

## ラット腹水肝癌AH66細胞におけるピンブラスチンの膜透過機序の検討

著者	涌沢 伸哉, 柳岡 利一, 宮本 謙一, 越浦 良三
雑誌名	薬学雑誌
巻	104
号	12
ページ	1301-1305
発行年	1984-12-25
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/7050">http://hdl.handle.net/2297/7050</a>

薬 学 雑 誌  
YAKUGAKU ZASSHI  
104 (12) 1301-1305 (1984)

## ラット腹水肝癌 AH66 細胞におけるビンブラスチンの膜透過機序の検討

涌沢伸哉,\* 柳岡利一, 宮本謙一, 越浦良三  
北陸大学薬学部

### Studies on Mechanisms of Vinblastine Membrane Transport in Rat Ascites Hepatoma AH66 Cells

SHINYA WAKUSAWA,\* TOSHIKAZU YANAOKA, KENICHI MIYAMOTO  
and RYOZO KOSHIURA

Department of Pharmacology, Hokuriku University School of Pharmacy,  
Ho-3 Kanagawa-machi, Kanazawa, 920-11, Japan

(Received August 13, 1984)

The influence of  $\text{Ca}^{2+}$  antagonists and metabolic inhibitors on the membrane transport of vinblastine (VBL) in rat ascites hepatoma AH66 cells was investigated. Such  $\text{Ca}^{2+}$  antagonists as ruthenium red (RR) and lanthanum chloride (La) decreased the uptake of VBL but did not influence the intracellular retention of VBL. In contrast, verapamil markedly increased the uptake and decreased the efflux of VBL. Since AH66 cells are not excitable cells, it was considered that verapamil which is a  $\text{Ca}^{2+}$  channel antagonist showed a different action from other  $\text{Ca}^{2+}$  antagonists. Iodoacetic acid increased the uptake of VBL and suppressed the extrusion of VBL but dinitrophenol and ouabain did not influence the intracellular content of VBL in the glucose rich medium. On the other hand, RR and La specifically inhibited the activity of  $(\text{Ca}^{2+}-\text{Mg}^{2+})\text{ATPase}$ . Ouabain also specifically inhibited the activity of  $(\text{Na}^{+}-\text{K}^{+})\text{ATPase}$ . Iodoacetic acid suppressed the activities of ATPase except  $(\text{Na}^{+}-\text{K}^{+})\text{ATPase}$ .

Therefore, in the influx of VBL, the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  on the plasma membrane or in the cell seemed to be necessary. Moreover, it was suggested that VBL was not extruded by neither  $(\text{Na}^{+}-\text{K}^{+})\text{ATPase}$  nor  $(\text{Ca}^{2+}-\text{Mg}^{2+})\text{ATPase}$  in the plasma membrane and a different active transport system might be concerned with the efflux of VBL.

**Keywords**—vinblastine;  $\text{Ca}^{2+}$  antagonist; metabolic inhibitor; membrane transport; ATPase; AH66 cell

癌細胞の制癌剤耐性機序に関する報告は多い。<sup>1)</sup> また近年, vincristine (VCR) 耐性の程度は細胞内流入速度と流出速度の差によって説明できるとする報告<sup>2)</sup> がみられる。著者らもまた, vinblastine (VBL) 低感受性のラット腹水肝癌細胞内の VBL 濃度は, 感受性細胞に比して極めて低いこと, 低感受性の細胞程細胞膜 adenosine triphosphatase (ATPase) 活性が高く, Rauwolfia alkaloids は, これらの酵素活性を抑制することにより VBL の細胞外流出を阻止し細胞内 VBL 濃度を上昇させ, 細胞の VBL 感受性を高めることを報告してきた。<sup>3)</sup> 一方, Tsuruo ら<sup>4)</sup> は, 各種の  $\text{Ca}^{2+}$  拮抗薬あるいはカルモジュリン阻害剤が VCR 耐性細胞からの VCR 流出を抑制することにより VCR 感受性を高めることを報告している。しかしながら, Vinca alkaloids の細胞内流入機構及び流出機構についてはなお検討の必要性がある。

そこで今回は, ラット腹水肝癌細胞のうち VBL に対して最も感受性の低い AH66 細胞を用い, 各種の  $\text{Ca}^{2+}$  拮抗薬及びエネルギー代謝阻害剤の VBL の細胞内流入及び細胞外流出に及ぼす影響を検討した。

## 実 験 の 部

### 実験材料

**癌細胞** ラット腹水肝癌 AH66 細胞をドンリュース 6 週齢雌性ラット (静岡実験動物農業協同組合) の腹腔内に 1 週間毎に移植して継代維持した。実験には, 細胞移植後 1 週間の細胞を用いた。

**使用薬物** 硫酸ビンプラスチン (VBL: 塩野義製薬),  $^3\text{H}$ -VBL (9.9 Ci/mmol, Amersham), レセルピン (Sigma), ベラパミル (エーザイ), 塩化ランタン (La), ルテニウムレッド (RR), 2,4-ジニトロフェノール (DNP), ヨード酢酸 (和光純薬), ウワバイン (Merck), adenosine triphosphate disodium salt (ATP·2Na: 半井化学), その他の試薬は和光純薬特級品を用いた。なお, レセルピンは水に不溶のため, dimethylsulfoxide (DMSO) に溶解し, 実験には, 最終 DMSO 濃度が 0.5% 以下となるように加え, 0.5% DMSO を対照としておいた。

#### 実験方法

**細胞内 VBL 取り込み量の測定** Hepes 緩衝液 (pH 7.4) (1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 135 mM NaCl, 5.9 mM KCl, 1.2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5.8 mM *N*-2-ヒドロキシエチルピペラジン-*N'*-2-エタンスルホン酸, 条件によっては 1 mM  $\text{CaCl}_2$  を除く) あるいはウシ胎仔血清 (京都微研) 10% 含有 Eagle's minimum essential medium (MEM: 日本製薬) (pH 7.4) 中に癌細胞 ( $5 \times 10^6$  cells/ml) を懸濁させ,  $37^\circ\text{C}$  にて 10 分間前培養後, 薬物存在下あるいは非存在下  $0.1 \mu\text{Ci } ^3\text{H}$ -VBL と非放射性 VBL  $1 \times 10^{-7} \text{ M}$  を加え,  $37^\circ\text{C}$  にて培養した。培養後, 細胞浮遊液 1 ml を 1 検体として冷リン酸緩衝液 (pH 7.4) にて洗浄し, Protosol® (New England Nuclear) 1 ml にて溶解し, トルエンシンチレーター (polyphenylene oxide 4 g, 1,4-bis-2(5-phenyloxazolyl)benzene 0.1 g, トルエン 1 l) 中放射活性を液体シンチレーションカウンター (Beckman LS-230) により測定した。

**細胞内 VBL 残存量の測定** 前述のごとく  $^3\text{H}$ -VBL を 30 分間取り込ませ, 細胞を洗浄後, それぞれの溶液中薬物存在下あるいは非存在下  $37^\circ\text{C}$  にて培養後, 放射活性を測定した。

**細胞膜調製法** 前報<sup>3b)</sup>の記述に従い, ( $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ )ATPase,  $\text{Mg}^{2+}$ ATPase, ( $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ )ATPase,  $\text{Ca}^{2+}$ ATPase 活性を測定した。

**蛋白量の測定** ウシ血清アルブミンを対照として Lowry 法<sup>3c)</sup>に従い定量した。

### 結果及び考察

#### 1. $\text{Ca}^{2+}$ 拮抗薬の VBL 細胞内取り込み及び細胞外流出に及ぼす影響

ラット腹水肝癌細胞での VBL 細胞内流入は極めて早く, 細胞内 VBL 濃度が直線的に増加する初期流入期はわずか 15 秒であり, 以後細胞外流出機構が働き出すとみられ, 流入速度は徐々に遅くなり, 30 分後には細胞内濃度は plateau となる。<sup>3a)</sup> したがって流入期のみを分離して観察するのは極めて困難である。本実験では, VBL の細胞内取り込み量と残存量に及ぼす各種の薬物の影響を検討することにより VBL の細胞膜透過機序を考察したい。

Fig. 1 は,  $\text{Ca}^{2+}$  非存在下 (A),  $\text{Ca}^{2+}$  1 mM 存在下 (B) 30 分間の AH66 細胞内 VBL 取り込み量に対する La,

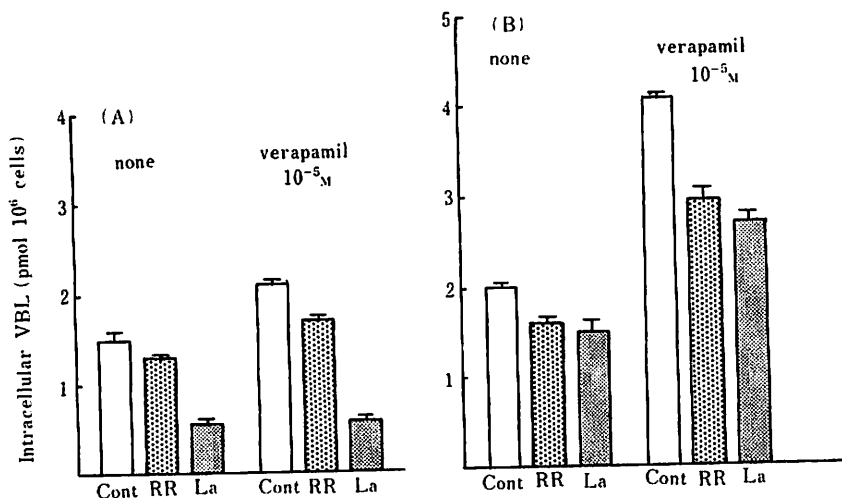


Fig. 1. Effect of Calcium Antagonists on the Intracellular Uptake of VBL in the Absence (A) and Presence (B) of  $\text{Ca}^{2+}$  in AH66 Cells

The cells were incubated with  $1.1 \times 10^{-7} \text{ M}$  of VBL for 30 min in the absence or presence of  $1 \times 10^{-4} \text{ M}$  of ruthenium red (RR),  $1 \times 10^{-3} \text{ M}$  of lanthanum chloride (La) and/or  $1 \times 10^{-5} \text{ M}$  of verapamil. Each bar represents the mean  $\pm$  S.E. of triplicate determinations.

RR, ベラパミルの影響を示したものである。VBL の取り込みは、 $\text{Ca}^{2+}$  の添加により若干促進された。また、ベラパミルは  $\text{Ca}^{2+}$  の存在にかかわらず VBL の細胞内取り込み量を増加させ、その程度は  $\text{Ca}^{2+}$  存在下の方が大きかった。一方、La や RR は VBL の細胞内取り込みを明らかに抑制した。特に、 $\text{Ca}^{2+}$  非存在下の La の作用は著しかった。次いで、La、RR の VBL 細胞外流出に及ぼす影響を検討した結果が Fig. 2 であるが、いずれも VBL の細胞外流出には何ら影響を及ぼすことはなかった。

La や RR は、細胞膜に結合し、あるいは膜上で  $\text{Ca}^{2+}$  の結合を妨げることにより、 $\text{Ca}^{2+}$  の細胞内流入を阻害することが知られている。<sup>6)</sup> 本実験において、細胞外液中への  $\text{Ca}^{2+}$  の添加により VBL の細胞内取り込み量が増加し、これらの  $\text{Ca}^{2+}$  拮抗薬で取り込みが抑制されたことより、VBL の細胞内流入には  $\text{Ca}^{2+}$  が何らかの役割を果たしていることが伺える。一方、La や RR は、 $\text{Ca}^{2+}$  の細胞外流出抑制作用をも有するが、これは細胞膜 ( $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ ) ATPase 活性を特異的に抑制することによるとされている。<sup>7)</sup>

しかしながら、VBL の細胞外流出は、これらの薬物では何ら影響を受けないことより、VBL の細胞外流出については別の機序を考えなければならない。ベラパミルは、興奮膜の  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル阻害剤であるが、本実験で用いた AH66 細胞のような非興奮膜を有する細胞ではその作用は他の  $\text{Ca}^{2+}$  拮抗薬と異なり、VBL の細胞外流出を阻害することにより細胞内 VBL 蓄積作用を示した。Tsuruo ら<sup>4)</sup> も VCR 耐性マウス白血病細胞 P388 を用いた実験でベラパミルの細胞内 VCR 蓄積作用を報告しており、その機作としては、細胞内カルモジュリン関連酵素活性阻害に基づく VCR の細胞外流出抑制によるものとしている。

## 2. エネルギー代謝阻害剤の VBL 細胞内取り込み及び細胞外流出に及ぼす影響

Fig. 3 は、VBL の 30 分間の細胞内取り込み量 (A) と VBL 洗浄除去後 30 分間の細胞内残存 VBL 量 (B)

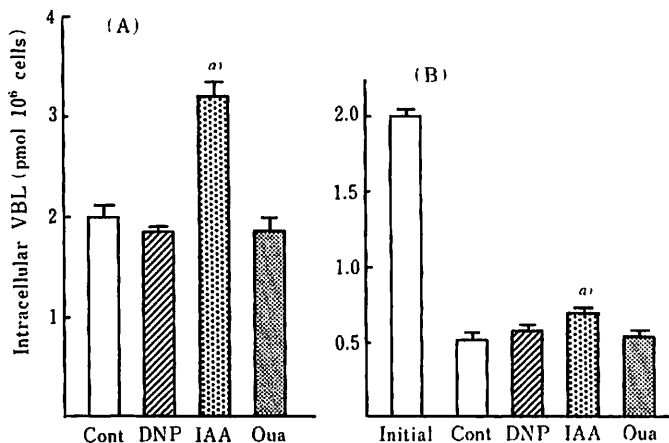


Fig. 3. Effect of Metabolic Inhibitors on the Intracellular Uptake (A) and Retention (B) of VBL in AH66 Cells

(A) The cells were incubated with  $1.1 \times 10^{-7}$  M of VBL for 30 min in the absence or presence of  $1 \times 10^{-4}$  M of dinitrophenol (DNP), iodoacetic acid (IAA) or ouabain (Oua). (B) The cells were loaded with  $1.1 \times 10^{-7}$  M of VBL for 30 min, washed and incubated with or without each inhibitor for 30 min. Each bar represents the mean  $\pm$  S.E. of triplicated determinations.

<sup>a)</sup>  $p < 0.05$  versus non-treated control.

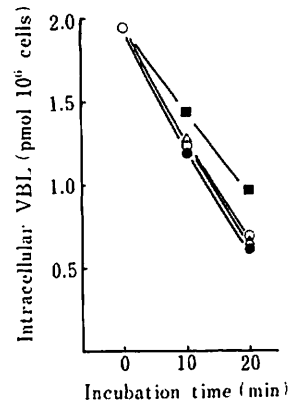


Fig. 2. Effect of Calcium Antagonists on the Efflux of VBL in AH66 Cells

The cells were loaded with  $1.1 \times 10^{-7}$  M of VBL for 30 min, washed out extracellular VBL and incubated in the absence (O) or presence of  $1 \times 10^{-4}$  M of ruthenium red ( $\Delta$ ),  $1 \times 10^{-3}$  M of lanthanum chloride ( $\bullet$ ) or  $1 \times 10^{-5}$  M of verapamil ( $\blacksquare$ ).

TABLE I. Effect of Metabolic Inhibitors and Calcium Antagonists on ATPase Activities of AH66 Cell Plasma Membrane

Agents	Concentration (mM)	(Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> )-ATPase	Mg <sup>2+</sup> -ATPase	Ca <sup>2+</sup> -ATPase	(Ca <sup>2+</sup> -Mg <sup>2+</sup> )-ATPase
		(% of control)			
Ouabain	0.1	51.2±0.1 <sup>a)</sup>	100.1±4.8	100.3±2.9	98.5±1.2
Iodoacetic acid	0.1	106.9±0.7	90.3±0.3 <sup>a)</sup>	92.4±7.1	92.4±2.3 <sup>a)</sup>
	1.0	94.0±1.7 <sup>a)</sup>	80.0±2.8 <sup>a)</sup>	72.1±3.0 <sup>a)</sup>	21.4±3.1 <sup>a)</sup>
LaCl <sub>3</sub>	1.0	95.7±5.7	102.0±0.1	95.5±1.2	0
Ruthenium red	0.1	83.6±1.5 <sup>a)</sup>	100.0±0.1	106.0±1.9	0

Control values for (Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>) ATPase, Mg<sup>2+</sup> ATPase, Ca<sup>2+</sup> ATPase and (Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>) ATPase were 12.20±0.59, 11.68±0.82, 15.98±2.44 and 1.61±0.44 μmol Pi/mg protein/h, respectively. Each value is the mean±S.E. of triplicate determinations.

a)  $p < 0.05$  versus control.

を示したものである。DNP やウワバインは VBL の細胞内取り込み、及び残存量には何ら影響を認めることはできなかったが、ヨード酢酸は約 2 倍に VBL の取り込み量を増加させるとともに、VBL の細胞外流出を抑制した。なお、本実験条件は、十分量のグルコースを含む培養液中のものであり、グルコース等のエネルギー源を除去した Heppes 液中では、DNP は、VBL の細胞外流出を抑制し、細胞内 VBL 量を増加させることは報告済みである。<sup>3a)</sup>

### 3. 細胞膜 ATPase 活性に及ぼす薬物の影響

ウワバイン、ヨード酢酸、La 及び RR の AH66 細胞膜の各 ATPase に対する作用を各酵素の対照に対する活性比 (%) で示したのが Table I である。ウワバインは (Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>) ATPase の特異的阻害剤としてよく知られているが、 $1 \times 10^{-4}$  M で (Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>) ATPase を 50% 程度に抑制し、他の酵素には何ら影響を及ぼさなかった。また、La や RR は、他研究者が赤血球膜等で報告しているように、<sup>7)</sup> (Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>) ATPase 活性をほぼ特異的に抑制した。VBL の細胞外流出抑制作用を示したヨード酢酸は、(Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>) ATPase を除くすべての ATPase 活性を抑制した。特に、(Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>) ATPase 活性抑制作用が強いようであった。

以上の結果より、AH66 細胞における VBL の細胞内流入には、Ca<sup>2+</sup> での促進が示唆され、La や RR でそれが抑制されることより、細胞膜上での Ca<sup>2+</sup> の結合による膜流動性の変化、あるいは、細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度の上昇が、VBL の細胞内流入に関与していることが示唆された。一方、La や RR は特異的に細胞膜 (Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>)-ATPase 活性を抑制するため、本酵素の関与も考えられるが、エネルギー産生抑制状態では細胞内 VBL 濃度が上昇すること、レセルピンの溶媒である DMSO が (Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>) ATPase を強く抑制するにもかかわらず、レセルピンは細胞内 VBL 濃度を高めること、<sup>3b)</sup> ヨード酢酸も同様に (Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>) ATPase 活性抑制作用を有するにもかかわらず VBL 取り込み量を増加させる等の知見よりエネルギー依存的な、強いては (Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>) ATPase の VBL 流入への関与は否定されることが考えられる。さらに、La や RR は VBL の細胞外流出には影響しないことより、細胞外流出への (Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>) ATPase の関与も否定される。また、(Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>) ATPase もウワバインが VBL 細胞外流出に影響しなかったことより除くことができる。一方、前報において Rauwolfia alkaloids<sup>8b, c)</sup> が、本実験においてもヨード酢酸が、VBL の細胞外流出を抑制するとともに、いずれも (Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>) ATPase 以外の ATPase 活性を抑制することを示した。さらに、著者らは、ラット腹水肝癌細胞のうち、VBL に低感受性の細胞程細胞膜 Mg<sup>2+</sup> ATPase 活性が高く、VBL の細胞内取り込み量が低く、細胞外汲み出し能が高いことを示している。<sup>8b)</sup> したがって、VBL の細胞外流出には、細胞膜 ATPase、中でも Mg<sup>2+</sup> ATPase が関与する可能性が示唆される。

### 引用文献

- 1) a) I. Hirono, *Nature* (London), 186, 1059 (1960); b) G. J. Golddenberg, C. L. Vanstone, L. G. Israels, D. Ilse, I. Bihler, *Cancer Res.*, 30, 2285 (1970); c) T. Skovsgaard, *ibid.*, 38, 4722 (1978); d) C. Peterson, A. Trouet, *ibid.*, 38, 4645 (1978); e) M. Inaba, H. Kobayashi, Y. Sakurai, R. Johnson, *ibid.*, 39, 2200 (1979).

- 1) R. A. Bender, W. D. Kornreich, I. Wodinsky, *Cancer Lett.*, **15**, 335 (1982).
- 1) a) S. Wakusawa, K. Miyamoto, R. Koshiura, *Jpn. J. Pharmacol.*, **36**, 187 (1984); b) 涌沢伸哉, 宮本謙一, 柳岡利一, 越浦良三, *薬誌*, **104**, 1288 (1984); c) 宮本謙一, 涌沢伸哉, 柳岡利一, 越浦良三, *薬誌*, **104**, 1295 (1984).
- 1) T. Tsuruo, H. Iida, S. Tsukagoshi, Y. Sakurai, *Cancer Res.*, **42**, 4730 (1982).
- 5) D. H. Lowry, N. J. Rosenbrough, A. L. Farr, R. J. Ranclall, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
- 5) C. L. Moore, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **42**, 298 (1971); C. J. Mayer, C. Van Breemen, R. Casteels, *Pflügers Arch.*, **337**, 333 (1972); A. Cittadini, A. Scarpa, B. Chance, *Biochim. Biophys. Acta*, **291**, 246 (1973).
- 7) E. L. Watson, F. F. Vincenzi, P. W. Davis, *Biochim. Biophys. Acta*, **249**, 606 (1971); E. E. Quist, B. D. Roufogalis, *FEBS Lett.*, **50**, 135 (1975); I. Sazász, B. Sarkadi, A. Schubert, G. Gárdes, *Biochim. Biophys. Acta*, **512**, 331 (1978).