

大腸癌培養細胞株の増殖に対するバフィロマイシンA _1の抑制効果

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/2297/9474

大腸癌培養細胞株の増殖に対するバフィロマイシンA₁の抑制効果

金沢大学医学部医学科外科学第二講座 (主任: 三輪晃一教授)

岩 田 啓 子

マクロライド系抗生物質であるバフィロマイシンA₁は液胞型プロトンポンプの特異的阻害剤で、種々の培養細胞の増殖をナノモルレベルで濃度依存性に抑制する。本研究では、バフィロマイシンA₁の大腸癌培養細胞に対する増殖抑制効果とその機序について、p53変異株である6種類の大腸癌培養細胞株を用いて検討した。MTTアッセイ法による増殖抑制の検討では、72時間培養でのIC₅₀値はいずれも5 nMから25 nMと極めて感受性が高かった。次に6種類の大腸癌培養細胞株の中でもバフィロマイシンA₁に対する感受性の高かったHT-29を用いて、アポトーシスの関与およびその経時的推移について検討した。細胞膜表面の微絨毛の減少およびブルブ形成、細胞膜表面へのホスファチジルセリン基の表出はバフィロマイシンA₁処理後24時間目から、細胞の縮小および核クロマチンの凝集や分断化は処理後48時間目から観察された。アポトーシス関連蛋白質の経時的推移では、バフィロマイシンA₁処理でp53蛋白質の発現は増強せず、また、p21^{Waf1}蛋白質の発現も終始誘導されなかった。アポトーシス抑制因子であるBcl-2, Bcl-XL蛋白質の発現程度には変化がみられず、アポトーシス促進因子であるBax蛋白質は発現しなかった。カスパーゼ蛋白質分解酵素ではカスパーゼ3, カスパーゼ9は処理後48時間目から活性体が観察されたが、カスパーゼ6, カスパーゼ7の活性体は認められなかった。カスパーゼ10蛋白質の発現もみられなかった。加えて、この一連のアポトーシスの誘導はイミダゾール投与によって抑制されなかった。これらの成績は、バフィロマイシンA₁処理によるヒト大腸癌培養細胞株HT-29でのアポトーシスは、p53蛋白質や細胞周期とは無関係で、カスパーゼ9およびカスパーゼ3を介したミトコンドリア依存性経路であることを示唆した。

Key words vacuolar type H⁺-ATPase, bafilomycin A₁, colorectal cancer cell, apoptosis, caspase

液胞型プロトンポンプ (vacuolar type H⁺-ATPase, V-ATPase) は、ミトコンドリアに存在するF-typeのプロトンポンプや胃の壁細胞に存在するP-typeのプロトンポンプに次ぐ第三のプロトンポンプ (V-type) として最近発見されたものである。正常細胞ではライソゾームやエンドゾームなどの細胞内膜系に存在することが知られており^{1)~3)}、また、このプロトンポンプが腫瘍を含むいくつかの癌細胞に過剰発現していることが報告されている⁴⁾⁵⁾。

Streptomyces griseus から分離されたマクロライド系抗生物質であるバフィロマイシンA₁ (bafilomycin A₁) は、液胞型プロトンポンプの特異的阻害剤で種々の培養細胞の増殖をナノモルレベルで濃度依存性に抑制する^{6)~9)}。しかも、正常細胞と癌細胞とではバフィロマイシンA₁に対する感受性に差があることが報告⁹⁾され、この感受性の差は癌治療の標的になりうると思われる。バフィロマイシンA₁の固形癌に対する抗腫瘍効果についての検討は、腫瘍での報告がみられるにすぎず¹⁰⁾、また、バフィロマイシンA₁の抗腫瘍効果はアポトーシスの関連が示唆されているものの^{11)~13)}、その詳細な機序については解明されてい

ない。そこで本研究では、固形癌の中でも肺癌と同様にp53遺伝子異常、抗癌剤への抵抗性を有し、アポトーシスに陥りにくいとされている6種類の大腸癌培養細胞株を用いて、バフィロマイシンA₁のアポトーシスを介した増殖抑制効果およびアポトーシス実行過程での形態学的変化やアポトーシス関連分子の関与について検討した。

対象および方法

I. ヒト大腸癌培養細胞株

分化度の異なる6種類の大腸癌培養細胞株 (HT-29, 高分化型腺癌; DLD-1, 中分化型腺癌; SW-480, 中分化型腺癌; SW-620, 中分化型腺癌; CaR-1, 低分化型腺癌; COLO-320DM, 未分化癌) を American Type Culture Collection (Rockville, USA) より購入して使用した。細胞は10%非働化牛胎児血清 (fetal bovine serum, Cell Culture Laboratories, Cleveland, USA) と0.3 g/lグルタミン (日本製薬, 東京), 10万単位/lペニシリン・ストレプトマイシン混合液 (Gibco, Grand Island, USA) を含むRPMI培地 (日本製薬) を用い、

平成12年1月19日受付, 平成12年3月8日受理

Abbreviations: DMSO, dimethyl sulfoxide; FITC, fluorescein isothiocyanate; IC₅₀, the concentration of bafilomycin A₁ required for 50% inhibition of cell viability; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; PI, propidium iodide; PS, phosphatidylserine

37°C, 5% CO₂の条件下で維持した。なお、これら6種類の細胞株は全てp53変異株で、なかでもHT-29は抗癌剤に対する感受性が低く、アポトーシス耐性株として知られている¹⁴⁾。

II. 使用薬剤

バフィロマイシンA₁は和光純薬工業株式会社(大阪)より購入した。バフィロマイシンA₁は、まずジメチルサルフォキシド(dimethyl sulfoxide, DMSO)(和光純薬工業株式会社)で溶解し、その後、滅菌蒸留水を用いて100 μMに調整し冷凍保存した。使用時にはDMSOの最終濃度が1%以下となるように細胞培養液で希釈した。

III. 大腸癌培養細胞株における液胞型プロトンポンプ蛋白の発現

ヒト大腸癌培養細胞における液胞型プロトンポンプ蛋白の細胞内局在を見るために、免疫細胞化学的染色をおこなった。実際には、各細胞株の細胞を1×10⁶個/mlに調整し、サイトスピンII(Shandon Southern Products Ltd., Cheshire, UK)を用いてスライドガラス上に細胞を散布し、95%エタノールで固定した。PBSにて洗浄後、内因性ペルオキシダーゼを阻害するために0.3%過酸化水素水(和光純薬工業株式会社)加メタノールに浸し、非特異的結合を抑制するために、室温で30分間正常ヒツジ血清(Dakopatts, Copenhagen, Denmark)と反応させた。そして、ヒト液胞型プロトンポンプの116 kDa subunitに対するモノクロナール抗体(OSW2)¹⁵⁾を0.3%ウシ血清アルブミン添加PBSにて1000倍希釈し、4°Cにて一晩反応させた。PBSにて洗浄後、ビオチン標識抗ウサギイムノグロブリン・ヤギ抗体(Dakopatts)と室温で2時間反応させ、さらにペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン(streptavidin)(Dakopatts)を加え室温下に30分反応させた。最後にジアミノベンジン-4塩酸(3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride)(Dakopatts)と反応させ、茶色に可染する免疫反応物質の有無で評価した。

IV. 大腸癌培養細胞株の増殖能に及ぼすバフィロマイシンA₁の影響

3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムプロマイド [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT] アッセイ法^{16,17)}により評価した。すなわち、5×10⁴個/mlに調整した細胞浮遊液200 μlを96穴マイクロプレート(岩城, 千葉)の各穴に加え、37°C, 5% CO₂の条件下で24時間培養した後、培養液を各濃度に調整したバフィロマイシンA₁を含む培養液に交換し、さらに37°C, 5% CO₂の条件下で24, 48, 72時間、バフィロマイシンA₁と接触させた。接触終了後、0.1 M PBSで洗浄し、MTTアッセイ反応液(4mg/ml)(Sigma, St. Louis, USA) 10 μl, コハク酸ナトリウム 10 μlを各穴に加え3時間反応させた。反応終了後、各穴にDMSO 150 μlを加え、540 nmでの吸光度OD₅₄₀を測定した。OD₅₄₀値は自動吸光計(EAR 340 AT, SLT, Vienna, Austria)で測定した。測定値は3回の実験の平均および標準偏差をとった。バフィロマイシンA₁非処理群に対するバフィロマイシンA₁処理群の吸光度の割合、すなわち対照群に対する処理群の生細胞の割合を求め、これを腫瘍細胞生存率(% of control)とした。また、腫瘍細胞生存率より50%増殖阻害濃度(concentration of bafilomycin A₁ required for 50% inhibition of cell viability, IC₅₀)値を求め、薬剤感受性の指標とした。

また、正常細胞で液胞型プロトンポンプ蛋白を多く発現している肝細胞を用いて、その細胞活性度(cell viability)に及ぼす

バフィロマイシンA₁の影響についても検索した。なお正常肝細胞は、胆嚢癌手術の際に、合併切除された肝床部の非癌部組織を患者の同意を得て使用した。

V. バフィロマイシンA₁による大腸癌培養細胞株のアポトーシス誘導

バフィロマイシンA₁の増殖抑制効果がアポトーシスに起因するか否かについて、HT-29細胞を用いて検討した。

1. 細胞膜表面へのフォスファチジルセリン(phosphatidylserine)基の表出からみたアポトーシス

アポトーシスの初期には、細胞膜表面にフォスファチジルセリン(phosphatidylserine, PS)基が表出し、このPS基とアネキシンV(annexin V)が特異的に結合する¹⁸⁻²⁰⁾。そこで、バフィロマイシンA₁処理後のPS基表出の経時的推移をフルオレゼン・イソチオシアン酸(fluorescein isothiocyanate, FITC)標識アネキシンVを用いてフローサイトメーターで評価した²¹⁻²⁴⁾。この際、細胞膜透過性の亢進の有無を同時に評価する目的でヨウ化プロピジウム(propidium iodide, PI)染色もおこなった。具体的には、培養細胞を24時間シャーレ内で培養し接着させた後、各濃度に調整したバフィロマイシンA₁を含む培養液に24, 48, 72, 96時間接触させた。接触後、培養液中の浮遊細胞を含めて全細胞を回収し、1×10⁶個/mlに調整した。調整細胞浮遊液200 μlにアネキシンV結合解析用ヘブス緩衝液(20 mM HEPES, 140 mM 塩化ナトリウム, 5 mM 塩化カリウム, 1 mM 塩化マグネシウム, 2.5 mM 塩化カルシウム, 1.2 mM 燐酸二水素カリウム, 0.5%ウシ血清アルブミン) 800 μlを加え、FITC標識アネキシンV(Bender Medsystem, Vienna, Austria)を最終希釈1:1000で添加した。室温で遮光し10分間反応させ、100 μg/ml PI 2 μlを加えた。反応終了後、フローサイトメーター(Cytron Absolute, Ortho Diagnostic Systems, 東京)でPS表出およびPI染色の割合を解析した。評価は布上の報告²⁵⁾に従い、PS表出陰性かつPI染色陰性群、PS表出陽性かつPI染色陰性群、PS表出陽性かつPI染色陽性群、PS表出陰性かつPI染色陽性群の4群に分け、PS表出陰性かつPI染色陰性群を生細胞、PS表出陽性かつPI染色陰性群を早期アポトーシス細胞、PS表出陽性かつPI染色陽性群を晩期アポトーシス細胞とし、PS表出陽性の占める割合を算出した。なお、DMSOの最終濃度が1%以下となるように調整し、かつ、バフィロマイシンA₁を添加しない細胞培養液内で培養した細胞を陰性対照群として使用した。

2. 核DNAにおけるsub G₀/G₁分画の出現からみたアポトーシス

培養細胞を24時間シャーレ内で培養し接着させた後、各濃度に調整したバフィロマイシンA₁を含む培養液に24, 48, 72, 96時間接触させた。接触後、培養液中の浮遊細胞とEDTA添加0.25%トリプシン(Gibco)にて剥離した接着細胞を含めて全細胞を遠心回収した。その後、PBSにて洗浄し、0.5% Tween20 PBS 100 μlを加え、70%冷エタノール2mlにて固定した。固定後、0.5% Tween20 PBS 3 mlにて2回洗浄し、100 μg/ml RNase A 10 μlと100 μg/ml PIを1 ml加え、37°Cで遮光し20分間反応させた。反応終了後、EPICS PROFILEフローサイトメーター(flow cytometer)(Coulter Corporation, Miami, USA)を用いてDNA含有量を測定し、特にsub G₀/G₁ phaseの占める割合について解析した^{26,27)}。なお、DMSOの最終濃度が1%以下となるように調整し、かつ、バフィロマイシンA₁を添加しない

細胞培養液内で培養した細胞を陰性対照群として使用した。

3. 形態学的観察からみたアポトーシス

形態学的変化の経時的推移は、電子顕微鏡レベルで検討した。具体的には、培養細胞を24時間シャーレ内で培養し接着させた後、各濃度に調整したバフィロマイシンA₁を含む培養液に24, 48, 72, 96時間接触させた。接触後、培養液中の浮遊細胞とEDTA添加0.25%トリプシン(Gibco)にて剥離した接着細胞を含めて回収の後、4%パラホルムアルデヒド・2%グルタルアルデヒド/カコジル緩衝液(pH 7.4)にて前固定した。1%オスミウム酸/カコジル緩衝液(pH 7.4)にて後固定を行った後、ゼラチンカプセルに包埋して切片を作成し、酢酸ウラニルと鉛により電子染色を施し、透過型電子顕微鏡H-700(日立、東京)を用いておこなった。

VI. アポトーシスの実行過程に関する検討

1. アポトーシス実行に関与する関連分子群

アポトーシスの誘導に重要な役割を果たすことで知られているp53ならびにp21^{Waf1}蛋白²⁸⁾の発現の推移については、バフィロマイシンA₁処理後の癌細胞から経時的に蛋白を抽出し、ウエスタンブロッティング法で評価した。また、アポトーシス実行過程におけるカスパーゼカスケードの関与をみるため、非活性型カスパーゼと活性型カスパーゼの両方を同時に認識できる抗ヒトカスパーゼ抗体(抗カスパーゼ3, 6, 7, 9, 10抗体)を用いて、ウエスタンブロッティング法で評価した。さらに、Bcl-2, Bcl-XLおよびBaxなどのBcl-2ファミリー蛋白の発現についても同様に検討した。具体的には、HT-29細胞を100 mmシャーレ上で24時間培養した後、25 nMに調整したバフィロマイシンA₁を含む培養液を加えて24, 48, 72, 96時間接触させた。細胞はセルスクレイパーを用いて剥離し、上清液を含めて遠心回収した。超音波破碎後、一部を用いてプロテインアッセイキット(Bio-Rad Laboratories, Richmond, USA)で蛋白定量した。総蛋白量として20 μgをSDS-PAGE後、ポリ弗化ビニリデン(polyvinylidene difluoride)膜Immobilon-P(Millipore, Bedford, USA)に転写した。転写後、0.4%スキムミルク、0.05% Tween 20を含むトリス塩酸緩衝液(Tris-buffered saline, TBS)中で1時間ブロッキングし、一次抗体と4℃、24時間反応させた。洗浄液(0.04%スキムミルク、0.05% Tween20を含むTBS)を用

いて3回洗浄した後、二次抗体と室温で1時間反応させた。抗原抗体反応終了後、洗浄液を用いて3回洗浄し、ECLウエスタンブロットキットを用いて発光させ、X線フィルムに感光させた。一次抗体は、マウス抗ヒトp53抗体(DAKO, Glostrup, Denmark), マウス抗ヒトp21抗体(Pharmingen, San Diego, USA), マウス抗ヒトBcl-2抗体(Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA), ウサギ抗ヒトBcl-XL抗体(Santa Cruz), ウサギ抗ヒトBax抗体(Santa Cruz), ウサギ抗ヒトカスパーゼ3抗体(Pharmingen), マウス抗ヒトカスパーゼ6抗体(Pharmingen), マウス抗ヒトカスパーゼ7抗体(Pharmingen), ウサギ抗ヒトカスパーゼ9抗体(Pharmingen), ウサギ抗ヒトカスパーゼ10抗体(Pharmingen)を使用した。二次抗体はペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウスIgG抗体, ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギIgG抗体, ペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ヤギIgG抗体(Chemicon International Inc., Temecula, USA)を使用した。

2. アポトーシス誘導における細胞質内低pH関与の検討

細胞質内の低pHが酸性エンドヌクレアーゼ(DNase II)を直接活性化して核の分断化を惹起してアポトーシスを誘導することが知られている²⁹⁾。しかも、通常バフィロマイシンA₁処理で培養細胞の細胞質内pHが若干低下することも知られている³⁰⁾。そこで、バフィロマイシンA₁によるアポトーシス誘導に細胞質内低pHが関与しているか否かを知る目的で、イミダゾール(imidazole)(和光純薬工業株式会社)処理を行い、MTTアッセイ法にて細胞活性度を評価した。具体的には、25 nMバフィロマイシンA₁に1 mM又は10 mMイミダゾールを加え、MTTアッセイ法をおこなった。なお、細胞膜を容易に通過するイミダゾールは、細胞質内をアルカリ性に維持する目的で使用される薬剤²⁹⁾である。

VII. 統計学的処理

測定値は全て平均±標準偏差で示した。2群間の比較にはまずF検定による等分散の検定を行い、分散が等しい場合にはStudentのt検定を、等しくない場合にはWelchのt検定を用い、危険率5%未満(p<0.05)をもって統計的に有意差ありと判定した。

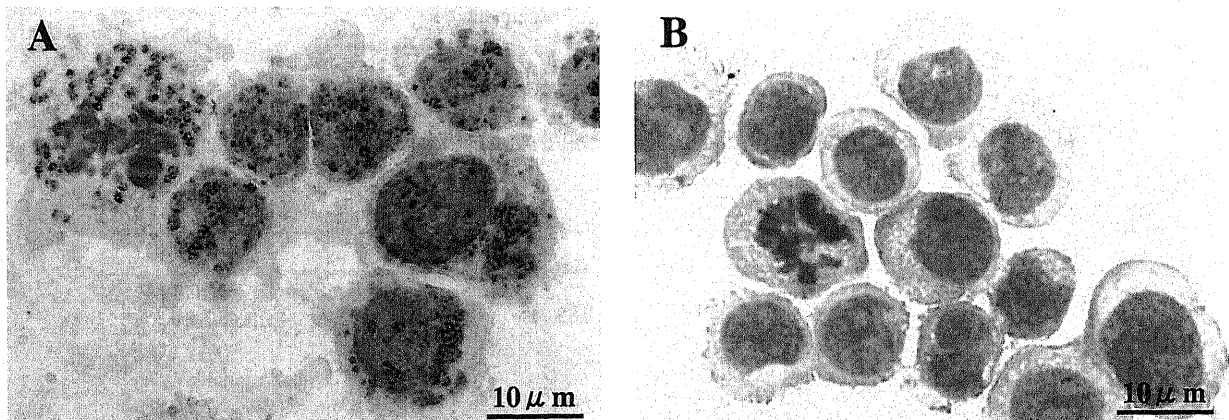


Fig. 1. Light microscopic immunostaining for 116 kDa proteolipid of V-ATPase in HT-29 cells ($\times 1000$). (A) HT-29 cells displayed immunoreactivity for V-ATPase protein in the cytoplasm. (B) Vehicle-treated control cells.

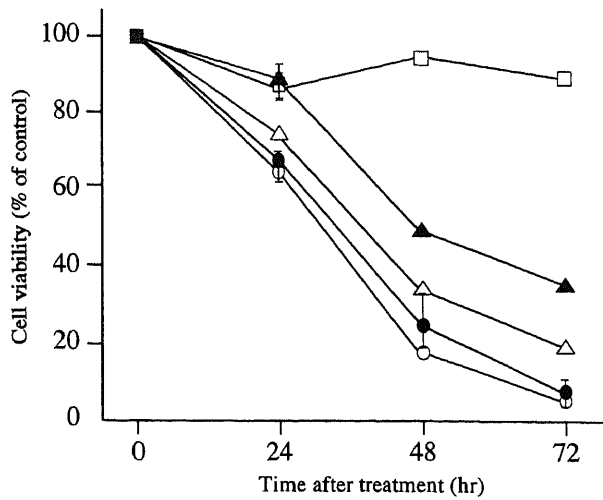


Fig. 2. Effect of bafilomycin A₁ on cell viability of a colorectal cancer cell line, HT-29. HT-29 cells were treated for 72 hr with bafilomycin A₁ at a concentration as follows: □, 1 nM; ▲, 5 nM; △, 10 nM; ●, 25 nM; ○, 50 nM. Points, the $\bar{x} \pm SD$ of triplicate observation from three separate experiments. IC₅₀ value of HT-29 cells during 72 hr was 5 nM.

Table 1. IC₅₀ values of colon cancer cell lines

Colorectal cancer cell lines	IC ₅₀ (nM)
HT-29	5
DLD-1	10
CaR-1	10
SW-480	20
SW-620	20
COLO-320DM	25
Normal liver cell	200<

成 績

I. 大腸癌培養細胞株における免疫細胞化学的染色法による蛋白レベルでの液胞型プロトンポンプの発現

免疫反応物質は、6種類全ての癌細胞の細胞質内で小さくリング状に、多くの顆粒の内膜 (endomembrane) に一致して認められた。しかし、細胞膜には免疫反応物質はみられなかった (図 1A)。陰性対照群の癌細胞には、いずれも免疫反応物質は認められなかった (図 1B)。

II. 大腸癌培養細胞の増殖能に対するバフィロマイシンA₁の影響

分化度の異なる6種類のヒト大腸癌培養細胞株の増殖能に及ぼすバフィロマイシンA₁の影響をMTTアッセイ法による細胞

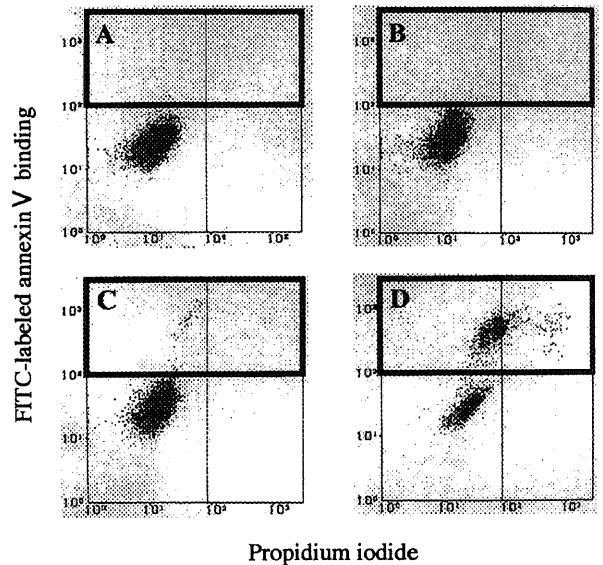


Fig. 3. Detection of annexin V binding cells in HT-29 cells treated with 25 nM bafilomycin A₁. (A) Vehicle-treated control cells. (B) HT-29 cells 16 hr after 25 nM bafilomycin A₁ treatment. (C) HT-29 cells 24 hr after the treatment. (D) HT-29 cells 96 hr after the treatment. Apoptotic cell population increased from 2.0% in the vehicle treated control group to 8.6% in the treatment group 24 hr after the treatment. It reached 50.8% in the treatment group 96 hr after the treatment.

Table 2. Percentage of PS externalization positive cells following bafilomycin A₁ treatment (25 nM) in HT29 cells

Treatment Group	Time (hr)			
	0	16	24	96
Bafilomycin A ₁ treated cells	1.5 ± 0.5%	2.6 ± 0.8%	10.3 ± 7.7%*	48.3 ± 6.3%*
Vehicle-treated control cells	1.5 ± 0.5%	1.9 ± 1.0%	1.7 ± 0.8%	2.2 ± 0.8%

These data are expressed as the $\bar{x} \pm SD$ of three different experiments in triplicate. Asterisk indicates significant differences between bafilomycin A₁ treated cells and vehicle treated control cells (P < 0.01).

活性度 (cell viability) を用いて評価したところ、6種類全ての細胞株で細胞活性度は対照群に比べ濃度依存性に抑制された (図2)。各大腸癌培養細胞株の72時間目でのIC₅₀値は、HT-29 (高分化型腺癌) で5 nM, DLD-1 (中分化型腺癌) で10 nM, SW-480 (中分化型腺癌) で20 nM, SW-620 (中分化型腺癌) で20 nM, CaR-1 (低分化型腺癌) で10 nM, COLO-320DM (未分化癌) で25 nMであった (表1)。一方、正常肝細胞のIC₅₀値は200 nM以上で、正常肝細胞と癌細胞の比較では、明らかに、バフィロマイシンA₁に対する感受性に差がみられた。

Ⅲ. バフィロマイシンA₁による大腸癌培養細胞株のアポトーシス誘導の有無

1. 細胞膜表面へのPS基の表出からみたアポトーシス

HT-29細胞では、25 nMバフィロマイシンA₁処理後24時間目

でのFITC標識アネキシンV結合陽性細胞の割合は、25 nMバフィロマイシンA₁処理群で10.3%で対照群の1.7%と比べ有意 ($p < 0.01$) に増加していた。また、処理後96時間目には25 nMバフィロマイシンA₁処理群では約50%の細胞がFITC標識アネキシンV結合陽性であり (表2)、しかも、それらの細胞が、早期アポトーシス域を経て晩期アポトーシス域へと移行していく経過が観察された (図3)。

2. 核DNAにおけるsub G₀/G₁分画の出現からみたアポトーシス

バフィロマイシンA₁で処理したHT-29細胞の細胞周期の分布を経時的にフローサイトメーターを用いて観察した。48時間目では、核の分断化が起こっていることを示すsub G₀/G₁分画の割合が25 nMバフィロマイシンA₁処理群で29.8%で対照群の

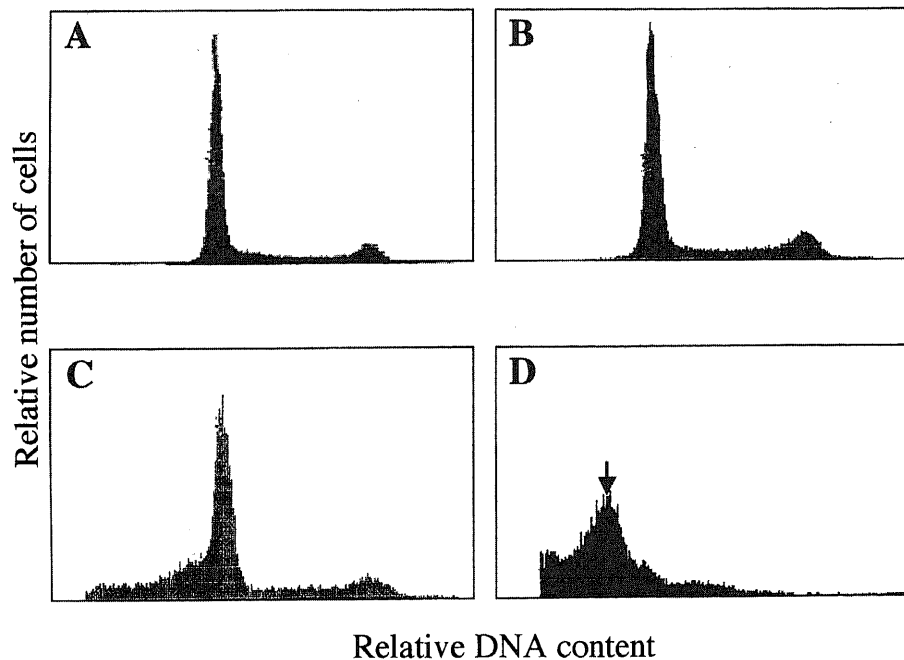


Fig. 4. Effect of bafilomycin A₁ on the cell cycle distribution of HT-29 cells. HT-29 cells were treated with 25 nM bafilomycin A₁ as indicated, stained with propidium iodide, and their DNA content was analyzed by flow cytometry. (A) Vehicle-treated control cells. (B) HT-29 cells 24 hr after 25 nM bafilomycin A₁. (C) HT-29 cells 48 hr after the treatment. (D) HT-29 cells 96 hr after the treatment. The relative number of cells in the sub G₀/G₁ fraction increased from 1.4% in the vehicle treated control group 48 hr after the treatment and it was reached 86.1% in the treatment group 96 hr after the treatment. The position of sub G₀/G₁ peak, integrated by apoptotic cells, was observed 96 hr after the treatment and is indicated by arrows.

Table 3. Change of proportions of sub G₀/G₁ phase following bafilomycin A₁ treatment (25 nM) in HT29 cells

Treatment Group	Time (hr)			
	0	24	48	96
Bafilomycin A ₁ treated cells	1.3 ± 0.5%	2.9 ± 0.4%	29.8 ± 1.1%*	80.4 ± 5.0%*
Vehicle-treated control cells	1.3 ± 0.5%	1.0 ± 0.9%	1.4 ± 0.8%	4.1 ± 0.6%

These data are expressed as the $\bar{x} \pm SD$ of three different experiments in triplicate. Asterisk indicates significant differences between bafilomycin A₁ treated cells and vehicle treated control cells ($P < 0.01$).

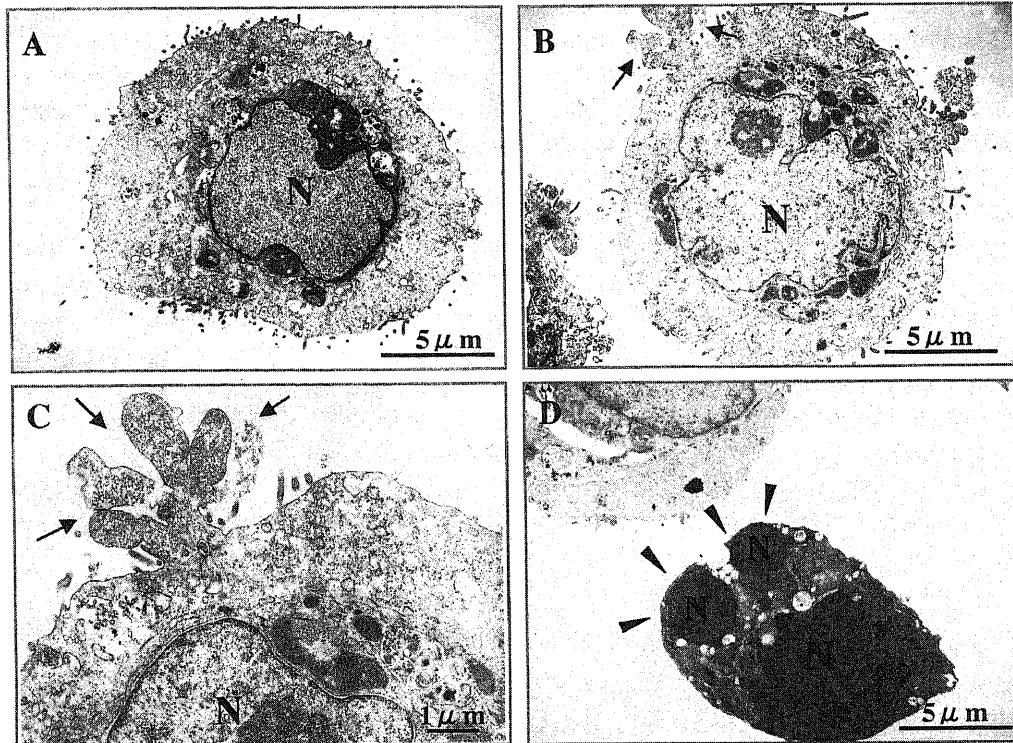


Fig. 5. Morphologic analysis of apoptosis in HT-29 cells by electron microscopy. (A) A viable HT-29 cell untreated with bafilomycin A₁. (B and C) Early stages of the morphological changes where apoptosis was induced, showing cytoplasmic blebbing (as indicated by the arrows) and a decrease number of microvilli but absence of chromatin condensation 24 hr after 25 nM bafilomycin A₁ treatment. (D) A typical apoptotic cell, showing nuclear chromatin condensation and fragmentation (as indicated by the head arrows), loss of microvilli and cell shrinkage.

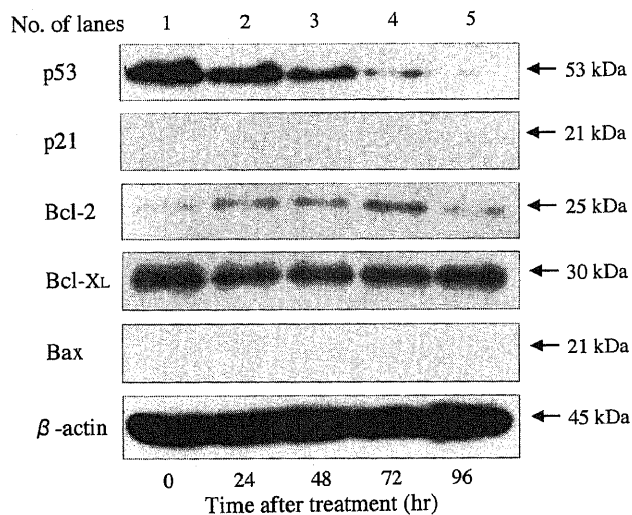


Fig. 6. Immunoblot analysis for p53, p21, Bcl-2, Bcl-XL and Bax proteins in HT-29 cells indicated hours after 25 nM bafilomycin A₁ treatment. Expression of p53 protein was not increased and p21 protein was not found. Bcl-2 protein and Bcl-XL protein were expressed but their protein levels did not change. Bax protein was not expressed.

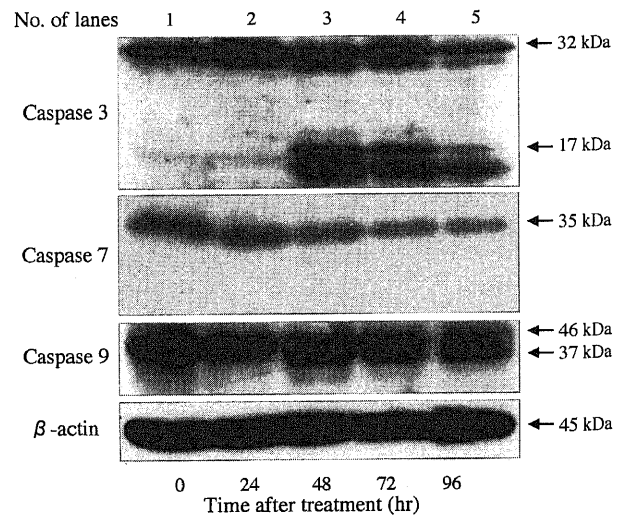


Fig. 7. Immunoblot analysis for processing of caspase 3, caspase 7 and caspase 9 in HT-29 cells indicated hr after 25 nM bafilomycin A₁ treatment. Procaspase 3 (32 kDa), caspase 3 cleavage product (17 kDa), procaspase 9 (46 kDa) and caspase 9 cleavage product (37 kDa) were observed after 48 hr after 25 nM bafilomycin A₁ treatment.

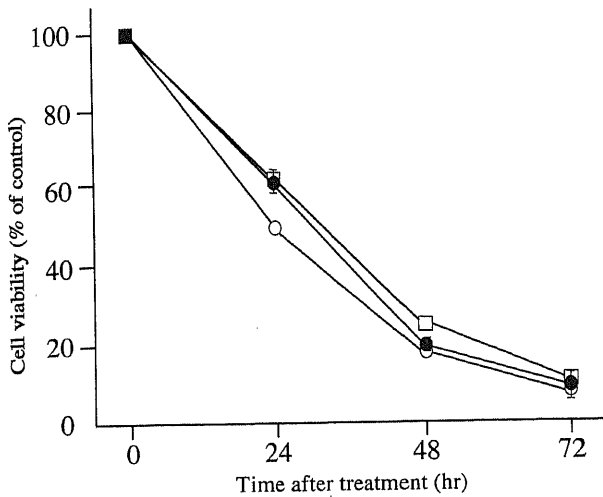


Fig. 8. Effects of imidazole on the HT-29 cells treated with 25 nM bafilomycin A₁. HT-29 cells were treated with bafilomycin A₁ and imidazole at a concentration as follows: ○, 25 nM bafilomycin A₁; ●, 25 nM bafilomycin A₁ and 1 mM imidazole; □, 25 nM bafilomycin A₁ and 10 mM imidazole. Points, the $\bar{x} \pm SD$ of triplicate observation from three separate experiments.

1.4%と比べ有意 ($p < 0.01$) に増加していた。96時間目には、バフィロマイシンA₁処理群では80%以上の細胞がsub G₀/G₁分画に存在し、アポトーシスピークを形成していた (図4, 表3)。

3. 形態学的観察からみたアポトーシス

電子顕微鏡による観察では、未処理のHT-29細胞 (図5A) に比べ、25 nMバフィロマイシンA₁処理後24時間目には癌細胞膜上の微絨毛の減少、プレブ形成 (membrane blebbing) を認めたが、細胞内小器官に大きな変化は認められなかった (図5B, 5C)。48時間目には細胞の縮小、癌細胞膜上の微絨毛の消失、核クロマチンの核膜周辺への凝集と核の分断化などアポトーシスに特徴的な所見を認めた (図5D)。

IV. アポトーシスの実行過程に関する検討

1. アポトーシス実行に関与する関連分子群

HT-29細胞を25 nMバフィロマイシンA₁と24, 48, 72, 96時間接触させ、ウエスタンブロッティング法にてアポトーシス関連蛋白の変化を観察した。変異型p53蛋白の発現は、バフィロマイシンA₁処理によって増強しなかった。p21^{Waf1}蛋白は誘導されなかった。アポトーシス抑制因子であるBcl-2, Bcl-XLに関してはBcl-2, Bcl-XL共に発現を認めたが、バフィロマイシンA₁処理によって、その発現程度は終始変化しなかった。アポトーシス促進因子であるBax蛋白の発現は認めなかった (図6)。カスパー3蛋白分解酵素、カスパー9蛋白分解酵素は25 nMバフィロマイシンA₁処理後48時間目には、カスパー3の活性体である17 kDaのサブユニット、カスパー9の活性体である37 kDaのサブユニットが観察された。カスパー6蛋白分解酵素、カスパー7蛋白分解酵素は非活性型は発現していたが、カスパー6の活性体である11 kDaのサブユニット、カスパー7の活性体である17 kDaのサブユニットの発現は認められなかった (図7)。カスパー10蛋白分解酵素は発現をみなかった。

2. アポトーシス誘導における細胞内低pHの関与

10 mMイミダゾールを加えてのMTTアッセイ法では、バフィロマイシンA₁によるアポトーシスの誘導は抑制されなかった (図8)。つまり、バフィロマイシンA₁によるアポトーシスの誘導は細胞内低pHとは無関係に実行された。

考 察

最近、荒川¹⁰⁾は抗癌剤に抵抗性を示す膵癌細胞が液胞型プロトンポンプの特異的阻害剤であるバフィロマイシンA₁処理により、容易にアポトーシスに陥ってその増殖が著明に抑制されることを報告した。これまでも、バフィロマイシンA₁がアポトーシスを介してBリンパ腫細胞株 (WEHI 231細胞) の培養シャーレ内での増殖を抑制したとの報告¹¹⁾はあるものの、一般に抗癌剤が効きにくいヒト固形癌に対して、バフィロマイシンA₁が生体内で効率良く癌細胞の増殖を抑制することを明らかにしたのは、荒川の報告¹⁰⁾が最初である。しかし、バフィロマイシンA₁がどのような機序でアポトーシスを誘導するかについては言及されておらず、未だその機序については解明されていない。そこで、本研究は固形癌の中でも膵癌と同様p53遺伝子異常を有し、抗癌剤に抵抗性を示し、アポトーシスに陥りにくいとされている6種類の大腸癌培養細胞株を用いて、バフィロマイシンA₁のアポトーシスを介した増殖抑制効果およびアポトーシス実行過程での形態学的変化やアポトーシス関連分子の関与について詳細に検討した。

まず最初に、バフィロマイシンA₁による大腸癌培養細胞の増殖抑制効果について考察する。今回の研究に用いた分化度の異なる6種類の大腸癌培養細胞株は、全て液胞型プロトンポンプ蛋白を過剰に発現しており、バフィロマイシンA₁に対しては5 nMから25 nMと、極めて低濃度のIC₅₀値を示した。しかも、種々のヒト固形癌細胞の中でもアポトーシス抵抗性の強い細胞として知られているHT-29細胞がバフィロマイシンA₁に対して最も高い感受性を示したことが注目される。これらの成績は、p53遺伝子異常を多く認め、抗癌剤に抵抗性を示すヒト固形癌に対し、バフィロマイシンA₁が有効な治療薬となりうることを示したものと見える。

ところで、今回実験に用いた6種類の大腸癌培養細胞株での液胞型プロトンポンプ蛋白の細胞内局在を免疫細胞化学的染色で検索したところ、いずれの細胞株も細胞質内の顆粒の内膜 (endomembrane) に一致して強く発現していたが、細胞膜には発現は認められなかった。つまり、大腸癌細胞質内には液胞型プロトンポンプ蛋白を有する多くの酸性顆粒が存在することを示唆する所見と考えられた。さらに、今回電子顕微鏡で観察したHT-29大腸癌細胞の細胞質内にはライソゾームがそれほど多く観察されなかったことを考えあわせると、癌細胞の細胞質内に見られる酸性顆粒はライソゾーム以外の酸性顆粒であると考えられた。一般に、正常細胞で見られる主な酸性顆粒はライソゾームであり、特に肝細胞はライソゾームを多く有し、細胞質内で液胞型プロトンポンプ蛋白を多く発現する細胞として知られている。そこで、本研究では多くのライソゾームを有する肝細胞と、ライソゾーム以外の酸性顆粒を多く有する癌細胞との間で、バフィロマイシンA₁に対する感受性に差が見られるか否かを検索した。その結果、MTTアッセイ法による評価では癌細胞のIC₅₀値 (72時間) は5 nMから25 nMであったのに対し正常肝細胞のIC₅₀値は200 nM以上で、明らかに正常肝細胞と癌細胞との間に感受性の差が認められた。荒川¹⁰⁾はヌードマウス

皮下移植ヒト膵癌に対してバフィロマイシン_{A₁}の抗腫瘍効果を観察し、バフィロマイシン_{A₁}治療4週後に犠牲死させたヌードマウスの肝、膵および腎組織を病理組織学的に検討し、対照群と比較して病理組織学的に異常所見がなく、また体重の推移にも有意差のなかったことを報告しているが、今回の正常肝細胞を用いた培養シャーレ内での成績は、荒川¹⁰⁾の生体内での成績を支持するものであった。このように、バフィロマイシン_{A₁}の正常細胞に及ぼす影響は予想以上に少なく、従って、液胞型プロトンポンプを過剰発現している固形癌に対しては、液胞型プロトンポンプを標的とした新しい癌治療戦略が今後の大きな課題になるものと思われる。

次に、バフィロマイシン_{A₁}処理による癌細胞の形態学的変化ならびにアポトーシス関連分子³⁵⁰⁻³⁶⁰⁾の発現の推移について考察する。本研究で明かとなったのは、HT-29大腸癌細胞がバフィロマイシン_{A₁}処理24時間目で、約10%の癌細胞の細胞膜表面にPS基の表出が認められ、また、電子顕微鏡レベルでも癌細胞膜表面の微絨毛の減少やブレブ形成が観察されるなど、アポトーシスの初期像とされる所見が観察されたことであった。そして、48時間目には癌細胞の縮小や核クロマチンの凝集など典型的なアポトーシスの所見が観察された。なかでも、細胞膜表面のPS基の表出や癌細胞膜表面の微絨毛の減少やブレブ形成は、アポトーシスにだけ観察される特徴的な所見ではないが³⁶⁰⁾、アポトーシスに陥る細胞の極めて初期に観察される所見として認められており、今回の成績もこれらの成績と一致するものであった。さらにアポトーシス関連分子の発現程度の経時的推移を見ると、変異型p53蛋白を有するHT-29細胞では、p21^{Waf1}蛋白の発現はバフィロマイシン_{A₁}処理により誘導されず、アポトーシス促進因子のBax蛋白も発現は認められなかった。また、アポトーシス抑制分子であるBcl-2やBcl-XL蛋白も、終始発現の程度には変化が認められなかった。以上より、バフィロマイシン_{A₁}によるアポトーシス実行過程には、p53, p21^{Waf1}, Bax, Bcl-2およびBcl-XL蛋白の関与がないことが判明した。そこで、次にアポトーシスの実行に一番深く関わっていると考えられているカスパーゼ蛋白分解酵素の関与について検討した。アポトーシス実行過程におけるカスパーゼ蛋白分解酵素の関与については、これまではそれぞれのカスパーゼの標的である基質の分解産物を測定して、その活性化の有無を評価していた³⁶⁰⁾。しかし、ごく最近カスパーゼの非活性体(非活性型カスパーゼ)と活性体(活性型カスパーゼ)を同時に認識できる抗ヒトカスパーゼ抗体が開発され、ウエスタンブロッティング法で非活性型カスパーゼが活性型カスパーゼに変換されていく過程を経時的に観察できるようになった。したがって、本研究でも非活性型カスパーゼと活性型カスパーゼの両方を同時に認識できる抗体を用いて、ウエスタンブロッティング法で両蛋白分解酵素の発現程度を評価した。その結果、HT-29大腸癌細胞では、検索した5種類の非活性型カスパーゼ3, 6, 7, 9, 10のうち、非活性型カスパーゼ10を除く4種類の非活性型カスパーゼの発現が認められた。そのうちバフィロマイシン_{A₁}処理により48時間目からは活性型カスパーゼ9と活性型カスパーゼ3の出現が確認できた。しかし、非活性型カスパーゼ6, 7の発現は認められたものの、活性型は認められなかった。カスパーゼ9は実行カスパーゼ(execution caspase)である活性型カスパーゼ3の上流に位置する開始カスパーゼ(initiator caspase)³⁶⁰⁻⁴⁰⁰⁾であることが既に明らかにされていることから、バフィロマイシン_{A₁}処理に

よるアポトーシス実行経路は、主にカスパーゼ9→カスパーゼ3→核DNAの分断化および細胞質の萎縮に至るミトコンドリア依存性経路であることが判明した。しかも、これら非活性型カスパーゼはいずれも24時間目にはまだ活性型に変換されていなかったことより、細胞膜に見られた膜表面のPS基の表出や細胞膜表面の微絨毛の減少やブレブ形成は、いずれもカスパーゼ9よりさらに上流のカスパーゼによって惹起される形態学的変化であることが推察された。

最後にバフィロマイシン_{A₁}処理による癌細胞質内低pHに起因するアポトーシス実行経路の可能性について考察する。最近、エトポシド(etoposide)処理で誘導されたHL60白血病細胞に見られるアポトーシスには、癌細胞質内pHの低下(cytosolic acidification)が先行して認められたとする報告^{410,42)}がある。つまり、癌細胞質内pHの低下によりpH依存性エンドヌクレアーゼ(pH-dependent endonuclease, Dnase II)³⁶⁰⁾の活性が亢進してDNAの分断化が生じアポトーシスに陥るという考えである。しかし、ラット由来PC12細胞を用いた実験では、バフィロマイシン_{A₁}処理で細胞質内pHの有意な低下は見られず、細胞質内pHとは無関係にアポトーシスが誘導されたことが報告されている³⁶¹⁾。本研究でも癌細胞にイミダゾール³⁶²⁾を負荷して、バフィロマイシン_{A₁}処理を行ったが、アポトーシスは全く抑制されなかった。したがって、バフィロマイシン_{A₁}処理によるアポトーシスは、細胞質内pHの低下とは無関係に実行されていることが示唆された。

以上、今回の実験結果からバフィロマイシン_{A₁}処理による癌細胞の主要なアポトーシスの実行経路は、カスパーゼ9→カスパーゼ3→核DNAの分断化および細胞質の萎縮に至るミトコンドリア依存性経路であることが判明した。しかし、バフィロマイシン_{A₁}により癌細胞内酸性顆粒膜の液胞型プロトンポンプ機能を特異的に阻害することが、どうしてミトコンドリア依存性経路のカスパーゼカスケードの活性化に繋がっていくのかを明らかにすることができなかった。今後、さらなる研究により、カスパーゼ9よりさらに上流側に位置する開始カスパーゼの役割が解明され、細胞膜表面のPS基の表出や癌細胞膜表面の微絨毛の減少とブレブ形成などの形態学的変化に直接関わるカスパーゼの同定がなされて、バフィロマイシン_{A₁}によるアポトーシス細胞死の全過程が解明されることに期待したい。

結 論

液胞型プロトンポンプの特異的阻害剤バフィロマイシン_{A₁}のヒト大腸癌培養細胞株に対する増殖抑制効果とその機序について検討し、以下の成績を得た。

1. 液胞型プロトンポンプの特異的阻害剤バフィロマイシン_{A₁}処理によるヒト大腸癌培養細胞株で観察されたアポトーシスは、p53蛋白や細胞周期とは無関係に誘導された。

2. バフィロマイシン_{A₁}処理による主要なアポトーシス実行経路は、カスパーゼ9, カスパーゼ3を介したミトコンドリア依存性経路であった。

3. バフィロマイシン_{A₁}処理によるアポトーシスは、細胞質内低pHとは無関係に実行されていた。

以上より、p53遺伝子異常を認め、抗癌剤に抵抗性を示すヒト固形癌に対し、液胞型プロトンポンプの特異的阻害剤であるバフィロマイシン_{A₁}は、有効な治療薬になる可能性が示唆された。

謝 辞

稿を終えるに臨み、終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました金沢大学医学部外科学第二講座三輪晃一教授に深甚なる謝意を表します。本研究の遂行にあたり、直接御指導と御鞭撻を賜りました金沢大学医学部外科学第二講座太田哲生助教授に深く感謝致します。また、御助言、御協力をいただきました金沢大学薬学部分子細胞薬学講座大熊勝治教授、金沢大学医学部保健学科谷内江昭宏教授、金沢大学医学部解剖学第一講座山本美由紀助手および解剖学第一講座、外科学第二講座の諸兄に厚く御礼申し上げます。

尚、本研究の要旨は第99回日本外科学会総会(1999, 福岡), 第37回日本癌治療学会総会(1999, 岐阜)において発表した。

文 献

- 1) Forgac M. Structure and function of vacuolar class of ATP-driven proton pumps. *Physiol Rev* 69: 765-796, 1989
- 2) Nelson N. Structure and pharmacology of the proton-ATPases. *Trends Pharmacol Sci* 12: 71-75, 1991
- 3) Forgac M. Structure, function and regulation of the coated vesicle V-ATPase. *J Exp Biol* 172: 155-169, 1992
- 4) Ohta T, Numata M, Yagishita H, Futagami F, Tsukioka Y, Kitagawa H, Kayahara M, Nagakawa T, Miyazaki I, Yamamoto M, Iseki S, Ohkuma S. Expression of 16 kDa proteolipid of vacuolar-type H⁺-ATPase in human pancreatic cancer. *Br J Cancer* 73: 1511-1517, 1996
- 5) Martinez-Zaguilan R, Lynch RM, Martinez GM, Gillies RJ. Vacuolar-type H⁺-ATPases are functionally expressed in plasma membranes of human tumor cells. *Am J Physiol*: 1015-1029, 1993
- 6) Bowman EJ, Siebers A, Altendorf K. Bafilomycins: a class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 7972-7976, 1998
- 7) Nelson H, Nelson N. Disruption of genes encoding subunits of yeast vacuolar H⁺-ATPase causes conditional lethality. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 3503-3507, 1990
- 8) Ohkuma A S, Shimizu S, Noto M, Sai Y, Kinoshita K, Tamura H. Inhibition of cell growth by bafilomycin A₁, a selective inhibitor of vacuolar H⁺-ATPase. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 29: 862-866, 1993
- 9) Manabe T, Yoshimori T, Henomatsu N, Tashiro Y. Inhibitors of vacuolar-type H⁺-ATPase suppresses proliferation of culture cells. *J Cell Physiol* 157: 445-452, 1993
- 10) 荒川 元. バフィロマイシンA₁によるヒト腫瘍細胞株の増殖抑制効果に関する実験的研究. 金沢大学十全医学会雑誌 108: 419-428, 1999
- 11) Gottlieb RA, Giesing HA, Zhu JY, Engler RL, Babior BM. Cell acidification in apoptosis: granulocyte colony-stimulating factor delays programmed cell death in neutrophils by up-regulating the vacuolar H⁺-ATPase. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 5965-5968, 1995
- 12) Crider BP, Xie YS, Stone DK. Bafilomycin A₁ proton flow through the H⁺ channel of vacuolar proton pump. *J Biol Chem* 269: 379-381, 1994
- 13) Nishihara T, Akifusa S, Koseki T, Kato S, Muro M, Harada N. Specific inhibitors of vacuolar type H⁺-ATPase induce apoptotic cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 212: 252-262, 1995
- 14) 藤田直也, 鶴尾 隆. がんにおけるアポトーシス. 最新医学 54: 59-65, 1999
- 15) Sato SB, Toyama S. Interference with the endosomal acidification by a monoclonal antibody directed toward the 116 (100)-kD subunit of the vacuolar type proton pump. *J Cell Biol* 127: 39-53, 1994
- 16) Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *J Immunol Methods* 65: 55-63, 1983
- 17) Carmichael J, Degraff WG, Gadzar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of tetrazolium-based semi-automate colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res* 47: 936-941, 1987
- 18) Koopman G, Reutelingsperger CPM, Kuijten GAM, Keehnen RMJ, Pals ST, van Oers MHJ. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on Bcell undergoing apoptosis. *J Exp Med* 183: 1553-1544, 1996
- 19) Bratton DL, Fadok VA, Richter DA, Kailer JM, Guthrie LA, Henson PM. Appearance of phosphatidylserine apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of aminophospholipid translocase. *J Biol Chem* 272: 26159-26165, 1997
- 20) Martin SJ, Reutelingsperger CPM, McGaoh AJ, Rader JA, Van schie RCAA, LaFace DM, Green DR. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of initiating stimulus; inhibition by overexpression of bcl-2 and Abl. *J Exp Med* 181: 1545-1556, 1995
- 21) O'Brien, IEW, Reutelingsperger CPM, Holdaway KM. Annexin V and TUNEL use in monitoring the progression of apoptosis in plants. *Cytometry* 29: 28-33, 1997
- 22) Zhang G, Gurtu V, Kain SR, Yan G. Early detection of apoptosis using fluorescent conjugate of Annexin V. *Biotechniques* 23(3): 525-530, 1997
- 23) Van Engeland M, Ramaekers FCS, Schutte B, Reutelingsperger CPM. A novel assay to measure loss of plasma membrane asymmetry during apoptosis of adherent cells in culture. *Cytometry* 24: 131-139, 1996
- 24) Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labeled annexin V. *J Immunol Methods* 184: 39-51, 1995
- 25) 布上孝志. 急性感染症におけるリンパ球活性化の新たな指標: アネキシンV結合法によるアポトーシス指向性リンパ球の検出. 金沢大学十全医学会雑誌 107: 263-275, 1999
- 26) Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide and flow cytometry. *J Immunol Methods* 139: 271-279, 1991
- 27) Darzynkiewics Z, Brunos S, Del Bino G, Gorczyca W, Hotz MA, Lassota P, Traganos F. Feature of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry* 13: 759-808, 1992
- 28) Lowe SW, Ruley HE, Jacks T, Houseman DF. P53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer

- agents. *Cell* 74: 957-967, 1993
- 29) Harris CC. Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: Clues for rational cancer therapeutic strategies. *J Natl Cancer Inst* 88: 1442-1455, 1996
- 30) Barry M, Eastmann A. Identification of deoxyribonuclease II as an endonuclease involved in apoptosis. *Arch Biochem Biophys* 300: 440-450, 1993
- 31) Kinoshita K, Waritani T, Noto M, Takizawa K, Minemoto Y, Nishikawa A, Ohkuma S. Bafilomycin A, induces apoptosis in PC12 cells independently of intracellular pH. *FEBS Lett* 398: 61-66, 1996
- 32) Yamamoto C, Takemoto H, Kuno K, Yamamoto D, Tsubura A, Kamata K, Hirta H, Yamamoto A, Kana H, Seki T, Inoue K. Cycloprodigiosin hydrochloride, a new H⁺/Cl⁻ symporter, induces apoptosis in human and rat hepatocellular cancer cell lines in vitro and inhibits the growth of hepatocellular carcinoma xenografts in nude mice. *Hepatology* 30: 894-902, 1999
- 33) Merchant A K, Loney T L, Maybaum J. Expression of wild type p53 stimulates an increase in both Bax and Bcl-XL protein content in HT-29 cells. *Oncogene* 13: 2631-2637, 1996
- 34) Zhang Y, Fujita N, Tsuruo T. Caspase-mediated cleavage of p21^{Waf1/Cip1} converts cancer cells from growth arrest to undergoing apoptosis. *Oncogene* 18: 1131-1138, 1999
- 35) Fujita N, Nagahashi A, Nagashima K, Rokudai S, Tsuruo T. Acceleration of apoptotic cell death after the cleavage of Bcl-XL protein by caspase-3-like protease. *Oncogene* 17: 1295-1304, 1998
- 36) Keane MM, Ettenberg SA, Nau MM, Russell EK, S Lipkowitz. Chemotherapy augments TRAIL-induced apoptosis in breast cell lines. *Cancer Res* 59: 734-741, 1999
- 37) Hirata H, Takahashi A, Kobayashi S, Yonehara S, Sawai H, Okazaki T, Yamamoto K, Sasada M. Caspases are activated in a branched protease and control distinct downstream processes in Fas-induced apoptosis. *J Exp Med* 187: 587-600, 1998
- 38) Huppertz B, Frank H-G, Kaufmann P. The apoptosis cascade-morphological and immunohistochemical method for its visualization. *Anat Embryol* 200: 1-18, 1999
- 39) Nunez G, Benedict A M, Hu Y, Inohara N. Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene* 17: 3237-3245, 1998
- 40) 太田成男. アポトーシスにおけるミトコンドリアの新たな役割. *最新医学* 54: 35-42, 1999
- 41) Perez-Sala D, Collado-Escobar D, Mokkinedo F. Intracellular alkalinization suppresses lovastatin-induced apoptosis in HL-60 cells through the inactivation of a pH dependent endonuclease. *J Biol Chem* 270: 6235-6242, 1995
- 42) Gottlieb R A, Nordberg J, Skowronski E, Babior BM. Apoptosis induced Jurkat cells by several agents is preceded by intracellular acidification. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 654-658, 1996

Inhibitory Effect of Bafilomycin A₁ on Proliferation of Cultured Human Colorectal Cancer Cells Keiko Iwata, Department of Surgery (II), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — J. Juzen Med Soc., **109**, 133 — 143 (2000)

Key words vacuolar type H⁺-ATPase, bafilomycin A₁, colorectal cancer cell, apoptosis, caspase

Abstract

Bafilomycin A₁, a potent selective inhibitor of vacuolar type H⁺-ATPase (V-ATPase), inhibits the proliferation of a variety of cultured cells in a dose-dependent manner at nanomolar concentrations. However, the detailed mechanism by which bafilomycin A₁ suppresses the proliferation of cultured cells is unclear. This study was designed to examine how bafilomycin A₁ inhibits the proliferation of human colorectal cancer cells through apoptosis. Six human colorectal cancer cell lines, known to express mutant p53 protein, were used to examine effect of bafilomycin A₁ on tumor proliferation using MTT assay. The concentration of bafilomycin A₁ found by MTT assay to induce 50% inhibition of cell viability during a 72 hr period was from 5 nM to 25 nM in every cell line. Among the six cell lines, HT-29 cells were found to be the most sensitive to bafilomycin A₁. Apoptosis of HT-29 cells was evaluated by the following tools: phosphatidylserine externalization using FITC-labeled annexin V, DNA fragmentation analysis, morphologic analysis and immunocytochemistry. Phosphatidylserine externalization of HT-29 cells was found 24 hr after 25 nM bafilomycin A₁ treatment. The relative number of cells in the subG₀/G₁ fraction began to increase 48 hr after the treatment. In cytopathological examination, HT-29 cells showed cytoplasmic blebbing and a decreased number of microvilli 24 hr after the treatment and the characteristic morphological changes of apoptosis, including nuclear chromatin condensation and fragmentation, loss of microvilli and cell shrinkage, were seen 48 hr after the treatment. In immunocytochemistry, expression of p53 protein was not increased and p21^{waf1} protein was not found until 96 hr after the treatment. Bcl-2 and Bcl-XL proteins were expressed but their protein levels did not change from before to after the treatment. Expression of Bax protein was not found during the experiment. Caspase 3 and caspase 9 proteins were activated 48 hr after the treatment, however, caspase 6 and caspase 7 proteins were not activated during the treatment. These apoptotic changes were not inhibited by 10 mM imidazole treatment. These findings suggest that the suppression of cell proliferation of human colon cancer cell line HT-29 by bafilomycin A₁ is related to a mitochondria-dependent apoptotic pathway through caspase 9 and caspase 3.