

新規マイトマイシンC誘導体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 (KW-2149)耐性ヒト非小細胞肺癌株の樹立とその耐性獲得機構の検討

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/2297/9339

新規マイトマイシンC誘導体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 (KW-2149) 耐性ヒト非小細胞肺癌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)

白 崎 浩 樹

新規マイトマイシンC (mitomycin C, MMC) 誘導体の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)-ethyl]dithio]ethyl]-mitomycin C, KW-2149) に対する非小細胞肺癌の耐性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KW-2149に持続接触させることによりKW-2149耐性株を樹立してPC-9/KWと命名した。抗癌薬感受性試験による50%増殖抑制濃度 (IC_{50}) を比較すると、PC-9/KWはKW-2149に対して9.1倍の耐性を示した。さらに、PC-9/KWは、MMC、新規インドロキノン系抗腫瘍物質3-水酸化メチル-5-アジリデンル-1-メチル-2-(H-インドール-4,7-インディオン)-プロペノール、エトポシド、アドリアマイシン、シスプラチン、イリノテカンの代謝活性化体7-エチル-10水酸化カンプトテシンに対して交差耐性を示した。DT-ジアホラーゼ (DT-diaphorase, DTD) 活性は、PC-9の759 \pm 48 nmol/分/mg 蛋白に対し、PC-9/KWでは478 \pm 114 nmol/分/mg 蛋白に低下していたが、DTD阻害薬のジクマロール (dicumarol, DIC) 処理によって、KW-2149に対するPC-9/KWの IC_{50} は43.2 \pm 4.5 μ Mから24.0 \pm 9.6 μ Mに低下し感受性が有意に亢進した。PC-9/KWにおいてグルタチオン (glutathione, GSH) 含量は有意に増加し、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (glutathione-S-transferase, GST) 活性は有意に低下していたが、両細胞株ともGSH合成阻害薬のプロチオニンスルフォキサミン処理や、GST阻害薬のエタクリン酸処理によってKW-2149に対する感受性は変化しなかった。細胞内薬物蓄積量は、PC-9/KWではPC-9の63%に有意に低下していた。しかし、ウェスタンブロット法では、薬剤排出ポンプであるP糖蛋白と多剤耐性関連蛋白は、いずれの細胞株においても発現は認められなかった。また、DIC処理によってPC-9/KWのKW-2149細胞内蓄積量は有意に1.6倍に増加した。PC-9/KWにおける耐性機序として、KW-2149の細胞内蓄積量の低下が重要であることが結論された。さらに、DICがDTDと無関係にその耐性機構を部分的に解除することが明らかとなった。

Key words KW-2149, mitomycin C, dicumarol, non-small cell lung cancer, drug resistance

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な数少ない抗癌薬の一つである。MMCが細胞毒性を発揮するには、細胞内で還元を受け活性化される必要がある。その還元反応を媒介する酵素として、DT-ジアホラーゼ (DT-diaphorase, 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, キサンチン酸化酵素, キサンチン脱水素酵素などが知られている^{1)~9)}。また、グルタチオン (glutathione, GSH), グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (glutathione-S-transferase, GST) などの細胞内薬剤代謝機構は、MMCの不活性化に関与している^{10)~13)}。

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)-ethyl]dithio]ethyl]-mitomycin C, KW-2149) は7位に γ -L-グルタミルシスタミンを有する水溶性の新規のMMC誘導体である¹⁴⁾⁵⁾ (図1)。KW-2149は、固形癌に対してMMCと同程度の幅広い抗腫瘍ス

ペクトラムを示し^{15)~17)}、より強い抗腫瘍活性を示す^{16)~20)}が、骨髄抑制はMMCより軽度であり¹⁷⁾²¹⁾²³⁾、肺癌化学療法に有望な抗癌薬である。ヨーロッパにおいて臨床試験中であり、日本でも非小細胞肺癌などにおいて臨床試験が計画されている²⁴⁾。

KW-2149は、アドリアマイシン耐性株、シスプラチン耐性株、MMC耐性株に対して交差耐性を有しないと報告が多い^{5)11)15)~19)22)25)}。当教室のShibataら²⁶⁾は、MMC耐性非小細胞肺癌細胞株PC-9/MC2, PC-9/MC4を樹立し、DTDがMMC活性化機構において最も重要な役割を果たしており、DTD活性の低下しているMMC耐性株においてKW-2149は交差耐性を示さないことから、KW-2149はMMCの誘導体であるものの、その活性化にはDTDは関与していないと報告した。

一方、GSHとシステインがKW-2149の抗腫瘍効果を増強するとの報告²⁷⁾やヒト血漿により活性化されやすいとの報告²⁸⁾もある。しかし、KW-2149の感受性を規定する因子について、詳

平成10年9月24日受付, 平成10年10月20日受理

Abbreviations : BSO, D,L-buthionine-S,R-sulfoximine; DIC, dicumarol; DMSO, dimethyl sulfoxide; DTD, DT-diaphorase; EA, ethacrynic acid; GSH, glutathione; GST, glutathione-S-transferase; MMC, mitomycin C; MRP, multidrug resistance-associated protein; MTT, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; PBS, calcium-free and magnesium-free Dulbecco's phosphate-buffered saline; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride

細はなお不明である。著者は非小細胞肺癌株を用いてKW-2149耐性株を樹立し、その耐性機構について検討した。

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, KW-2149, ³H-KW-2149, アドリアマイシンおよび3-水酸化メチル-5-アジリドニル-1-メチル-2-(H-インドール-4,7-インディオン)-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。シスプラチンおよびエトポシドは日本化薬 (東京) より、7-エチル-10水酸化カンプトテシン (7-ethyl-10-hydroxycamptothecin, SN-38) はヤクルト (東京) より、それぞれ供与を受けた。ジクマロール (dicumarol, DIC), ツィーン 20, ジメチルスルフォキシド (dimethyl sulfoxide, DMSO), スクロースは和光純薬工業 (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 μ g/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、培養液と記載する) を用い、37°C, 湿潤, 5% CO₂/95% 空気の条件下で行った。PC-9 の KW-2149 耐性株は、以下に示す方法で分離、樹立した。すなわち、KW-2149 を 0.01 μ g/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 KW-2149 濃度を 0.03 μ g/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/KW とした。PC-9/KW は KW-2149 を 0.03 μ g/ml 加えた培養液で 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 KW-2149 を含まない培養液中で培養した。

ウェスタンブロット法の際に、P 糖蛋白の陽性コントロールとしてヒト慢性骨髄性白血病の急性転化細胞株のアドリアマイシン耐性株である K562/A²⁷ (癌研究会癌化学療法センター, 東京, 鶴尾隆博士より供与) を、多剤耐性関連蛋白 (multidrug resistance-associated protein, MRP) の陽性コントロールとしてヒト前骨髄球性白血病細胞株のアドリアマイシン耐性株である HL60/ADR²⁸ (金沢大学医学部医学科小児科学講座, 小泉晶一教授より供与) を用いた。

III. 増殖曲線と倍加時間

4,000 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 (Falcon, Franklin Lakes, USA) に 10 ml ずつ分注し、12 日間まで培養液の交換を行わずに培養した。培養開始 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12 日後に単細胞を回収し、0.3% 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算定した。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記入し、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 KW-2149 耐性株 PC-9/KW の各種抗癌薬に対する感受性は、Mosmann ら²⁹ の報告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回収し培養液に浮遊して 4 × 10⁴ 細胞 / ml に調整し、この細胞浮遊液を 96 穴平底プレート (Falcon) に各穴 100 μ l 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 μ l ずつ加え、96 時間培養した。培養後、PBS に溶解し 5 mg/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 μ l ずつ加えて 4 時間培養し、96 穴平底プレートを毎分 2,000 回転で 10 分間遠心した後、上清を注意深く吸引し、DMSO を各穴 200 μ l ずつ加えて 4 時間培養し、96 穴平底プレートを 5 分間振盪した。各穴の吸光度を、自動吸光度計 EAR 340AT (SLT, Vienna, Austria) を用いて測定波長 560 nm, 対照波長 660 nm で測定した。細胞浮遊液と培養液を加えた 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。細胞生存率曲線を描き、幾何学的に 50% 増殖抑制濃度 (IC₅₀) を求め薬剤感受性の指標とした。感受性試験は、異なる日に最低 3 回行い、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) を、耐性株の IC₅₀ を親株の IC₅₀ で除した値として求めた。

V. 細胞内薬剤代謝系因子の測定

1. 細胞内 DTD 活性, GSH 含量および GST 活性の測定

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、検体とした。

細胞内 DTD 活性は Ernster ら³⁰ の方法に変更を加えた Benson ら³¹ の方法によって測定した。25 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) を 500 μ l 加えて超音波破碎装置 Sonifer 250 (Branson, Danbury, USA) を用いて細胞を破壊し、4°C, 毎分 14,000 回転で 15 分間冷却遠心して上清を採取した。25 mM トリス塩酸緩

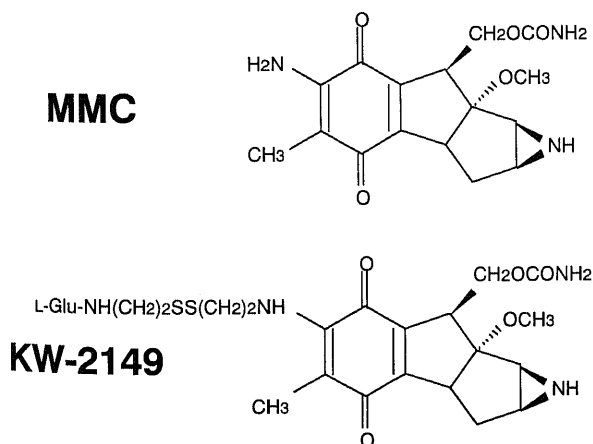


Fig. 1. Structures of mitomycin C and its analogue KW-2149.

衝液 (pH 7.4), 0.07% ウシ血清アルブミン, 0.01% ツイーン 20, 0.2 mM NADPH, 5 μ M フラビンアデニンジヌクレオチドを混じた反応液内に, 10ないし100 μ lの上清を加え, 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 μ M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 μ MのDIC存在下と非存在下で行い, その差を求め, 酵素活性を算出した。

細胞内GSH含量はGriffithら³²⁾の方法に準じて測定した。検体にリン酸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 μ l加えて超音波破碎した。これに5-スルフォサリチル酸12%溶液を加えて攪拌した後, 室温で3時間放置し, 4°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 μ l, 6 mM 5,5'-ジチオ-ビス-2-ニトロベンゼン酸溶液100 μ l, 上清100 μ l, 500 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.5) 100 μ l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³³⁾の方法により測定した。検体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°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, 時間当たりの340 nmでの吸光度変化を測定した。DTD活性, GSH含量, GST活性はいずれも単位蛋白量当たり換算した。

2. DIC, プチオニンスルフォキサミン (D,L-buthionine-S-sulfoximine, BSO), エタクリン酸 (ethacrynic acid, EA) による薬剤感受性の変化の検討

Shibataら²⁵⁾の方法に従って, DTDに対し特異性の高い阻害作用を示すDIC³⁴⁾が, PC-9およびPC-9/KWの薬剤感受性に与える影響をMTTを用いて検討した。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 μ lのDIC溶液または培養液を分注した。DICは0.5規定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 μ M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規定となるよう調整し, コントロールの穴にも同じ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倍濃度に調整した薬剤溶液を50 μ l加え, さらに単細胞浮遊液を100 μ l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。遠心して上清を除去した後, 各穴に200 μ lの培養液を加えてピペッティングを行い浮遊液とした。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, 前述の方法に従った。また, DICで処理した際のDTD活性は, DIC処理直後の細胞を検体として, 前述の方法に従って測定した。

GSH合成酵素阻害薬であるBSO¹⁰⁾を用いた実験も同様の方法で行った。BSOの最終濃度は, 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10 μ Mとなるように調整し, KW-2149と同時に培養した。薬剤接触時間は24時間とし, その後薬剤を含まない培養液で72時間培養し, 前述のMTT法にて感受性を検討した。

GST阻害薬であるEA¹⁰⁾を用いた実験も同様の方法で行っ

た。EAの最終濃度は, 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100 μ Mとなるように調整し, KW-2149と同時に24時間培養, その後薬剤を含まない培養液で72時間培養し, 以降の処理は前述の方法に従った。

VI. 細胞内KW-2149蓄積量の検討

対数増殖期にある 10^6 個の細胞を5 mlの培養液に浮遊させた。³H-KW-2149 (比放射活性12 Ci/mmol) を非放射性的KW-2149で希釈し, 最終濃度10 μ Mとなるように細胞浮遊液に加えた。2時間あるいは4時間, 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24時間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ACS IIシンチレーター (アマシャム・ジャパン, 東京) を10 ml加え, 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。

VII. DICによる細胞内KW-2149蓄積量の変化の検討

前述のごとく³H-KW-2149を非放射性的KW-2149で希釈し, 最終濃度10 μ Mとなるように細胞浮遊液に加え, さらにDICを最終濃度500 μ Mとなるように加えた。1時間培養し, それ以降の処理は, 前述の方法に従った。

VIII. P糖蛋白量, MRP蛋白量の検討

細胞膜上のP糖蛋白とMRP蛋白の量をウェスタンブロット法で検討した。まず, Almquistら³⁵⁾の方法に従って, 細胞を可溶性細胞膜に富む分画を抽出した。すなわち, 5×10^6 個の細胞を, 細胞可溶性緩衝液 (10 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4), 10 mM 塩化カリウム, 1.5 mM 塩化マグネシウム, 2 mM フェニールメチルスルホニルフロライド (phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF), 200 μ g/ml EDTA, 50 μ g/ml アンチパイン, 2 μ g/ml アプロチニン, 200 μ g/ml ベンザミジン, 0.5 μ g/ml ロイペプチン, 1 μ g/ml ペプスタチン, 25 μ g/ml RNase A, 50 μ g/ml DNase I) にて10分間処理した後, 超音波破碎した。4°C, 毎分3,500回転で15分間冷却遠心し, 上清を4°C, 毎分55,000回転で20分間冷却遠心した。沈査を緩衝液 (10 mM トリス塩酸緩衝液, pH 7.4), 125 mM スクロース, 2 mM PMSF, 200 μ g/ml EDTA, 50 μ g/ml アンチパイン, 2 μ g/ml アプロチニン, 200 μ g/ml ベンザミジン, 0.5 μ g/ml ロイペプチン, 1 μ g/ml ペプスタチン) にて懸濁し, 細胞膜に富む分画を得た。その後, 蛋白量として40 μ g相当を7.5% SDS-PAGEで電気泳動し, ポリビニリデンジフルオリド素材の転写膜 (第一化学薬品, 東京) に転写した。転写膜を5% 脱脂粉乳含有0.1% ツイーン 20添加100 mM トリス緩衝食塩水で24時間ブロッキングした後, 1,000倍に希釈したマウス抗P糖蛋白モノクローナル抗体C219 (Dako, Carpinteria, USA) あるいは100倍に希釈したマウス抗ヒトMRPモノクローナル抗体MRPm6 (Progen Biotechnik Gbmh, Heidelberg, Germany) と24時間反応させた。さらに1,500倍に希釈した西洋わさびペルオキシダーゼ標識マウスIgGグロブリン抗体 (アマシャム・ジャパン) を二次抗体として60分間反応させ, エンハンストケミルミネッセンス (アマシャム・ジャパン) 法によって抗原抗体複合体を検出した。

IX. 蛋白質濃度の定量

各検体の蛋白質濃度は, BCA蛋白定量キット (Pierce, Rockford, USA) を用いて測定した。

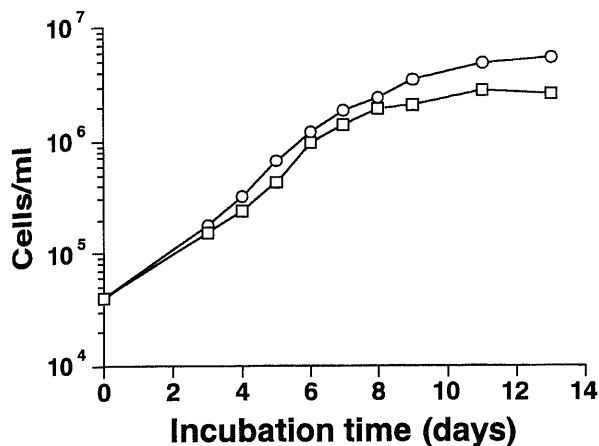


Fig. 2. Growth curve of PC-9 and PC-9/KW. The average cell counts of three flasks at each day were plotted. Points and bars indicate $\bar{x} \pm SD$. ○, PC-9; □, PC-9/KW.

X. 統計学的処理

実験結果は $\bar{x} \pm SD$ で表現し、比較検定には対応のない *t*-検定を用いた。DTD 活性と KW-2149 に対する感受性の関係については Pearson の相関係数を用いて検討した。 $p < 0.05$ を統計学的に有意と判断した。

成 績

I. 細胞倍加時間 (図2)

PC-9, PC-9/KW とも、少なくとも培養開始6日後までは対数増殖期にあった。細胞倍加時間は、PC-9が25.8時間、PC-9/KWが27.3時間であり、増殖速度に有意差はなかった。

II. 薬剤感受性 (表1)

KW-2149のPC-9に対する IC_{50} は $0.11 \pm 0.05 \mu M$ であったのに対し、PC-9/KWに対する IC_{50} は $1.0 \pm 0.2 \mu M$ であり、相対耐性度は9.1倍であった (図3A)。この耐性度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。MMC に対してはPC-9/KWの相対耐性度は8.7倍であり、ほぼ完全な交差耐性を示した (図3B)。新規インドロキノン系化合物EO9に

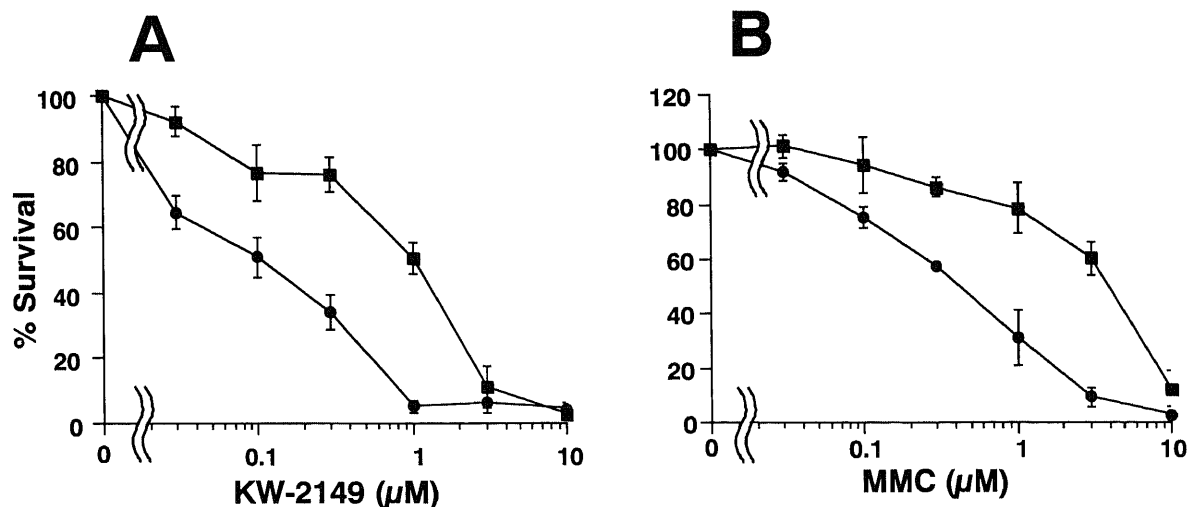


Fig. 3. Growth inhibition curve of PC-9 and PC-9/KW by 96 hr exposure to KW-2149 (A) and MMC (B). Surviving fractions were determined by MTT assay as described in Materials and Methods. Points and bars indicate $\bar{x} \pm SD$ of at least three independent triplicate experiments. ●, PC-9; ■, PC-9/KW.

Table 1. Sensitivities to various anticancer agents of PC-9 and PC-9/KW

Drugst	IC_{50} values (μM) ^{a)}		RR ^{c)}
	PC-9	PC-9/KW	
KW-2149	0.11 ± 0.05 ^{b)}	1.0 ± 0.2 *	9.1
MMC	0.40 ± 0.21	3.5 ± 1.0 *	8.8
EO9	0.10 ± 0.04	0.31 ± 0.14 *	3.1
Etoposide	18 ± 9	150 ± 60 *	8.3
Adriamycin	0.47 ± 0.29	0.99 ± 0.32 *	2.1
Cisplatin	4.3 ± 2.2	11 ± 5 *	2.6
SN-38	0.024 ± 0.012	0.13 ± 0.02 *	5.4

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

b) Each value is $\bar{x} \pm SD$ 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 value of PC-9.

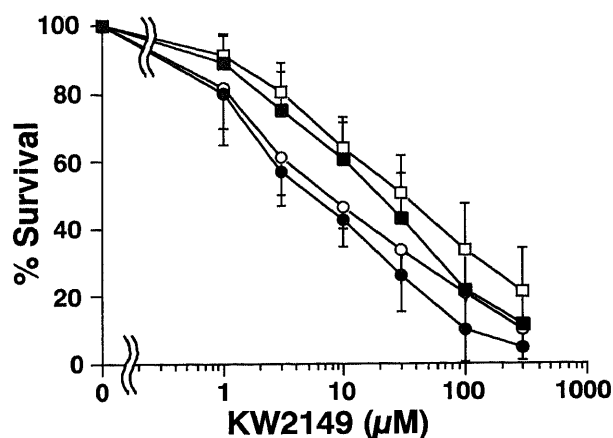


Fig. 4. Effects of dicumarol (DIC) treatment on the sensitivities to KW-2149. PC-9 (○, ●) and PC-9/KW (□, ■) were exposed to KW-2149 for 1 hr with (●, ■) or without (○, □) 500 μ M DIC and growth inhibition was measured by MTT assay following 96-hr incubation. Points and bars indicate $\bar{x} \pm$ SD of at least three independent duplicate experiments.

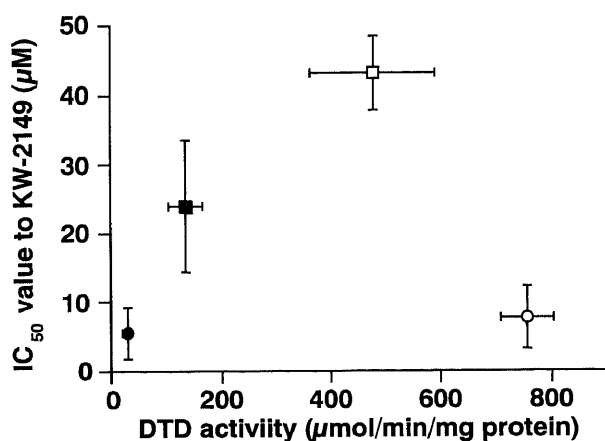


Fig. 5. Relationship between DT-diaphorase (DTD) activities and IC_{50} values to KW-2149. PC-9 (○, ●) and PC-9/KW (□, ■) were exposed to KW-2149 for 1 hr with (●, ■) or without (○, □) 500 μ M dicumarol. Points and bars indicate $\bar{x} \pm$ SD of at least three independent duplicate experiments.

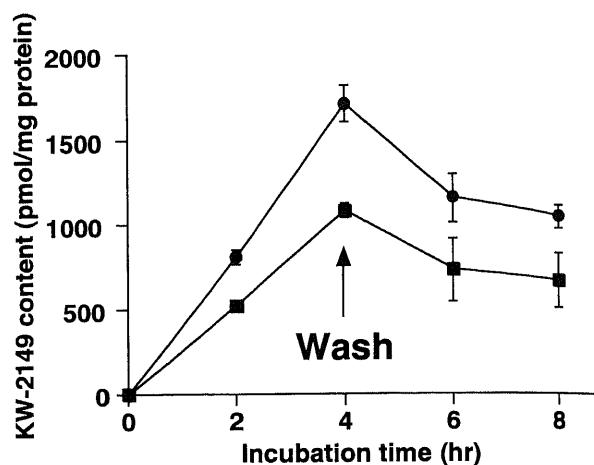


Fig. 6. Accumulation of KW-2149 in PC-9 and PC-9/KW. The cells of 5×10^6 in number were cultured with 10 μ M [3 H]-KW-2149 for the incubated time. Efflux was evaluated by washing the cells with resuspending and incubating the cells in drug-free medium for up to 4 hr after addition of the drug. The radioactivity of the cells was measured and $\bar{x} \pm$ SD of three determinations was shown. ●, PC-9; ■, PC-9/KW.

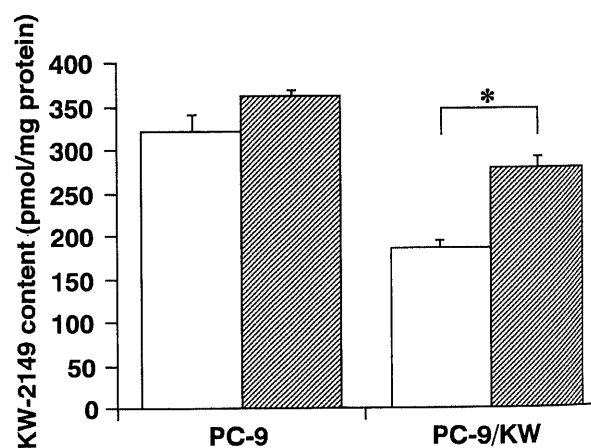


Fig. 7. Effects of dicumarol (DIC) treatment on the accumulation of KW-2149 in PC-9 and PC-9/KW. PC-9 and PC-9/KW were exposed to 10 μ M [3 H]-KW-2149 for 1 hr with (▨) or without (□) 500 μ M DIC. Columns and bars indicate $\bar{x} \pm$ SD of four determinations. * $p < 0.05$ in comparison with control.

Table 2. DT-diaphorase activities, glutathione contents and glutathione-S-transferase activities of PC-9 and PC-9/KW

Cell line	DTD activity (nmol/min/mg protein)	Glutathione content (nmol/mg protein)	Glutathione-S-transferase activity (nmol/min/mg protein)
PC-9	759 \pm 48 ^{a)}	23.9 \pm 4.8 ^{b)}	239 \pm 49 ^{b)}
PC-9/KW	478 \pm 114*	47.4 \pm 4.1*	142 \pm 13*

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

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

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

対しては、相対耐性度3.1倍と交差耐性を示した。エトポシド、アドリアマイシン、シスプラチン、SN-38に対してもそれぞれ交差耐性を認めた。

Ⅲ. 細胞内薬剤代謝系因子の検討

1. 細胞内 DTD 活性, GSH 含量および GST 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した細胞内 DTD 活性は、PC-9 の 759 ± 48 nmol/分/mg 蛋白に対し、PC-9/KW では 478 ± 114 nmol/分/mg 蛋白と有意に低下していた。GSH 含量は、PC-9 の 23.9 ± 4.8 nmol/mg 蛋白に対

し PC-9/KW では 47.4 ± 4.1 nmol/mg 蛋白と有意に増加していた。GST 活性は、PC-9 の 239 ± 49 nmol/分/mg 蛋白に対し、PC-9/KW では 142 ± 13 nmol/分/mg 蛋白と有意に低下していた。

2. DIC, BSO, EA による薬剤感受性の変化

薬剤暴露時間を1時間とした場合、PC-9 および PC-9/KW に対する KW-2149 の IC_{50} は各々 7.6 ± 4.6 μ M, 43 ± 5 μ M であり、この条件下では PC-9/KW の相対耐性度は 5.7 倍であった。500 μ M の DIC 存在下では、PC-9/KW の KW-2149 に対する感受性は、 IC_{50} で 24 ± 10 μ M まで低下し、有意な感受性の亢進が認められたが、PC-9 では有意な変化は認められなかった (図4, 表3)。DIC 処理により両細胞株とも DTD 活性は低下したが、DTD 活性と KW-2149 に対する感受性には相関は認められなかった (図5)。

BSO 処理では、両細胞株とも KW-2149 に対する感受性に変化はなかった (表3)。EA 処理でも、両細胞株とも KW-2149 に対する感受性に変化はなかった (表3)。

Ⅳ. 細胞内 KW-2149 蓄積量 (図6)

細胞内の KW-2149 量は、4 時間後には PC-9/KW で PC-9 の 63% に低下しており有意差を認めた。また、薬剤の排出速度には両細胞株間に明らかな差を認めなかった。

Ⅴ. DIC による細胞内 KW-2149 蓄積量の変化 (図7)

500 μ M の DIC 存在下では、1 時間後の細胞内の KW-2149 量は、PC-9/KW では有意に 56% 増加したが、PC-9 では有意な変化は認められなかった。

Ⅵ. P 糖蛋白量, MRP 蛋白量

ウェスタンブロット法で、P 糖蛋白が高発現している K562/A では約 170 kDa の位置に抗 P 糖蛋白抗体と反応するバン

Table 3. Effects of dicumarol (DIC), D, L-buthionine-S,R-sulfoximine (BSO) and ethacrynic acid (EA) treatment on the sensitivities to KW-2149 of PC-9 and PC-9/KW

Treatment	IC_{50} values to KW-2149 (μ M) ^{a)}	
	PC-9	PC-9/KW
Control	7.6 ± 4.6 ^{b)}	43 ± 5
DIC ^{c)}	5.6 ± 3.8	24 ± 10 *
Control	0.28 ± 0.11	1.2 ± 0.2
BSO ^{d)}	0.22 ± 0.13	1.2 ± 0.2
Control	0.18 ± 0.03	1.1 ± 0.2
EA ^{e)}	0.13 ± 0.02	1.0 ± 0.2

a) Drug concentration that inhibits cell growth by 50% by KW-2149 exposure.

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

c) Treatment with 500 μ M of DIC for 1 hr.

d) Treatment with 10 μ M of BSO for 24 hr.

e) Treatment with 100 μ M of EA for 24 hr.

* $p < 0.05$ as compared to the value of control.

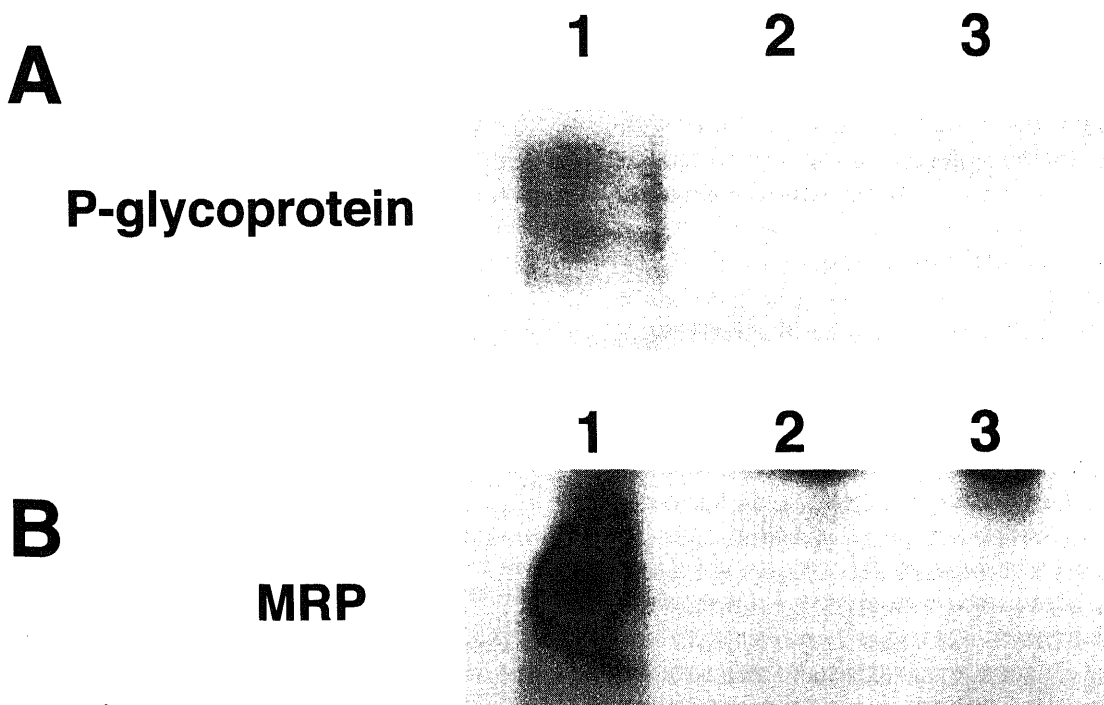


Fig. 8. Western blot analysis of P-glycoprotein content (A) and MRP content (B) of membrane rich cell sonicates. An amount of 40 μ g of protein was loaded onto each lane. (A) K562/A (lane 1), PC-9 (lane 2) and PC-9/KW (lane 3) cells. (B) HL60/ADR (lane 1), PC-9 (lane 2) and PC-9/KW (lane 3) cells.

ドを確認できたが、PC-9およびPC-9/KWでは認められなかった(図8A)。また、MRPが高発現しているHL60/ADRでは約190 kDaの位置に抗MRP抗体と反応するバンドを確認できたが、PC-9およびPC-9/KWでは認められなかった(図8B)。

考 察

今回著者は、非小細胞肺癌のKW-2149に対する獲得耐性機構を検討する目的で、非小細胞肺癌株をKW-2149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、癌細胞株から樹立されたKW-2149耐性株は、著者が調べ得た限り報告されていない。他剤に対する感受性の検討では、MMCおよびMMCと共通した生体内活性化機構を有するEO9³⁰⁾にそれぞれ交差耐性を示した。既存の抗癌薬であるエトポシド、アドリアマイシン、シスプラチンばかりでなく、DNAトポイソメラーゼI阻害薬イリノテカンの活性化代謝産物であるSN-38³⁷⁾に対しても交差耐性を示した。すなわち著者が樹立したKW-2149耐性株PC-9/KWは多剤耐性を呈した。

MMCの活性化には細胞内のDTDによる二電子還元経路が重要とされている¹⁾⁻⁵⁾²²⁾²⁵⁾。KW-2149はMMCの誘導体ではあるが、活性化のメカニズムはMMCと異なることが報告されている²²⁾²⁵⁾。本研究でも、PC-9/KWではDTD活性は低下していたものの、DIC処理によってPC-9/KWのKW-2149に対する感受性はむしろ亢進し、DTDのKW-2149の活性化への関与は否定的である。

細胞内薬剤代謝系因子であるGST、GSHはシスプラチンや各種アルキル化剤に対する耐性に関与しており、MMC耐性にもこれら細胞内薬剤代謝機構の関与を示唆する報告がある¹¹⁾⁻¹³⁾¹⁶⁾。KW-2149に関しては、Ishidaら¹³⁾は細胞内GSH含量はKW-2149に対する感受性にほとんど影響を与えないとしており、また、Leeら²²⁾はヒト大腸癌細胞株HT-29においてGSHとシステインの投与がKW-2149に対する感受性を増強することを示したものの、BSOによりGSHを枯渇させてもKW-2149に対する感受性に変化はなかったと報告している。今回の研究では、PC-9/KWはPC-9に比べてGSH含量は有意に増加していたが、GST活性は有意に低下していた。しかしBSOやEA処理では両細胞株に感受性の変化がなく、GSTやGSHの耐性機構への関与は否定された。

本研究では、PC-9/KWは多剤耐性を示し、KW-2149に対する耐性機構として細胞内蓄積の減少が示された。一般に多剤耐性機構として、薬物排出ポンプであるP糖蛋白³⁰⁾やMRP³⁰⁾などがよく知られている。しかしPC-9/KWでは、薬物の排出速度に明らかな差がみられなかった点、ウェスタンブロット法でP糖蛋白やMRPが検出されなかった点から、P糖蛋白やMRPの関与は否定的である。KW-2149が細胞膜をどのような機構を介して通過するかは不明であるが、PC-9/KWではKW-2149の細胞内への取り込みが低下しているものと考えられる。

前述したように、PC-9/KWではDTD活性が低下していたが、DIC処理によってPC-9/KWのKW-2149耐性が部分的に解除された。一方、DTD活性とKW-2149感受性には相関が認められなかった。そこでDIC処理によるKW-2149の細胞内蓄積の変化を検討したところ、PC-9/KWにおいてKW-2149細胞内蓄積はDIC処理によって有意に1.6倍に増加した。つまり、DICはDTDと無関係にKW-2149の細胞内蓄積を促進している可能性が示唆された。PC-9/KWの耐性機構はKW-2149の細胞内への

取り込みが低下している点にあり、その取り込みの低下の一部はDICによって解除されるものと考えられる。

Keyesら⁴⁰⁾は、マウス乳癌細胞株において、DICがMMC誘導体ポルフィロマイシンの細胞外への排出を促進したが、細胞内への取り込みには影響を与えなかったと報告している。またMarshallら⁴¹⁾は、ヒト皮膚線維芽細胞株において、通常酸素下ではDICがポルフィロマイシンの細胞内への取り込みを減少させたが、低酸素下では増加させたと報告している。彼らは、DICが呼吸鎖や細胞内のカルシウム濃度に影響を与えることによる効果ではないかと推測しているが、詳細は不明である。DICが薬物の細胞内蓄積に影響を与えるという報告は、以上の2つしかなく、DICが耐性克服に関与するという報告は今までにない。KW-2149の細胞内への取り込み機構とともに、DICの作用機序についても今後のさらなる検討が必要である。

肺癌化学療法においては、何回かの治療後、もしくは治療途中から癌細胞が増殖することはしばしば経験され、この耐性獲得機構が肺癌化学療法の最大の障害であるといっても過言ではない。KW-2149は現在のところ臨床試験中の薬剤ではあるが、肺癌化学療法に有望な薬剤であり、今回樹立した耐性株は、KW-2149の耐性獲得機構の解析を通して、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

KW-2149耐性非小細胞肺癌株を樹立し、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/KWは親株PC-9に比べ、KW-2149に対して9.1倍の耐性を示した。
2. PC-9/KWはMMC、EO9、シスプラチン、エトポシド、アドリアマイシン、SN-38に交差耐性を示した。
3. PC-9/KWではDTD活性が有意に低下していたが、KW-2149に対する耐性はDICにより部分的に解除された。
4. PC-9/KWではGSH含量が有意に増加し、GST活性が有意に低下していたが、BSO、EA処理にて感受性に変化は認められなかった。
5. PC-9/KWではKW-2149の細胞内蓄積の有意な低下がみられたが、P糖蛋白、MRPの発現は認められなかった。
6. PC-9/KWではKW-2149の細胞内蓄積は、DICにより1.6倍と有意に増加した。
7. 本研究で樹立したKW-2149耐性株における耐性機序の一つは、薬物の細胞内蓄積量の低下であり、これはDICによって部分的に解除されることが示された。

謝 辞

稿を終るにあたり、当研究の御指導、御校閲を賜りました恩師松田保教授に深甚なる感謝の意を表します。また、研究中、常に御助言、御指導いただきました金沢大学医学部内科学第三講座藤村政樹講師、ならびに同附属病院第三内科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心より感謝いたします。さらに、薬剤を御提供いただいた協和発酵工業の井上謙吾博士に感謝いたします。

なお、本研究の内容は、第8回世界肺癌会議(ダブリン、1997年8月)、第38回日本肺癌学会総会(仙台、1997年11月)、第38回日本呼吸器学会総会(熊本、1998年3月)において発表した。

文 献

- 1) Siegel D, Gibson NW, Preusch PC, Ross D. Metabolism of mitomycin C by DT-diaphorase: Role in mitomycin-induced DNA

- damage and cytotoxicity in human colon carcinoma cells. *Cancer Res* 50: 7483-7489, 1990
- 2) 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
 - 3) 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
 - 4) Mikami K, Naito M, Tomida A, Yamada M, Sirakusa T, Tsuruo T. DT-diaphorase as a critical determinant of sensitivity to mitomycin C in human colon and gastric carcinoma cell lines. *Cancer Res* 56: 2823-2826, 1996
 - 5) 三上公治, 白日高歩, 鶴尾 隆. DT-diaphorase. *癌と化学療法* 24: 1606-1616, 1997
 - 6) 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
 - 7) Bligh HFJ, Bartozek A, Robson CN, Hickson ID, Kasper CB, Beggs JD, Wolf CR. Activation of mitomycin C by NADPH: cytochrome P-450 reductase. *Cancer Res* 50: 7789-7792, 1990
 - 8) 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
 - 9) Hodnick WF, Sartorelli AC. Reductive activation of mitomycin C by NADH: cytochrome b5 reductase. *Cancer Res* 53: 4907-4912, 1993
 - 10) Xu BH, Singh SV. Effect of buthionine sulfoximine and ethacrynic acid on cytotoxic activity of mitomycin C analogues BMY25282 and BMY25067. *Cancer Res* 52: 6666-6670, 1992
 - 11) Singh SV, Xu BH, Maurya AK, Mian AM. Modulation of mitomycin C resistance by glutathione transferase inhibitor ethacrynic acid. *Biochem Biophys Acta* 1137: 257-263, 1992
 - 12) Xu BH, Gupta V, Singh SV. Characterization of a human bladder cancer cell line selected for resistance to mitomycin C. *Int J Cancer* 58: 686-692, 1994
 - 13) Ishida T, Nishio K, Kurokawa H, Arioka H, Fukumoto H, Fukuoka K, Nomoto T, Yokote H, Hasegawa S, Saijyo N. Circumvention of glutathione-mediated mitomycin C resistance by a novel mitomycin C analogue, KW-2149. *Int J Cancer* 72: 865-870, 1997
 - 14) Kono M, Saitoh Y, Kasai M, Sato A, Shirahata K, Morimoto M, Ashizawa T. Synthesis and antitumor activity of a novel water soluble mitomycin analog; 7-N-[2-[[2-(γ -L-glutamylamino)ethyl]dithio]ethyl]mitomycin C. *Chem Pharm Bull* 37: 1128-1130, 1989
 - 15) Kubota T, Inada T, Inoue S, Kuzuoka M, Arisawa Y, Suto A, Kodaira S, Ishibiki K, Abe O. Antitumor activity of 7-N-(2-[[2-(γ -L-glutamylamino)ethyl]dithio]ethyl)mitomycin C (KW-2149) against human tumor xenografts serially transplanted into nude mice. *Jpn J Clin Oncol* 19: 216-221, 1989
 - 16) Tsuruo T, Sudo Y, Asami N, Inaba M, Morimoto M. Antitumor activity of derivative of mitomycin, 7-N-[2-[[2-(γ -L-glutamylamino)ethyl]dithio]ethyl]mitomycin C (KW-2149), against murine and human tumors and a mitomycin C-resistant tumor in vitro and in vivo. *Cancer Chemother Pharmacol* 27: 89-93, 1990
 - 17) Morimoto M, Ashizawa T, Ohno H, Azuma M, Kobayashi E, Okabe M, Gomi K, Kono M, Saitoh Y, Kanda Y, Arai H, Sato A, Kasai M, Tsuruo T. Antitumor activity of 7-N-[[2-[[2-(γ -L-glutamylamino)ethyl]dithio]ethyl]mitomycin C. *Cancer Res* 51: 110-115, 1991
 - 18) Ohe Y, Nakagawa K, Fujiwara Y, Sasaki Y, Minato K, Bungo M, Niimi S, Horichi N, Fukuda M, Saijo N. In vitro evaluation of the new anticancer agents KT6149, MX-2, SM5887, Menogaril, and Liblomycin using cisplatin- or adriamycin-resistant human cancer cell lines. *Cancer Res* 49: 4098-4102, 1989
 - 19) Kobayashi E, Okabe M, Kono M, Arai H, Kasai M, Gomi K, Lee JH, Inaba M, Tsuruo T. Comparison of uptake of mitomycin C and KW-2149 by murine P388 leukemia cells sensitive or resistant to mitomycin C. *Cancer Chemother Pharmacol* 32: 20-24, 1993
 - 20) Dirix L, Gheuens EEO, van der Heyden S, van Oosterom AT, De Bruijn EA. Cytotoxic activity of 7-N-(2-[[2-(γ -L-glutamylamino)ethyl]dithio]ethyl)-mitomycin C and metabolites in cell lines with different resistance patterns. *Anticancer Drugs* 5: 343-354, 1994
 - 21) Dirix L, Catimel G, Verdonk R, de Bruijn E. Phase I and pharmacokinetic study of KW-2149 given by 24 hour continuous infusion. *Invest New Drugs* 13, 133-136, 1995
 - 22) Lee JH, 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
 - 23) Ashizawa T, Okabe M, Gomi K, Hirata T. Reduced bone marrow toxicity of KW-2149, a mitomycin C derivative, in mice. *Anticancer Drugs* 4: 181-188, 1993
 - 24) Saijo N. New chemotherapeutic agents for the treatment of non-small cell lung cancer: The Japanese experience. *Chest* 113: 17S-23S, 1998
 - 25) Shibata K, Kasahara K, Bando T, Nakatsumi Y, Fujimura M, Tsuruo T, Matsuda T. Establishment and characterization of non-small cell lung cancer cell lines resistant to mitomycin C under aerobic condition. *Jpn J Cancer Res* 86: 460-469, 1995
 - 26) Masters JRW, Know RJ, Hartley JA, Kelland LR, Hendriks HR, Connors T. KW-2149 (7-N-[2-[[γ -L-glutamylamino]ethyl]dithioethyl]mitomycin C): A new mitomycin C analogue activated by serum. *Biochem Pharmacol* 53: 279-285, 1997
 - 27) 彼谷裕康. 造血器腫瘍における抗腫瘍剤感受性試験の臨床応用に関する研究. *十全医会誌* 105: 506-517, 1996
 - 28) 和田英男. 多剤耐性関連蛋白を過剰発現する多剤耐性白血病細胞株の樹立とその性状の検討. *十全医会誌* 106: 2-12, 1997
 - 29) Mosmann T. Rapid calorimetric assay for cellular growth and survival: application of proliferation and cytotoxic assay. *J*

Immunol Methods 65: 55-63, 1983

- 30) Ernster L. DT diaphorase. *Methods Enzymol* 10: 309-317, 1967
- 31) Benson AM, Hunkeler MJ, Talalay P. Increase of a 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
- 32) Griffith OW. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal Biochem* 91: 1467-1477, 1980
- 33) Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferase. *J Biol Chem* 249: 7130-7139, 1974
- 34) Ernster L. DT diaphorase: A historical review. *Chem Scr* 27A: 1-13, 1987
- 35) Almquist KC, Loe DW, Hipfner DR, Mackie JE, Cole SPC, Deeley RG. Characterization of the Mr 190,000 multidrug resistance protein (MRP) in drug-selected and transfected tumor cells. *Cancer Res* 55: 102-110, 1995
- 36) 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

- 37) Kaneda N, Nagata H, Furuta T, Yokokura T. Metabolism and pharmacokinetics of the camptothecin analogue CPT-11 in the mouse. *Cancer Res* 50: 1715-1720, 1990
- 38) Ueda K, Cardarelli C, Gottesman MM, Pastan I. Expression of full-length cDNA for the human "MDR1" gene confers resistance to colchicine, doxorubicin, and vinblastine. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 3004-3008, 1987
- 39) Cole SPC, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC, Stewart AJ, Kurz EU, Duncan AMV, Deeley RG. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* 258: 1650-1654, 1992
- 40) Keyes SR, Rockwell S, Sartorelli AC. Modification of the metabolism and cytotoxicity of bio-reductive alkylating agents by dicumarol in aerobic hypoxic murine tumor cells. *Cancer Res* 49: 3310-3313, 1989
- 41) Marshall RS, Paterson MC, Rauth AM. Studies on the mechanism of resistance to mitomycin C and porfiromycin in a human cell strain derived from a cancer-prone individual. *Biochem Pharmacol* 41: 1351-1360, 1991

Establishment and Characterization of a Non-small Cell Lung Cancer Cell Line Resistant to 7-N-[2-[[2-(γ -L-glutamylamino)-ethyl]dithio]ethyl]-mitomycin C (KW-2149) Hiroki Shirasaki, Department of Internal Medicine (III), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — J. J. *Juzen Med Soc.*, **107**, 324 — 332 (1998)

Key words KW-2149, mitomycin C, dicumarol, non-small cell lung cancer, drug resistance

Abstract

7-N-[2-[[2-(γ -L-glutamylamino)-ethyl]dithio]ethyl]-mitomycin C (KW-2149) is a new derivative of mitomycin C (MMC). To elucidate the mechanism of acquired resistance to KW-2149 in non-small cell lung cancer (NSCLC), we established a KW-2149-resistant NSCLC subline by continuous exposure to KW-2149, using PC-9 as a parent cell line. The subline, PC-9/KW was about 9.1-fold more resistant to KW-2149 than its parent cell line at the IC_{50} value as determined by MTT assay. It exhibited cross-resistance to MMC, EO9, etoposide, adriamycin, cisplatin and SN-38. Cytosolic DT-diaphorase activities were significantly reduced to 478 ± 114 in PC-9/KW from 759 ± 48 nmol/min/mg protein in the parent PC-9, while addition of dicumarol resulted in significant decrease in the IC_{50} value of PC-9/KW to KW-2149. Although glutathione content was significantly increased and glutathione-S-transferase activities were significantly decreased in PC-9/KW, treatment with D,L-buthionine-S,R-sulfoximine or ethacrynic acid did not affect the sensitivity to KW-2149 in either PC-9 or PC-9/KW. Intracellular accumulation of KW-2149 was significantly reduced in the resistant subline to 63% of that in the parent cells, but both cell lines lacked P-glycoprotein or multidrug resistance-associated protein. Addition of dicumarol resulted in a significant increase in intracellular accumulation of KW-2149 in PC-9/KW. These results suggest that the decrease of intracellular accumulation of KW-2149 in the resistant subline may be a mechanism of resistance to KW-2149 in PC-9/KW, and that addition of dicumarol partially overcomes the resistance mechanism independently of DT-diaphorase.