新規 Xanthine 誘導体 MPBX による
Doxorubicin 制癌効果増強作用杉山朋美・佐塚泰之^{*1)}, 澤西啓之^{*2)}, 宮本謙一^{*3)}

Experimental cancer chemotherapy by combination of doxorubicin with MPBX, a novel xanthine derivative

We previously reported that 1-methyl-3-propyl-7-butylxanthine(MPBX), a novel xanthine derivative, enhanced the antitumor activity of doxorubicin(DOX) due to inhibition of the DOX efflux from tumor cells. In this study, we investigated the effects of MPBX not only on drug sensitive tumor but also on multidrug resistant or metastatic tumors with the aim of developing its clinical use.

In Ehrlich carcinoma bearing mice, MPBX enhanced antitumor activity of DOX 1.8-fold and increased the DOX concentration in the tumor 1.6-fold. Moreover, on multidrug resistant P388 leukemia(P388/DOX), DOX + MPBX significantly reduced the tumor weight to 48% of control level, whereas DOX alone did not reduce the tumor weight. MPBX increased the DOX influx into P388/DOX cells and inhibited the DOX efflux *in vitro*, supporting the increase in the DOX concentration in the tumor induced by MPBX *in vivo*. Furthermore, MPBX enhanced the therapeutic efficacy of pirarubicin, an anthracycline antibiotic, against metastatic M5076 sarcoma.

In conclusion, MPBX enhanced the antitumor activity of anthracycline agents on sensitive, multidrug resistant or metastatic tumors. Thus, we expected that MPBX would be used as a biochemical modulator in clinical cancer chemotherapy.

Tomomi Sugiyama・Yasuyuki Sadzuka^{*1)},

Hiroyuki Sawanishi^{*2)}, Ken-ichi Miyamoto^{*3)}

key words : xanthine derivative, doxorubicin, biochemical modulation

Biochemical modulation は制癌剤と併用薬を組み合わせる抗腫瘍効果の増大を図る癌化学療法の一手段であり¹⁾, 制癌剤として 5-fluorouracil を用いた薬物併用投与が臨床でも適用されている²⁾. しかし, 抗腫瘍効果増強がもたらされる反面で副作用の増大をも伴うため, 必ずしも治療係数の向上には至っていないのが現状である. このため, 抗腫瘍効果増大と副作用軽減の両方が可能な併用薬, modulator の開発が待たれる.

筆者らはこれまでに biochemical modulation の観点より, anthracycline 系制癌剤 doxorubicin (DOX) の効果増強物質として, caffeine をはじめとした methylxanthine 類の作用を検討してきた³⁻⁷⁾. caffeine は Ehrlich ascites carcinoma (Ehrlich) 細胞からの DOX の efflux を抑制して, 腫瘍中において特異的に DOX 濃度を維持することが明らかとなっており, この作用により *in vivo* において DOX の副作用増大を伴わずに抗腫瘍効果を増強することを確認している^{4,5)}. また, ほかの methylxanthine 類についても, *in vitro* での DOX efflux 抑制作用の確認された物質が *in vivo* で DOX の効果増強を示しており, *in vitro* において DOX efflux への作用を検討することが modulator のスクリーニング系として有用であることを明らかにしてきた⁷⁾. そこで, *in vitro* でのスクリーニング系を用いて, さらに有効な併用薬の開発を試みた. xanthine 側鎖を変化させた誘導体を合成し⁸⁾, 強い DOX efflux 抑制を示す 1-

^{*1)} Department of Pharmaceutical Engineering, School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka 静岡県立大学薬学部薬品製造工学教室

^{*2)} School of Pharmacy, Hokuriku University 北陸大学薬学部

^{*3)} Department of Pharmacology and Pharmaceutics, Kanazawa University 金沢大学薬学部
Offprint requests to : Yasuyuki Sadzuka Ph. D., Department of Pharmaceutical Engineering, School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, 52-1 Yada, Shizuoka 422-8526

図 1 Chemical structure of MPBX

methy1-3-propyl-7-butylxanthine(MPBX; 図1)を見出し, DOX 抗腫瘍効果に対する増強作用を検討してきた^{9,10)}. しかし, さらに臨床応用を目指すうえでは, より広範な腫瘍に対するMPBXの検討が不可欠である. そこで今回, 多剤耐性腫瘍および転移性腫瘍に対するMPBXの作用を検討し, 効果増強物質としての有用性について明らかにした.

材料と方法

(1) 試薬および腫瘍

DOX はアドリアシン® 注(注射用塩酸ドキソルビシン)10 mg(力価)/バイアルを協和発酵(株)より, pirarubicin(THP)はピノルビン® 注(注射用塩酸ピラルビシン)10 mg(力価)/バイアルを日本化薬(株)より購入した. RPMI 1640 培地は日水製薬(株)より購入した. MPBX は当研究室にて合成したものをを用いた⁹⁾.

M5076 ovarian sarcoma (M5076) は(財)癌研究会化学療法センターの田代田鶴子博士より分与していただいた.

(2) 動物

CDF₁およびBDF₁系雄性マウス(5週齢, 体重20~25 g)は, 日本SLC(株)より購入したものを使用した. 動物は, 室温25±1°C, 湿度55±5%にて飼育し, 標準飼料と水は自由に与えた.

(3) 抗腫瘍

Ehrlich をCDF₁マウスに, DOX 耐性P388 leukemia(P388/DOX)またはM5076をBDF₁マウ

スに, それぞれ5×10⁵ cells/animal 背部皮下に移植して固形腫瘍としたのち, 外寸より腫瘍重量を換算し¹¹⁾, 大きさの揃ったものを選出して実験に用いた. Ehrlichでは10日後, P388/DOXでは7日後, M5076では14日後より, DOX(2.0 mg/kg/day×4 days)とMPBX(10 mg/kg/day×4 days)を1日おきに8日間, 腹腔内投与した. また, THPはDOXと同投与量を同様のスケジュールにて投与した. 投与最終日の翌日にマウスを頸椎脱臼にて屠殺し, 固形腫瘍を摘出, 生理食塩水にて洗浄後, 腫瘍重量を測定した. また, 腫瘍中のDOX濃度を蛍光光度法(Ex: 470 nm, Em: 585 nm)により測定した.

(4) *In vitro*

P388/DOX細胞をRPMI 1640培地に, 5.0×10⁶cells/mlになるよう懸濁した. influx系実験においては, 細胞懸濁液にDOX 5.0 μg/mlとなるよう添加し, 37°Cにて60分間インキュベートした. efflux系実験においては, 細胞にDOX 5.0 μg/mlを添加し, 37°Cにて30分間プレインキュベートしたのち, 細胞洗浄後, 新しい培地に再懸濁し, MPBX, caffeineまたはverapamilをそれぞれ100 μM添加して, 37°Cにて180分間インキュベートし, その作用を検討した.

細胞内DOX濃度の測定は, 適時に細胞懸濁液を採取し, 150 g, 3分間遠心分離し, 上清を取り除き, リン酸緩衝液(pH 7.8)で2回洗浄したのち, 細胞を同緩衝液1.0 mlに再懸濁した. これにクロロホルム:メタノール(4:1)混液5.0 mlを加えて混和し, 1,200 g, 15分間遠心分離後, 下層の有機層を分取し, DOX濃度を分光蛍光光度計にて測定した.

結果

(1) EhrlichにおけるDOX抗腫瘍効果に対するMPBX併用効果

Ehrlich腫瘍重量と腫瘍中DOX濃度を図2に示す. controlの腫瘍重量(1.12 g)をDOXが67%にまで低下する一方, MPBX併用はさらに38%にまで低下し, 抗腫瘍効果はMPBX併用により1.8倍に増強された. 腫瘍中濃度はDOX単独に

図 2 Effects of MPBX on the change of the tumor weight(left)induced by DOX and the DOX concentration(right)in the tumor(Ehrlich)
Each column represents the mean $\pm$ SD for eight mice. Significant difference from the level in the DOX alone group is indicated by ^ap<0.001.

図 3 Effects of MPBX on the change of the tumor weight(left)induced by DOX and the DOX concentration(right)in the tumor(P388/DOX)
Each column represents the mean $\pm$ SD for eight mice. Significant differences from the level in the DOX alone group are indicated by ^ap<0.01 and ^bp<0.001.

くらべ、MPBX 併用では 1.6 倍に増加した。

(2) P388/DOX に対する MPBX の耐性克服作用

P388/DOX 腫瘍重量と腫瘍中 DOX 濃度を図 3 に示す。DOX 単独投与では、腫瘍重量の低下は認められなかったが、DOX と MPBX の併用により 48%まで有意に低下した。caffeine の併用でも有意な腫瘍重量の低下が認められた。腫瘍中の DOX 濃度は、MPBX の併用により 2.2 倍に上昇した。

(3) P388/DOX 細胞における DOX 輸送に対する MPBX の作用

P388/DOX 細胞での DOX の influx および efflux に対する MPBX の作用を図 4 に示す。MPBX は DOX influx を促進し、細胞内の DOX 濃度を上昇することが示された。また、MPBX は caffeine と同様に DOX efflux を抑制したが、その作用は P-glycoprotein を阻害する verapamil ほど強いものではなかった。

図 4 Effects of MPBX on the time course of the DOX concentration in P388/DOX cells

Each point represents the mean value for three independent experiments, each with duplicate data points with no more than 5% variation between them.

● : DOX, △ : DOX+MPBX, □ : DOX+caffeine, ○ : DOX+verapamil. Significant difference from the level in the DOX alone group is indicated by ^{a)}p<0.01.

(4) DOX 低感受性腫瘍 M5076 における THP 抗腫瘍効果に対する MPBX の増強作用

M5076 腫瘍重量を図 5 に示す。DOX 投与では、腫瘍重量の低下傾向は認められたが、有意ではなかった。一方、DOX と同投与量の THP では、腫瘍重量を 60% に低下した。これに対し、MPBX 併用により腫瘍重量はさらに低下し、THP の抗腫瘍効果が増強された。

考 察

Biochemical modulator としての有用性の増大が期待された MPBX による、DOX 抗腫瘍効果に対する増強作用について基礎的検討を行った。

はじめに、*in vitro* でのスクリーニング系にも用いた薬剤感受性腫瘍の Ehrlich において、DOX と MPBX との併用投与を行ったところ、MPBX は DOX 単独投与にくらべて、その抗腫瘍効果を 1.8 倍と有意に増強した。これは、腫瘍中の DOX 濃度の上昇に裏付けられる結果であった。しかし、Ehrlich は DOX に感受性を示す腫瘍であり、DOX 単独投与によっても腫瘍増殖の抑制が得られている。臨床治療においては、制癌剤による治療が有効な腫瘍ばかりではなく、薬剤耐性腫瘍や転移性の腫瘍などが問題となっている^{12,13)}。そこ

で、MPBX の有用性を広げるために、制癌剤での治療が難しい多剤耐性腫瘍に対して検討を加えた。P388/DOX は P-glycoprotein を高発現しており、DOX を含め多種制癌剤に対して耐性を示す腫瘍である。この薬剤耐性腫瘍に対して DOX と MPBX の併用投与を試み、その効果について caffeine と比較を行った。

P388/DOX 担癌マウスにおいて、DOX 単独では腫瘍重量の低下がまったく認められなかった投与量において、DOX+MPBX では control の 48% まで有意に腫瘍を縮小させ、有効な治療効果が得られた。このとき、腫瘍中の DOX 濃度は 2 倍に上昇しており、MPBX により DOX が抗腫瘍効果を発揮するのに必要な腫瘍中濃度に達したものと考えられる。したがって、MPBX は多剤耐性腫瘍においても DOX の効果増強薬として用いることが可能であり、さらに DOX の治療範囲の拡大にも有効であることが期待された。また、MPBX の効果増強作用は caffeine よりも強いものであり、新規の modulator として有望である可能性が示唆された。

一方、*in vitro* での P388/DOX 細胞における DOX 輸送に対する MPBX の作用を調べたところ、MPBX は細胞への DOX 取り込みを促進して

図 5 Effect of MPBX on the change of the tumor weight(M5076)induced by THP and comparison with DOX

Each column represents the mean $\pm$ SD for eight mice. Significant differences from the level in the THP alone group are indicated by ^{a)} $p < 0.01$ and ^{b)} $p < 0.001$.

おり、また細胞からの DOX 排出を抑制したことから、MPBX により腫瘍細胞内の DOX 濃度を高めることが耐性腫瘍でも確認された。MPBX は、薬剤感受性腫瘍である Ehrlich 細胞および DOX 感受性 P388 細胞でも同様の作用を確認していることから^{9,10)}、感受性腫瘍および耐性腫瘍に共通の DOX 輸送系に関与しているものと推察された。また、*in vitro* での MPBX の作用は caffeine より強かったが、P-glycoprotein 阻害剤である verapamil^{12,14)} の作用ほど顕著ではなく、P-glycoprotein をほとんど発現していない Ehrlich でも作用していたことより、MPBX が P-glycoprotein を含め多剤耐性に関わる輸送系へ作用することは否定できると思われた。

一般に、薬剤耐性に関与する薬物輸送ポンプである P-glycoprotein や MRP などの阻害剤は、多剤耐性の克服に有効とされているが^{12,14)}、正常組織に対する阻害剤の作用が問題となり、制癌剤の副作用増大を伴うため、臨床応用は困難であるのが現状である。また、このような薬剤を制癌剤と併用した場合に治療効果の増強が期待できるのは、このような薬物輸送ポンプの高発現している耐性腫瘍に対してのみである。この点からも、MPBX は薬剤感受性および耐性腫瘍の両方において、DOX の抗腫瘍効果を増強できる適応範囲

の広い modulator であることが示唆された。また、MPBX は、methylxanthine 本来の作用としての気管支や心臓への作用が、ほかの誘導体にくらべて弱いことも明らかになっており^{8,15,16)}、modulator として制癌剤と併用した場合の modulator 自身の副作用発現も少ないと考えられる。さらに、DOX に特有の心毒性に対して MPBX 併用は軽減する傾向が認められており⁹⁾、DOX との併用治療は抗腫瘍効果増強と副作用軽減の両面から評価して、より有用であると期待される。

つぎに、MPBX の適応範囲の拡大を試みるにあたり、卵巣肉腫であり転移性を示す M5076 腫瘍に対して検討を加えた。M5076 は Ehrlich にくらべ DOX 低感受性であることを確認しており^{17,18)}、また固形腫瘍としてマウスに移植した場合に、肝臓や肺へ転移する腫瘍である¹⁹⁾。M5076 での検討は、多種類の腫瘍における MPBX の作用とともに、転移性腫瘍に対する作用を予測するのに不可欠であると考えた。そこで、DOX と同じ anthracycline 系制癌剤であり、適応腫瘍として卵巣癌を含む THP²⁰⁾を用いて MPBX との併用を試みた。その結果、THP は DOX にくらべて有意に腫瘍重量を低下し、MPBX 併用によりさらに有効な治療効果が得られた。これは、MPBX がほかの anthracycline 系制癌剤の効果を増強することを

示唆するものであり、また DOX 以外の制癌剤に対しても併用可能であることが期待された。

以上より、MPBX: 1-methyl-3-propyl-7-butyloxanthine は薬剤感受性腫瘍のみならず、多剤耐性腫瘍および転移性腫瘍においても制癌剤の効果増強作用を示す、新規の biochemical modulator として有効であることが明らかとなった。したがって、MPBX の作用についてさらに検討を加えることにより臨床応用が期待される。

本研究の実施にあたり、終始ご協力いただきました小俣菊代学士(薬学)に感謝致します。

文 献

- 1) Konishi T, Dezuki Y: Biochemical modulation. CRC. 1: 88-97, 1992.
- 2) Bertino JR, Sawicki WL, Lindquist CA, Gupta VS: Schedule dependent antitumor effects of methotrexate and 5-fluorouracil. Cancer Res. 37: 327-328, 1977.
- 3) Sadzuka Y, Mochizuki E, Takino Y: Caffeine modulates the antitumor activity and toxic side effects of adriamycin. Jpn. J. Cancer Res. 84: 348-353, 1993.
- 4) Sadzuka Y, Iwazaki A, Miyagishima A, Nozawa Y, Hirota S: Effect of drugs on intracellular concentration of adriamycin in Ehrlich ascites carcinoma. D D S 9: 161-166, 1994.
- 5) Sadzuka Y, Mochizuki E, Takino Y: Mechanism of caffeine modulation of the antitumor activity of adriamycin. Toxicol. Lett. 75: 35-49, 1995.
- 6) Sadzuka Y, Mochizuki E, Iwazaki A, Hirota S, Takino Y: Caffeine enhances adriamycin antitumor activity in Ehrlich ascites carcinoma-bearing mice. Biol. Pharm. Bull. 18: 156-161, 1995.
- 7) Sadzuka Y, Iwazaki A, Miyagishima A, Nozawa Y, Hirota S: Effect of methylxanthine derivatives on adriamycin concentration and antitumor activity. Jpn. J. Cancer Res. 86: 594-599, 1995.
- 8) Sakai R, Konno K, Yamamoto Y, Sanae F, Takagi K et al.: Effects of alkyl substitutions of xanthine skeleton on bronchodilation. J. Med. Chem. 35: 4039-4044, 1992.
- 9) Sadzuka Y, Iwazaki A, Sugiyama T, Sawahishi T, Miyamoto K: 1-Methyl-3-propyl-7-butyloxanthine, a novel biochemical modulator, enhances therapeutic efficacy of adriamycin. Jpn. J. Cancer Res. 89: 228-233, 1998.
- 10) Sadzuka Y, Sugiyama T, Sawahishi H, Miyamoto K: Enhanced efficacy of 1-methyl-3-propyl-7-butyloxanthine on the antitumor activity of doxorubicin against doxorubicin resistant P388 leukemia. Cancer Lett. (in press).
- 11) Zou Y, Ling YH, Van NT, Priebe W, Peres-Soler R: Antitumor activity of free and liposome-entrapped ennamycin, a lipophilic anthracycline antibiotic with non-cross-resistance properties. Cancer Res. 54: 1479-1484, 1994.
- 12) Simon SM, Schindlert M: Cell biological mechanisms of multidrug resistance in tumors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 3497-3504, 1994.
- 13) Rieger PT: Emerging strategies in the management of cancer. Oncol. Nurs. Forum 24: 728-737, 1997.
- 14) Tsuruo T, Lioa H, Tsukagoshi S, Sakurai Y: Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia *in vivo* and *in vitro* through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. Cancer Res. 41: 1967-1972, 1981.
- 15) Miyamoto K, Kurita M, Ohmae S, Sakai R, Sanae F, Takagi K: Selective tracheal relaxation and phosphodiesterase-IV inhibition by xanthine derivatives. Eur. J. Pharmacol. 267: 317-322, 1994.
- 16) Miyamoto K, Sakai R, Kurita M, Ohmae S, Sanae F et al.: Effects of alkyl substituents of xanthine on phosphodiesterase isoenzymes. Biol. Pharm. Bull. 18: 431-434, 1995.
- 17) Sugiyama T, Sadzuka Y, Miyagishima A, Nozawa Y, Nagasawa K et al.: Membrane transport on tumor cell and antitumor activity of doxorubicin and pirarubicin. D D S 13: 35-40, 1998.
- 18) Sugiyama T, Sadzuka Y: Enhancing effects of green tea components on the antitumor activity of adriamycin against M5076 ovarian sarcoma. Cancer Lett. 133: 19-26, 1998.
- 19) Hart IR, Talmadge JE, Fidler IJ: Metastatic behavior of a murine reticulum cell sarcoma exhibiting organ-specific growth. Cancer Res. 41: 1281-1287, 1981.
- 20) Umezawa H, Takahashi Y, Kinoshita M, Naganawa H, Masuda T et al.: Tetrahydropyranyl derivatives of daunomycin and adriamycin. J. Antibiot. 32: 1085-1086, 1979.