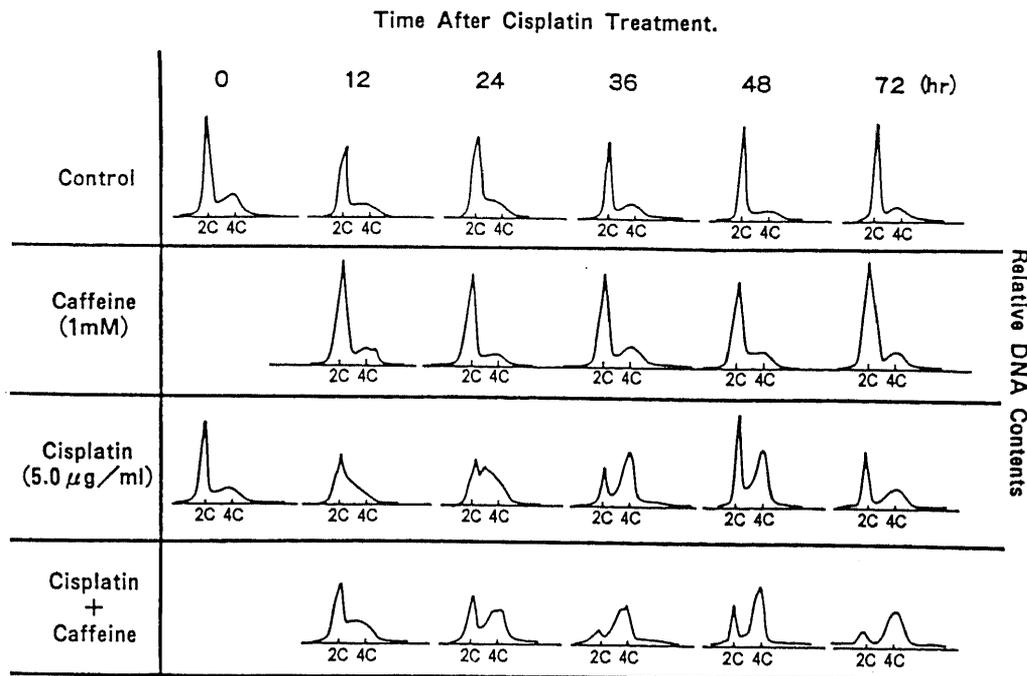


Fig. 5. The effect of caffeine on cell cycle progression after cisplatin treatment. OST cells were cultured up to confluency. Then they were treated with cisplatin and incubated in a low nutrient medium with or without 1 mM of caffeine. At consecutive times after cisplatin treatment, the cells were harvested and examined by flow cytometer.

トグラムを経時的に調べたところ6時間後にすでにS期の蓄積が見られ、12時間、24時間と経過するにつれS期の蓄積が増加した。しかし、このS期での蓄積は36時間後では見られなくなり、代わってG₂/M期の蓄積が著明に見られるようになった。

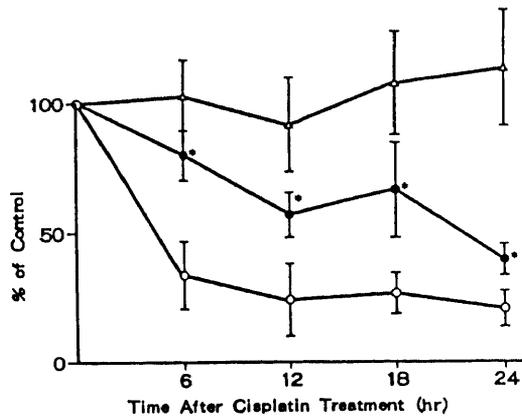


Fig. 6. The effect of caffeine on thymidine uptake after cisplatin treatment. OST cells were labeled with ¹⁴C-thymidine for three days and seeded in the dishes. They were cultured up to confluency. Then the cells were incubated with 1 mM of caffeine (△), or treated with 5 μg/ml of cisplatin and incubated in a low nutrient medium without caffeine (○), or with 1 mM of caffeine (●). At consecutive times after cisplatin treatment, the cells were pulse-labeled with ³H-thymidine for 30 min. The cells were fixed with ethanol and measured by a liquid scintillation counter. The ratio of ³H to ¹⁴C was calculated and its percentage of control was shown. *, p < 0.05 vs cisplatin alone.

さらに、48時間、72時間後には、G₂/M期の蓄積は徐々に解除され、非投与群のそれに近い通常の細胞周期に戻った。一方、シスプラチン投与後に1mMのカフェインを持続的に投与すると、シスプラチン投与群に見られたS期の蓄積は起こらず、代

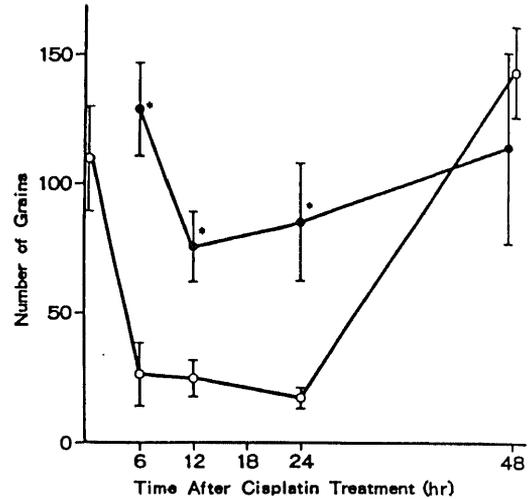
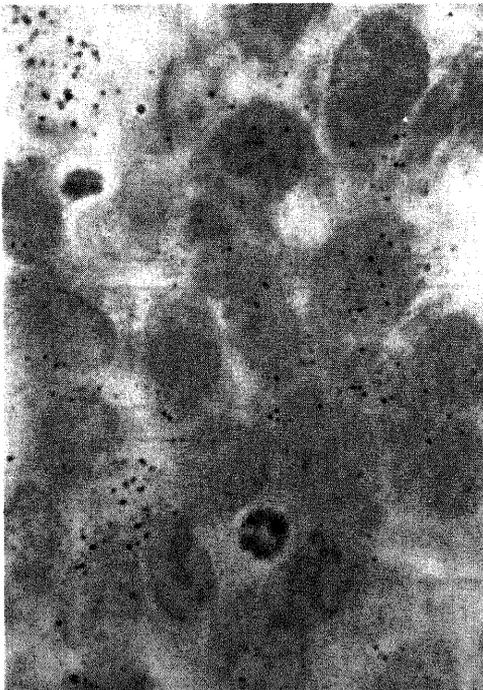
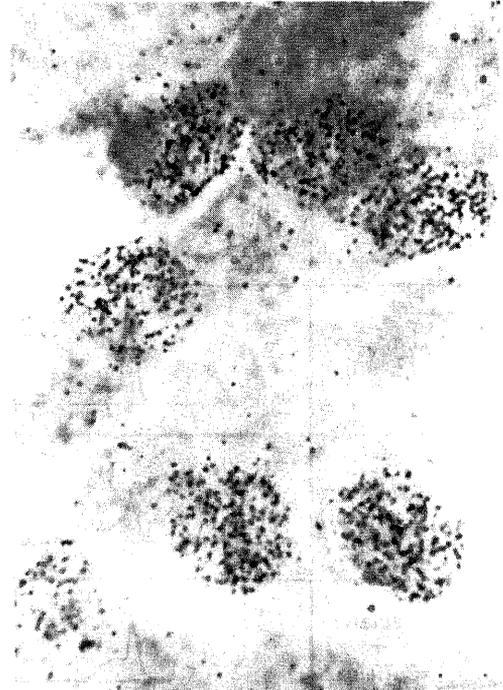


Fig. 7. The effect of caffeine on DNA synthesis after cisplatin treatment. OST cells were cultured up to confluency. Then they were treated with cisplatin followed by incubation in a low nutrient medium without caffeine (○), or with 1 mM of caffeine (●). At consecutive times after cisplatin treatment, the cells were labeled with ³H-thymidine and cells were processed for autoradiography. The number of grains on the cell nucleus were counted and plotted on the figure. *, p < 0.05 vs cisplatin alone.



(a)



(b)

Fig. 8. Grains on the nuclei of OST cells as seen by autoradiography. Confluent OST cells were treated for 1 hr with 5 μg/ml of cisplatin. They were incubated for 12 hr in a low nutrient medium without caffeine (a) (× 1400), or with 1 mM of caffeine (b) (× 1400). Subsequently cells were treated with ³H-thymidine for 1 hr and processed for autoradiography.

わって G₂/M 期の蓄積が12時間後からすでに観察された。その後時間の経過とともに G₂/M 期の蓄積は増加し、シスプラチン単独投与の場合に見られたような細胞周期の正常化は見られなかった。また、1mM カフェインのみを投与した群では72時間に至るまで全て非投与対照群と同じであった(図5)。

IV. シスプラチン投与後の DNA 合成に対するカフェインの効果

1. 相対的 DNA 合成量の検討

5.0 μg/ml のシスプラチンを投与後の相対的 DNA 合成量は、6時間後に対照群の34%に抑制され、その後はほぼ横這いとなり24時間後には約20%に抑制されていた。しかし、シスプラチンを投与後 1mM カフェインを投与すると、対照群と比較した場合、6時間後には約80%と DNA 合成は軽度の抑制を受けるものの、シスプラチンのみの投与群と比較して有意に DNA 合成が回復していた。その後も徐々に DNA 合成は抑制を受けるが、シスプラチンのみの投与群と比較すると、各時間ごとで有意差が見られ、相対的 DNA 合成量はカフェインを投与することでシスプラチンによる抑制から一部解除されることが示された。しかし、1mM カフェイン単独投与群では、DNA 合成は抑制も促進もされず非投与対照群とほぼ同じであった(図6)。

2. 細胞当たりの DNA 合成量の検討

オートラジオグラフィにより標識された細胞の核内グレイン数は、コントロールで110±20個であったが、5.0 μg/ml のシスプラチン投与後6時間で26±12個と約25%に低下した。その後も徐々にグレイン数は減少し、24時間では15%まで減少するが、48時間後のグレイン数は非投与対照群のレベルまで回復した。一方、シスプラチン投与後カフェインを投与した群では、各細胞内のグレイン数はシスプラチン単独投与群に比べ明らかに多く、一番抑制された12時間でも76±13個であり、非投与対照群の約70%であった。つまり、シスプラチン投与により細胞1個当たりの DNA 合成は直ちに抑制されるが、カフェイン存在下ではあまり抑制されず、シスプラチン単独投与と比較

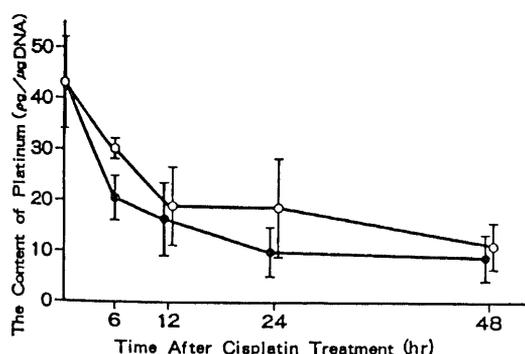


Fig. 9. The effect of caffeine on the content of DNA-bound platinum after cisplatin treatment. OST cells were cultured up to confluency. They were treated with 10 μg/ml of cisplatin for 1 hr followed by incubation in a low nutrient medium without caffeine (○), or with 1 mM of caffeine (●). At consecutive times following cisplatin treatment the cells were harvested and their DNA were extracted. The content of DNA-bound platinum was determined by an atomic absorption spectrophotometry. The concentration of platinum per DNA was calculated and plotted on the figure.

して有意に高い値を示した(図7, 8)。

V. DNA 結合プラチナの修復動態に及ぼすカフェインの効果

OST 細胞に 10 μg/ml のシスプラチンを 1 時間接触させたときの DNA 結合プラチナ濃度は 42.6 pg/μg DNA であった。これを低栄養培養液で培養しておくプラチナ含量は 6 時間で 29.8, 12 時間では 18.6 pg/μg DNA と急激に減少し、その後徐々に現象して 48 時間後では 11.0 pg/μg DNA と投与直後の約 26% に現象した。1mM のカフェインを含む低栄養培養液で培養した群でも DNA 結合プラチナ量は減少し、6 時間で 20.8, 12 時間で 16.3, 48 時間後には 9.8 pg/μg DNA と投与直後の 23% に減少していた。カフェイン投与群と非投与群を比較すると、カフェイン投与群のほうが DNA 結合プラチナ量の減少が早い傾向にあったが、統計学的な有意差は認められなかった(図9)。

考 察

シスプラチンは 1965 年 Rosenberg ら²⁹⁾によりその抗腫瘍効果が示されて以来、多くの領域で用いられてきた薬剤であるが、近年整形外科領域でも骨肉腫を始めとする多くの骨軟部悪性腫瘍において、術前後の全身あるいは局所の投与により生存率の向上に役立ってきた。しかし症例によっては効果の見られない例や、初期には効果的であっても繰り返し投与するうちに無効となってくる例も見られ、シスプラチンの効果は完全ではない。シスプラチンをはじめ各種抗癌剤を投与する場合に、その治療効果上問題となることの一つに薬剤に対する耐性の獲得が挙げられる。薬剤に対する耐性発現の機序には、シスプラチンの取り込みの低下、活性化の障害、DNA 修復能の促進が考えられている²⁹⁾。中でも DNA 修復能の促進が、シスプラチンに対する耐性細胞に見られる報告が多く^{24)~27)}重要な耐性機構の一つであると考えられる。

一方、障害を受けた細胞が時間の経過とともに修復され、生存率が上昇する現象として潜在致死損傷の回復現象がある。これは 1967 年 Phillips と Tolmach ら²⁸⁾によって発見された現象であるが、彼らは HeLa 細胞を用いて放射線照射を行なったあと、時間の経過とともに生存率が上昇し、本来致死的な障害の表現が阻止されることを示した。さらに Little ら²⁹⁾は細胞は増殖が押さえられた定常状態に保つことにより、この回復現象が進むことを報告した。この潜在致死損傷の回復現象は、放射線照射後だけでなくブレオマイシンやアドリアマイシンなどの抗癌剤の投与後にも見られることが報告されており^{30)~33)}、化学療法を行ううえで非常に重要な現象と考えられる。特に定常状態の細胞培養系は試験管内での腫瘍モデルと考えられ²⁹⁾、臨床抗腫瘍剤を投与する状況により近付くためにも、細胞増殖をある程度抑制した状態で薬剤を投与することが望ましいと考えられる。本研究では骨肉腫に対するシスプラチンとカフェインの作用を検討した。臨床応用を考慮して、細胞を過密状態にまで培養後薬剤を投与し、さらに培養液は血清濃度を通常の 4 分の 1 として低栄養状態を作り、増殖をある程度抑制した状態で培養する実験系を採用することにした。

当教室で樹立したヒト骨肉腫培養細胞である OST を定常状態にまで培養後シスプラチンを投与し、すぐに播種してコロニー形成を行なうと、対数増殖期にある細胞に投与した場合に比較しコロニー形成率が若干上昇した。細胞が過密状態に置か

れた場合、対数増殖期と比べシスプラチンの取り込みが減少することや、DNA 修復が旺盛となる、などがその理由として考えられる。さらに今回の実験ではシスプラチンによる潜在致死損傷からの回復現象の発現を見るため、低栄養状態の培養液で培養しながら経時的に細胞を播種しコロニー形成を行なったところ、細胞を播種するまでの時間が長くなるほどコロニー形成率は高く、72時間では IP と比較して最高7倍までコロニー形成率が上昇した。しかし、これ以上低栄養状態で培養してもコロニー形成率が上昇することはなかった。一般に潜在致死損傷からの回復現象は、障害を受けてから数時間のうちに見られ、24時間以内にほとんど一定となる報告が多い³¹⁾³²⁾³⁴⁾³⁵⁾。しかし今回使用した OST 細胞では、シスプラチンによる損傷を与えてから72時間まで生存率の上昇が見られた。このことは OST 細胞の DNA 修復能力が他の細胞に比べ高いためか、あるいはシスプラチンによる損傷からの修復に要する時間が長くなるためか不明である。いづれにしても、骨肉腫に有効とされているシスプラチンを臨床条件に近似した定常状態の培養細胞に投与したあとに、その損傷からの回復現象が観察されたことは、実際の治療においても同様な回復現象が発現することを伺わせるものである。シスプラチン投与後の細胞に発現する潜在致死損傷の回復は、一方ではその治療効果を減弱低下させる要因であり、また細胞の持つ一種の耐性機構の表現とも考えられる。

次にカフェインによるシスプラチンの効果増強について考察する。カフェインはキサンチン誘導体の一つであるが、多くの作用を有することが知られている。例えば染色体異常の誘発、DNA 合成の抑制、DNA 修復（除去修復、複製後修復）の阻害、RNA 合成および蛋白合成の阻害などが報告されている³⁶⁾。放射線や紫外線照射後にカフェインを投与すると細胞致死効果が増強されることも知られている³⁷⁾³⁸⁾。また土屋³⁹⁾はヒトの悪性腫瘍由来の細胞、および生体材料を用いて、さまざまな抗癌剤を細胞に接触させたあとに細胞毒性のない濃度のカフェインを投与することにより、細胞致死効果が増強されることを明らかにしている。

今回の実験では、まず3種類の骨肉腫培養細胞株を用いてシスプラチンとカフェインの併用により細胞致死効果の増強が見られるかどうかをコロニー形成法により確かめた。対数増殖期にある OST、U-2OS、HOS では、シスプラチンを1時間接触後毒性を示さない濃度の 1mM カフェインを持続接触させることによって、コロニー形成率が相乗的に抑制される結果が得られた。さらに定常状態に近づけるため、細胞過密状態に培養した OST に対しても、シスプラチンを投与後にカフェインを投与すると、時間依存性にコロニー形成は抑制され、カフェインを投与していない対照群と比較して有意な差が見られた。したがってカフェインは OST に対するシスプラチンの細胞致死効果を、対数増殖期、および定常状態両方で増強することが示された。

一方、細胞過密状態に培養した OST 細胞にシスプラチンを投与後、低栄養培養液で培養しながら経時的に細胞を撤くと、時間の経過とともにコロニー形成率が上昇した。これはいわゆる潜在致死損傷からの回復現象の発現が確認されたものである。これまで抗癌剤投与後の潜在致死損傷からの回復現象は、サイクロフォスファミド、5-フルオロウラシルおよびブレオマイシンの投与後などで報告されている^{40)~43)}が、シスプラチンの投与後の回復現象に関しては、これまで文献的に報告がな

い。さらに本研究で低栄養培養液に毒性のない濃度のカフェインを添加することにより、シスプラチンによる潜在致死損傷からの回復現象が発現されなくなることも確認された。潜在致死損傷からの回復を阻害するものとして、放射線照射後の回復現象に対する 3-アミノベンザミド⁴⁴⁾とカフェイン¹¹⁾¹²⁾、放射線照射およびブレオマイシン投与後の回復現象に対するアクチノマイシン D⁴⁵⁾⁴⁶⁾、そのほか温熱療法、ヒドロキシウレア、ニコチン酸などが報告されている⁴⁶⁾。今回のシスプラチンによる損傷からの回復現象もカフェインによって阻害され、さらに IP のそれ以下にコロニーの形成率が低下したことから、カフェインはシスプラチンによる障害を全く修復させることなく固定化してしまうと考えられた。

シスプラチン投与後の細胞周期の進行動態は、用いた細胞やシスプラチンの濃度によりかなり違いがあるが、通常はシスプラチン投与後に S 期の遅延が生じ、つづいて G₂ ブロックが起きる。投与するシスプラチンが低濃度の場合には、細胞は 2~3 日のうちに細胞周期を再び回り出す。また高濃度シスプラチンを投与した場合は G₂ ブロックは永久的なものとなり細胞は死滅する^{47)~49)}。今回の実験においては 5.0 μg/ml と比較的高濃度のシスプラチンをヒト骨肉腫 OST 細胞に投与したが、シスプラチン投与後 6 時間後より S 期の遅延が見られはじめ、24 時間まで S 期の遅延が持続した。さらに 36 時間後では G₂ ブロックへと変化し、これは 72 時間後にはブロックが解除され細胞周期を再び回転するようになった。G₂ ブロックの出現について Sorenson ら⁵⁰⁾⁵¹⁾は、シスプラチンによって障害を受けた細胞において DNA 合成、RNA 合成、蛋白合成などを調べた結果、細胞が M 期に入るための遺伝子の転写が阻害され、メッセンジャー RNA の合成ができないために G₂ にて停止する。また、G₂ で停止した細胞は回復して細胞周期を再び回るものと、DNA 2 本鎖の切断 (double strand breaks) をきたしそのまま死滅するものとに分かれるとしている。1mM カフェインの存在下では、シスプラチン投与後 24 時間までに見られた S 期での蓄積は見られず、G₂/M 期の蓄積が顕著であった。また、24 時間以降に認められた G₂/M 期の蓄積はカフェインの存在により増強され、再び細胞周期を回り出すことはなかった。さらに、シスプラチン投与後の DNA 合成量は 24 時間までは抑制されるが、カフェインの存在下では抑制は軽度であった。すなわちカフェインはシスプラチンによって抑制された DNA 合成を促進させていたことになる。また、シスプラチン投与後に DNA に結合したプラチナ量は、24 時間までに速やかに減少してほぼ一定となる。この時カフェインを投与していても DNA 結合プラチナ量には変化が見られなかったことから、OST 細胞におけるプラチナの除去修復にカフェインは影響しないことがわかった。先の細胞周期上の変化とあわせて考えると、シスプラチンによって損傷を受けた細胞は S 期でまず停止し、ある程度損傷を除去修復して DNA 合成を行なうが、再び G₂/M 期でブロックが起る。ここで不完全な新生 DNA は、穴埋め現象¹⁸⁾などの複製後修復を受け有糸分裂に必要な蛋白合成を行ない、細胞周期を再び動くものと、修復が完全に行われず DNA の 2 本鎖切断を来たし、死滅していくものとに分かれると考えられる。カフェイン存在下で細胞は、S 期において損傷を有する DNA を鋳型として DNA 合成を行ない G₂ 期に到達する。しかしながら、この G₂ 期で停止している細胞の DNA では、損傷が固定化されているため修復されることなく細胞は死滅するもの

と考えられる。土屋²⁸⁾は低い濃度のシスプラチンを投与し、カフェインを投与して相乗効果を見たが、 G_2/M 期のブロックのみが観察され、カフェインはこの G_2/M 期のブロックを解除することでDNAの複製後修復を阻害して作用を発揮すると述べている。本研究では骨肉腫細胞に比較的高濃度のシスプラチンを投与したところ、S期細胞の蓄積が観察された。カフェイン添加によって細胞はS期から G_2/M 期へと進行し、かつコロニー形成率が著しく低下する結果を得た。すなわち、 G_2/M 期のブロックを解除するよりも、細胞のS期でのブロックを解除してDNA合成を行なわせ、損傷をDNA上に固定化させるほうがその相乗効果は大きく、 G_2/M 期に進んだ細胞はもはや細胞周期を回転できず細胞死に至ると考えられる。

本研究では細胞致死効果に関するシスプラチンとカフェインの相乗効果について、臨床条件に近似した実験系を用いて明らかにした。しかしながら、シスプラチンを投与されDNA合成の低下した細胞にカフェインを投与するとDNA合成量が増加する機構とは何か、カフェイン投与によってDNA損傷が固定化され、潜在致死損傷の回復が阻害されると考察したが、DNA損傷の固定化の本態は何か、などについて今後分子生物学的に解明する必要があると考える。

結 論

細胞過密状態に培養したヒト骨肉腫培養細胞におけるシスプラチン投与後のDNA損傷後の回復現象と、これに対するカフェインの抑制作用およびその作用機序について、種々の方法により検討を加えた結果、以下の結論を得た。

1. 細胞過密状態に培養したヒト骨肉腫培養細胞において、シスプラチン投与後低栄養状態に保つことにより生存率の上昇が見られる。また、これはカフェインの投与により阻害されるだけでなく、著明な相乗的コロニー形成抑制効果が認められる。
2. シスプラチン投与後の細胞周期の変化をフローサイトメトリーにて調べると、シスプラチン単独では24時間経過まではS期の蓄積が見られ、その後 G_2/M 期の蓄積に変わり、時間の経過とともに G_2/M 期の蓄積は解除される。しかし、カフェインの投与下ではS期の蓄積は解除され、 G_2/M 期の蓄積に代わる。これは時間の経過によっても解除されない。
3. シスプラチン投与後の総DNA合成量は24時間まで抑制を受けるが、カフェインの投与下では抑制を受けず相対的に促進される。また、オートラジオグラフィで示される個々の細胞のDNA合成量もシスプラチン投与後抑制されるが、カフェインの添加により相対的に促進される。
4. シスプラチン投与後のDNA結合プラチナの修復動態を調べると、24時間までは速やかに除去修復が起こるが、カフェインの投与下でも同様に修復が起こり除去修復に対するカフェインの作用はないと考える。
5. カフェインはシスプラチン投与によって障害を受けたDNAが修復のためにS期で遅延するのを抑制し、相対的にDNA合成を促進させることによって障害を大きくし細胞を死滅させると推察する。

謝 辞

稿を終るに臨み、御指導、御校閲を賜った恩師富田勝郎教授に深甚なる謝意を表します。また終始御指導御教授を戴いた土屋弘行講師に心

から感謝いたします。本研究の遂行に際し、多大の御教示と御援助を戴いた薬学部放射薬品化学 二階堂修教授、並びに終始御協力を戴いた整形外科腫瘍班の先生方、薬学部放射薬品化学教室の諸先生方に感謝の意を表します。

なお、本論文の要旨の一部は、第6回日本整形外科学会基礎学術集会、および第50回日本癌学会総会において発表した。

文 献

- 1) Kashdan, B. J., Sullivan, K. L., Lackman, R. D., Shapiro, M. J., Bonn, J., Weiss, A. J. & Gardiner, G. A.: Extremity osteosarcomas: Intraarterial chemotherapy and limb-sparing resection with 2-year follow-up. *Radiology*, **96**, 95-99 (1990).
- 2) Benjamin, R. S., Chawla, S. P., Carrasco, C. H., Raymond, A. K., Murray, J. A., Armen, T. O., Wallace, S., Ayala, A. G., Papadopoulos, N. E., Plager, M., Romsdahl, M. M. & Martin, R. G.: Primary chemotherapy for osteosarcoma and intra-arterial cisplatin. *Cancer Bull.*, **42**, 314-317 (1990).
- 3) Epelman, S., Estrada, J., Jaffe, N. & Bianchi, A.: Pediatric osteosarcoma. Successful retreatment of relapsed primary tumor and soft tissue recurrence with intraarterial cis-diamminedichloroplatin- II . *Cancer*, **66**, 801-805 (1990).
- 4) Hudson, M., Jaffe, M., Jaffe, N., Ayala, A., Raymond, K., Carrasco, H., Wallace, S., Murray, J. & Robertson, R.: Pediatric osteosarcoma: Therapeutic strategies, results, and prognostic factors derived from a 10-year experience. *J. Clin. Oncol.*, **8**, 1988-1997 (1990).
- 5) Petrilli, A. S., Gentil, F. C., Epelman, S., Lopes, L. F., Bianchi, A., Lopes, A., Figueiredo, M. T. A., Marques, E., Bellis, N., Consentino, E., Prospero, D., Camargo, O. P., Oliveira, N. R., Franco, E. & Jaffe, N.: Increased survival, limb preservation, and prognostic factors for osteosarcoma. *Cancer*, **68**, 733-737 (1991).
- 6) 松本誠一, 川口智義: 骨肉腫・軟部肉腫, 化学療法の領域, **6**, 996-1000 (1990).
- 7) 西条長宏, 藤田次郎: cisplatin 療法. 癌化学療法の進歩 (山村雄一, 杉村 隆編), 図説臨床「癌」シリーズ No 1, 58-68 頁, メジカルビュー社, 東京, 1986.
- 8) Zwelling, L. A. & Kohn, K. W.: Mechanism of action of cis-dichlorodiammineplatinum (II). *Cancer Treat. Rep.*, **63**, 1439-1444 (1979).
- 9) Weichselbaum, R., Little, J. B. & Nobe, J.: Response of osteosarcoma in vitro to irradiation: Evidence for unusual cellular repair activity. *Int. J. Radiat. Biol.*, **31**, 295-299 (1977).
- 10) Thraves, P. J., Mossman, K. L., Frazier, D. T. & Dritschilo, A.: Inhibition of potentially lethal radiation damage repair in normal and neoplastic human cells by 3-aminobenzamide: an inhibitor of poly (ADP-ribosylation). *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **12**, 1541-1545 (1986).
- 11) Beetham, K. & Tolmach, L. J.: The action of caffeine on X-irradiated Hela cells. VIII. Recovery from potentially lethal damage. *Radiat. Res.*, **107**, 272-285 (1986).
- 12) Kubo, K., Koiwai, S. & Morita, K.: The effect of

- caffeine on X-ray repair of radioresistant HeLa cells. *J. Radiat. Res.*, **26**, 361-371 (1985).
- 13) **Hansson, K., Kihlman, B. A., Tanzarella, C. & Palitti, F.**: Influence of caffeine and 3-aminobenzamide in G₂ on the frequency of chromosomal aberrations induced by thiotepa, mitomycin C and N-methyl-N-nitro-N'-nitrosoguanidine in human lymphocytes. *Mutat. Res.*, **126**, 251-258 (1984).
- 14) **Lau, C. C. & Pardee, A. B.**: Mechanism by which caffeine potentiates lethality of nitrogen mustard. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **79**, 2942-2946 (1982).
- 15) **Roberts, J. J. & Kotsaki-Hovatsi, V. P.**: Potentiation of sulphur mustard or cisplatin-induced toxicity by caffeine in Chinese hamster cells correlates with formation of DNA double-strand breaks during replication on a damaged template. *Mutat. Res.*, **165**, 207-220 (1986).
- 16) **Roberts, J. J., Sturrock, J. E. & Ward, K. N.**: The enhancement by caffeine of alkylation-induced cell death, mutations and chromosomal aberrations in Chinese hamster cell, as a result of inhibition of post-replication DNA repair. *Mutat. Res.*, **26**, 129-143 (1974).
- 17) **Van Den Berg, H. W. & Roberts, J. J.**: Inhibition by caffeine of post-replication repair in Chinese hamster cells treated with cis platinum (II) diaminedichloride: The extent of platinum binding to template DNA in relation to the size of low molecular weight nascent DNA. *Chem. Biol. Interact.*, **12**, 375-390 (1976).
- 18) **Van Den Berg, H. W. & Roberts, J. J.**: Post-replication repair of DNA in Chinese hamster cells of treated with cis platinum (II) diamine dichloride. Enhancement of toxicity and chromosome damage by caffeine. *Mutat. Res.*, **33**, 279-284 (1975).
- 19) **山崎安郎**: ヒト骨肉腫由来培養細胞株の樹立とその形態学的観察. *十全医会誌*, **71**, 147-162 (1965).
- 20) **Mizuno, T., Matsunaga, T., Ihara, M. & Nikaido, O.**: Establishment of a monoclonal antibody recognizing cyclobutane-type thymine dimers in DNA: a comparative study with 64M-1 antibody specific for (6-4) photoproducts. *Mutat. Res., DNA Repair*, **254**, 175-184 (1991).
- 21) **Burton, K.**: A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochemistry*, **62**, 315-323 (1956).
- 22) **Rosenberg, B., Camp, L. V. & Krigas, T.**: Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature*, **205**, 698-699 (1965).
- 23) **Curt, G. A., Clendeninn, N. J. & Chabner, B. A.**: Drug resistance in cancer. *Cancer Treat. Res.*, **68**, 87-99 (1984).
- 24) **Jennerwein, M. M., Eastman, A. & Khokhar, A. R.**: The role of DNA repair in resistance of L1210 cells to isomeric 1, 2-diamino-cyclohexaneplatinum complexes and ultraviolet irradiation. *Mutat. Res.*, **254**, 89-96 (1991).
- 25) **Gibbons, G. R., Page, J. D., Mauldin, S. K., Husain, I. & Chaney, S. G.**: Role of carrier ligand in platinum resistance in L1210 cells. *Cancer Res.*, **50**, 6497-6501 (1990).
- 26) **Eastman, A. & Schulte, N.**: Enhanced DNA repair as a mechanism of resistance to cis-diamminedichloroplatinum (II). *Biochemistry*, **27**, 4730-4734 (1988).
- 27) **Masuda, H., Ozols, R. F., Lai, G., Fojo, A., Rothenberg, M. & Hamilton, T. C.**: Increased DNA repair as a mechanism of acquired resistance to cis-diamminedichloroplatinum (II) in human ovarian cancer cell lines. *Cancer Res.*, **48**, 5713-5716 (1988).
- 28) **Phillips, R. A. & Tolmach, L. J.**: Repair of potentially lethal damage in X-irradiated HeLa cells. *Radiat. Res.*, **29**, 413-432 (1966).
- 29) **Hahn, G. M. & Little, J. B.**: Plateau-phase cultures of mammalian cells: An in vitro model for human cancer. *Curr. Top. Radiat. Res. Q.*, **8**, 39-83 (1972).
- 30) **Barranco, S. C., Novak, J. K. & Humphrey, R. M.**: Studies on recovery from chemically induced damage in mammalian cells. *Cancer Res.*, **35**, 1194-1204 (1975).
- 31) **Holden, S. A., Teicher, B. A., Boeheim, K., Weichselbaum, R. R. & Ervin, T. J.**: Platinum complexes inhibit repair of potentially lethal damage following bleomycin treatment. *Br. J. Cancer*, **55**, 245-248 (1987).
- 32) **Barranco, S. C., Haenelt, B. R. & Bolton, W. E.**: Inhibition of recovery from bleomycin-induced potentially lethal damage. *J. Natl. Cancer Inst.*, **59**, 1685-1689 (1977).
- 33) **Iliakis, G.**: Evidence for induction and repair of potentially lethal damage in plateau-phase V79 cells after exposure to adriamycin. *Br. J. Cancer*, **55**, 381-384 (1987).
- 34) **Barnes, M. E., Dethlefsen, L. A. & Biaglow, J. E.**: The effect of pH on potentially lethal damage recovery in A549 cells. *Radiat. Res.*, **108**, 80-90 (1986).
- 35) **Keyse, S. M. & Tyrrell, R. M.**: Rapidly occurring DNA excision repair events determine the biological expression of u. v.-induced damage in human cells. *Carcinogenesis*, **8**, 1251-1256 (1987).
- 36) **Timson, J.**: Caffeine. *Mutat. Res.*, **47**, 1-52 (1977).
- 37) **Rauth, A. M.**: Evidence for dark-reactivation of ultraviolet light damage in mouse L cells. *Radiat. Res.*, **31**, 121-138 (1967).
- 38) **Waldren, C. A. & Rasko, I.**: Caffeine enhancement of X-ray killing cultured human and rodent cells. *Radiat. Res.*, **73**, 95-110 (1978).
- 39) **土屋弘行**: カフェインによる制癌剤の効果増強に関する研究. *十全医会誌*, **97**, 543-556 (1988).
- 40) **Hahn, G. M., Ray, G. R., Gordon, L. F. & Kallman, R. F.**: Response of solid tumor cells exposed to chemotherapeutic agents in vivo: cell survival after 2- and 24-hour exposure. *J. Natl. Cancer Inst.*, **50**, 529-533 (1973).
- 41) **Takabe, Y., Watanabe, M., Miyamoto, T. & Terasima, T.**: Demonstration of repair of potentially lethal damage in plateau phase cells of Ehrlich ascites tumor after exposure to bleomycin. *Gann*, **65**, 559-560 (1974).
- 42) **Chafouleas, J. G., Bolton, W. E. & Means, A. R.**: Potentiation of bleomycin lethality by anticalmodulin drugs: A role for calmodulin in DNA repair. *Science*, **224**, 1346-1348

(1984).

- 43) 錦織 優: Bリンパ腫細胞株におけるブレオマイシンの致死障害からの回復に対するアクチノマイシンDの阻止効果. *J. Jpn. Soc. Cancer Ther.*, 21, 736-743 (1986).
- 44) Kumar, A., Kiefer, J., Schneider, E. & Crompton, N. E. A.: Enhanced cell killing, inhibition of recovery from potentially lethal damage and increased mutation frequency by 3-aminobenzamide in Chinese hamster V79 cells exposed to X-rays. *Int. J. Radiat. Biol.*, 47, 103-112 (1985).
- 45) Ziegler, W., Birkenfeld, P. & Trott, K. R.: The effect of combined treatment of HeLa cells with actinomycin D and radiation upon survival and recovery from radiation damage. *Radiother. Oncol.*, 10, 141-148 (1987).
- 46) Nakatsugawa, S., Kada, T., Nikaido, O., Tanaka, Y. & Sugahara, T.: PLDR inhibitors: Their biological and clinical implication. *Br. J. Cancer*, 49, 43-47 (1984).
- 47) 井筒俊彦, 平間隆之, 松田壮正, 善積 昇, 利部輝雄, 西谷 巖: 培養システムよりみた頸癌 DNA 合成細胞の CDDP 効果の検討, 癌と化療, 16, 1834-1841 (1989).
- 48) Wennerberg, J., Biorklund, P. A., Killander, D., Langstrom, E. & Trope, C.: Cell cycle perturbations in heterotransplanted squamous-cell carcinoma of the head and neck after mitomycin C and cisplatin treatment. *Int. J. Cancer*, 33, 213-222 (1984).
- 49) Sorenson, C. M. & Eastman, A.: Mechanism of cisdiaminedichloroplatinum (II)-induced cytotoxicity: Role of G₂ arrest and DNA double-strand breaks. *Cancer res.*, 48, 4484-4488 (1988).
- 50) Sorenson, C. M. & Eastman, A.: Influence of cisdiaminedichloroplatinum (II) on DNA synthesis and cell cycle progression in excision repair proficient and deficient Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res.*, 48, 6703-6707 (1988).
- 51) Sorenson, C. M., Barry, M. A. & Eastman, A.: Analysis of events associated with cell cycle arrest at G₂ phase and cell death induced by cisplatin. *Articles*, 82, 749-755 (1990).

Inhibition of Potentially Lethal Damage Repair after Cisplatin Treatment with Caffeine in Human Osteosarcoma Cells Hidetoshi Yasutake, Department of Orthopaedic Surgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—*J. J. Cancer Med Soc.*, 101, 504—513 (1992)

Key words caffeine, cisplatin, DNA repair, human osteosarcoma

Abstract

The present study was carried out to detect recovery from potentially lethal DNA damage after cisplatin treatment on human osteosarcoma cells, and to examine how caffeine is detrimental to the recovery phenomenon. Osteosarcoma cells were cultured up to confluency and then treated with cisplatin, followed by incubation in a low nutrient medium. The cells were seeded for colony formation. The number of colonies increased in an incubation time-dependent manner in comparison with those in immediate plating. When a nontoxic concentration of caffeine was added to the low nutrient medium, the number of colonies greatly decreased. The author examined the effect of caffeine on cell cycle progression. After cisplatin treatment the cells were accumulated in S phase for up to 24 hr and consequently accumulated in G₂/M phase. The accumulation of the cells in G₂/M phase gradually ceased by incubating the cells for 72 hr. However, with the addition of caffeine, neither the initial accumulations in S phase nor the subsequent release of cells from G₂/M block was observed. The thymidine uptake was inhibited up to 24 hr by approximately 25% with cisplatin treatment, while caffeine reduced this inhibition of uptake significantly. It was shown autoradiographically that DNA synthesis in each cell was inhibited by cisplatin and that caffeine reduced the inhibition. The contents of DNA-bound platinum decreased with increasing incubation time after cisplatin treatment and caffeine did not influence the contents of DNA-bound platinum. These results indicate that caffeine did not directly influence the DNA excision repair process in osteosarcoma cells. The author detected recovery from potentially lethal damage caused by cisplatin on human osteosarcoma cells incubated in a low nutrient medium. Caffeine inhibited the recovery from cisplatin damage and enhanced the cytotoxicity of cisplatin. It was concluded that DNA synthesis in S phase was inhibited by cisplatin but that caffeine reduced the inhibition and promoted DNA synthesis on unrepaired template, so that cells were not able to recover and died.