長鎖不飽和脂肪族化合物による抗癌剤の耐性
克服とその機構

吉川広之・加賀山祐樹・村西昌三*

Overcoming of anticancer drug resistance by unsaturated aliphatic compounds and its mechanism

We have attempted the overcoming of anticancer drug resistance in murine leukemia by unsaturated aliphatic compounds and investigated the drug uptake into cells using adriamycin (ADM) resistant mouse P 388 leukemia (P 388/ADM). When 150 μ M unsaturated fatty acids such as oleic acid (OA, C18 : 1 Δ 9), linoleic acid (LA, C18 : 2 Δ 9-12) and α -linolenic acid (α -LNA, C18 : 3 Δ 9-12-15) were added along with ADM to the P 388/ADM or ADM sensitive P 388 (P 388/S) culture *in vitro*, ADM resistance was greatly reduced, and especially α -LNA completely overcame the resistance. In addition, α -LNA showed a stronger its own killing activity to P 388/ADM than OA and LA. These fatty acids also potentiated the cytotoxicity of ADM against P 388/S. The uptake of ADM was increased by these fatty acids, however, large differences of enhancing rate at 3h were observed between P 388/S (2-7 fold) and P 388/ADM (16-30 fold).

These findings suggest that unsaturated fatty acids can overcome ADM resistance in P 388 leukemia by enhancing the drug uptake and its own cell killing activity.

Hiroshi Yoshikawa • Yūki Kagayama •
Shozo Muranishi*

key words : overcoming of anticancer drug resistance,
unsaturated aliphatic compounds, adriamycin,
mouse P 388 leukemia, drug uptake

癌化学療法時に当初から種々の抗癌剤に耐性を示す腫瘍の存在や、初期には抗癌剤が奏効し腫瘍が退縮するものの、しだいに効果が消失し、癌が再発・増悪する現象は広く知られている。この耐

性の現象には二つの場合が考えられる¹⁾。一つは個体レベルの問題であって抗癌剤の体内動態(代謝および排泄の増大)がその効力に影響を及ぼす場合である。もう一つは、癌細胞自体に原因がある場合である。これはさらに二つの局面に分けられ、一つは癌細胞に輸送された薬物が代謝・不活性化されるものであり、もう一つは、抗癌剤の細胞内蓄積が低下する場合である。

近年、大きな問題となっているアンスラサイクリンおよびピンカアルカロイドに対する多剤耐性の原因は、抗癌剤の癌細胞膜を介した輸送にある。すなわち、感受性細胞に比べ耐性細胞では細胞内から細胞外への抗癌剤の流れ(efflux)が大きく亢進し²⁻⁴⁾、そのため細胞内抗癌剤蓄積量が少なくなり、効力が低下するものと考えられる。すなわち、感受性、耐性細胞ともに抗癌剤の効果と細胞内抗癌剤濃度とは密接な関係にある。一方、筆者らは、細胞融合活性を持つオレイン酸などの長鎖不飽和脂肪酸およびそのグリセライドが消化管より吸収されにくい薬物の吸収改善に著効を示すこと⁵⁻⁷⁾、およびこれらが抗癌剤プレオマイシンの感受性⁸⁾、低感受性癌⁹⁾に対する抗腫瘍効果を大きく増強することを、動物実験において報告した。

今回、筆者らは、アドリアマイシン(ADM)耐性マウス P 388 白血病細胞(P 388/ADM)に対する耐性克服を長鎖不飽和脂質および同アルコールを用いて試み、さらに、これらの癌細胞膜透過性に及ぼす影響について検討し、興味ある知見を得た。本稿では、主として脂肪酸について報告する。

方 法

(1) 長鎖不飽和脂肪族化合物

使用した長鎖不飽和脂肪酸、そのグリセライド

* Department of Biopharmaceutics, Kyoto Pharmaceutical University 京都薬科大学製剤学教室

表1 unsaturated fatty acids and alcohols

PSA: petroselinic acid	C18:1 cis	Δ6
PSEA: petroselaiddic acid	C18:1 trans	Δ6
OA: oleic acid	C18:1 cis	Δ9
moA: mono olein	C18:1 cis	Δ9
O-OH: oleyl alcohol	C18:1 cis	Δ9
LA: linoleic acid	C18:2 cis cis	Δ9-12
LEA: linoelaidic acid	C18:2 trans trans	Δ9-12
L-OH: linoleyl alcohol	C18:2 cis cis	Δ9-12
α-LNA: α-linolenic acid	C18:3 cis cis cis	Δ9-12-15
γ-LNA: γ-linolenic acid	C18:3 cis cis cis	Δ6-9-12

と長鎖不飽和アルコールを表1に示した。炭素数はいずれも18のものであり、2重結合数は1～3のものを用いた。紙面の制約上、すべての結果を示すのは不可能であるので、そのなかの代表的なものについて述べたい。なお、OA, LA, α-LNA (いずれも純度99.0%以上)は日本油脂(株)のものを用いた。脂肪酸は150 μMで重量比1.5倍のHCO 60で可溶化した状態で使用した。

(2) 殺細胞効果

P 388/ADM および ADM 感受性 P 388 細胞 (P 388/S) は、癌研の稲葉博士より供与されたものを用いた。ADM, 長鎖不飽和脂肪酸化合物、10%ウシ胎児血清を含んだ RPMI 1640 培地と P 388/S あるいは P 388/ADM 細胞を5% CO₂ 37°C下4日間共存培養したあと、生存細胞数をMTT 色素還元法¹⁰⁾により算出した。また、殺細胞効果の比較はIC 90値により行った。

(3) 細胞内取り込み

ADM (10 μg/ml) および同濃度の ADM と長鎖不飽和脂肪酸化合物 (150 μM) を P 388/S あるいは P 388/ADM とともに、10%ウシ胎児血清含有 RPMI 1640 培地中に入れ、5% CO₂ 37°C下でインキュベーション後、経時的に細胞を取り出した。ADM の定量¹¹⁾は、細胞を PBS で洗浄後、蒸留水中に分散させ、sonication 処理により細胞を破碎、n-Bu OH で抽出後、ex. 483 nm, em. 589 nm での蛍光測定を行い、取り込み量は mg 蛋白当たりであらわした。

結 果

表2は、P 388/S および P 388/ADM に対する ADM の IC 90 に及ぼす添加物の効果を比較した

表2 comparison of IC90 (μg/ml) of ADM
—effect of double bond number—

lipid	P388/S		P388/ADM	
	—	+	—	+
OA	0.10	0.06	2.80	0.78
LA	0.10	0.06	2.80	0.56
α-LNA	0.10	—	2.80	0.10

図1 uptake of ADM into P388 leukemia without adjuvants

図2 enhancing rate of ADM uptake into P388 leukemia

ものである。ADM 単独では、IC 90 で約30倍の耐性が認められた。一方、OA, LA, α-LNA の添加によって IC 90 は低下した。無添加とくらべた低下率は、感受性細胞では OA, LA で約1/2であったが、α-LNA では、それ自体でも殺細胞作用が強く、生存率は0.1以下であった。一方、P 388/ADM では大幅な殺細胞作用の増強が認められ、IC 90 は ADM 単独に比べ OA で約1/4, LA で1/5となったが、α-LNA では P 388/S の ADM 単独時と同値になり、耐性を克服した。また、α-LNA 単独でも P 388/ADM に対する殺細胞作用は強く、生存率は0.2であった。他方、OA, LA 単独では約0.9であり、それ自体の殺細胞作用は小さかった。

(2) 細胞内 ADM 取り込み

図1に ADM 単独状態における P 388 細胞内

への ADM 取り込みを経時的に示した。P 388/S では、時間とともに細胞内 ADM 濃度が増大し、3 時間後では $0.21 \mu\text{g}/\text{mg}$ 蛋白であった。一方、P 388/ADM では取り込み量は低く、3 時間後では $0.03 \mu\text{g}/\text{mg}$ 蛋白と感受性細胞に比べ $1/7$ であり、やはり細胞内の低 ADM 濃度が耐性の原因であると考えられた。

次に、この細胞内取り込みに及ぼす OA, LA, α -LNA の影響について検討した。図 2 はこれらの 3 時間後の ADM 取り込み量の図 1 に示した ADM 単独時取り込み量に対する増大率を比較したものである。細胞内 ADM 濃度は感受性細胞のほうがやや大きかったものの、その増大率では P 388/ADM のほうが感受性細胞に比べ各脂肪酸で 3 ~ 7 倍も高く、両者の間では大きな相違が認められた。このことは、長鎖不飽和脂肪酸による取り込み増大の効果は耐性細胞のほうにより顕著であることを示している。

考 察

抗癌剤のうち多くのものの殺細胞効果は、細胞内濃度×保持時間に依存する。したがって、癌細胞膜を介しての抗癌剤の輸送を制御することができれば、抗癌剤の作用増強が可能になると考えられる。また、耐性細胞に対しては、その耐性原因が膜輸送の低下に由来するものについてもむろんのこと、酵素等による不活性化が原因の耐性についても、細胞内抗癌剤濃度を十分に高めて、不活性化を飽和させることにより、耐性を克服あるいは耐性を減少させることができるものと考えられる。アンスラサイクリン系およびピンカアルカロイドに多剤耐性を示す癌細胞では、取り込んだ抗癌剤の efflux がエネルギー依存的に亢進される“active efflux”が存在し、このために細胞内抗癌剤濃度が低くなることが観察されている²⁻⁴⁾。また、この active efflux には細胞膜に存在する分子量約 170 k の P-glycoprotein が関与していると考えられるようになってきた¹²⁻¹⁴⁾。

この active efflux の現象はキニジン¹⁵⁾やカルシウム拮抗剤であるベラパミル¹⁶⁾によって減衰され、耐性克服が可能となることが報告されている。一方、筆者らも癌化学療法への吸収促進剤の応用として、細胞融合活性を有する長鎖不飽和脂肪酸

図 3 possible mechanism of enhanced ADM uptake

がプレオマイシン感受性⁹⁾および低感受性癌⁹⁾に対するプレオマイシンの抗腫瘍効果を増強し、細胞内取り込みを増大させることも報告してきた¹⁷⁾。今回の筆者らの得た結果では、長鎖不飽和脂肪酸によって感受性細胞においても取り込みが大きく増大していることから、感受性、耐性両細胞において、少なくとも細胞の外から内への流れ (influx) は増大しているものと考えられる (図 3)。active efflux に対する効果はいまだ検討していないので不明であるが、膜透過性亢進作用をもつ長鎖不飽和脂肪酸は、膜蛋白に対して相互作用を有することが報告されており¹⁸⁾、active efflux に対しても、なんらかの影響を及ぼしている可能性はあるものと考えられる。

結果の項で述べたように、2 重結合数の多いものではそれ自体の殺細胞力もかなりあり、ADM 取り込み増大作用との協力作用があったものと考えられる。長鎖不飽和脂肪酸の癌細胞に対する作用については、Bégin ら¹⁹⁾が正常細胞にくらべ選択毒性があることを報告しており、筆者らの用いた系においても、より選択的に癌細胞を攻撃できる可能性があるものと考えられる。紙面の都合で触れることができなかったが、2 重結合の位置また末端極性基の変化 (グリセライド、アルコール) によって耐性克服度と ADM の癌細胞内取り込み量は劇的に変化しており、これらについても大きな興味を持たれるところである。

以上、長鎖不飽和脂肪酸化合物は ADM 耐性 P 388 マウス白血病細胞の耐性を大きく減少させ、また、克服すること、さらにこれらは P 388 細胞内の ADM 取り込み量を増大させ、その効果は特に耐性細胞において顕著であることを明らかにした。

文 献

- 1) 鶴尾 隆: 多剤耐性の分子機構。蛋・核・酵 32:

- 1400-1412, 1987.
- 2) Danb, K.: Active outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascites tumor cells. *Biochim. Biophys. Acta* 323 : 466-483, 1973.
- 3) Inaba, M., Johnson, R. K.: Decreased retention of Actinomycin D as the basis for cross-resistance in anthracycline-resistant sublines of P 388 leukemia. *Cancer Res.* 37 : 4629-4634, 1977.
- 4) Skovsgaard, T.: Mechanism of resistance to daunomycin in Ehrlich ascites tumor cells. *Cancer Res.* 38 : 1785-1791, 1978.
- 5) Muranishi, S., Tokunaga, Y., Taniguchi, K., Sezaki, H.: Potential absorption of heparin from the small intestine and the large intestine in the presence of monoolein mixed micelles. *Chem. Pharm. Bull.* 25 : 1159-1161, 1977.
- 6) Yoshikawa, H., Muranishi, S., Kato, C., Sezaki, H.: Bifunctional delivery system for selective transfer of bleomycin into lymphatics via enteral route. *Int. J. Pharmaceut.* 8 : 291-302, 1981.
- 7) Yoshikawa, H., Takada, K., Muranishi, S., Satoh, Y., Naruse, N.: A method to potentiate enteral absorption of interferon and selective delivery into lymphatics. *J. Pharmacobio-Dyn.* 7 : 59-62, 1984.
- 8) Yoshikawa, H., Takada, K., Muranishi, S.: Potentiation of antitumor effect of bleomycin by lipid-surfactant mixed micelles I. *In vivo* and tumor-neutralizing activity against mouse ehrlich ascites tumor and rat ascites hepatoma AH 66. *J. Pharmacobio-Dyn.* 8 : 305-310, 1985.
- 9) Iwao, T., Yoshikawa, H., Takada, K., Muranishi, S.: Potentiation of antitumor effect of bleomycin by fusogenic lipid-surfactant mixed micelles II. Tumor-neutralizing assay for inherently bleomycin-resistant murine leukemia. *Chem. Pharm. Bull.* 36 : 2270-2273, 1988.
- 10) Mosmann, T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65 : 55-63, 1983.
- 11) Finkel, J. M., Knapp, K. T., Mulligan, L. T.: Fluorometric determination of serum levels and urinary excretion of daunomycin(NSC-82151) in mice and rats. *Cancer Chemother. Rep. Part. 1* 53 : 159-164, 1969.
- 12) Juliano, R. L., Ling, V.: A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim. Biophys. Acta* 455 : 900-912, 1976.
- 13) Cornwell, M. M., Gottesman, M. M., Pastan, I. H.: Increased vinblastine binding to membrane vesicles from multidrug-resistant KB cells. *J. Biol. Chem.* 261 : 7921-7928, 1986.
- 14) Cornwell, M. M., Safa, A. R., Felsted, R. L. et al.: Membrane vesicles from multidrug-resistant human cancer cells contain a specific 150,000 - 170,000 dalton protein detected by photoaffinity labeling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 : 3847-3850, 1986.
- 15) Tsuruo, T., Iida, H., Kitani, Y., Yokota, K., Tsukagoshi, S. et al.: Effects of quinidine and related compounds on cytotoxicity and cellular accumulation of vincristine and adriamycin in drug resistant tumor cells. *Cancer Res.* 44 : 4303-4307, 1984.
- 16) Tsuruo, R., Iida, H., Tsukagoshi, S., Sakurai, Y.: Overcoming of vincristine resistance in P 388 leukemia *in vivo* and *in vitro* through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. *Cancer Res.* 41 : 1967-1972, 1981.
- 17) Yoshikawa, H., Takada, K., Muranishi, S.: Potentiation of antitumor effect of bleomycin by fusogenic lipid-surfactant mixed micelles. *J. Pharmacobio-Dyn.* 9 : s-56, 1986.
- 18) Murakami, M., Takada, K., Fujii, T., Muranishi, S.: Intestinal absorption enhanced by unsaturated fatty acids: Inhibitory effect of sulfhydryl modifiers. *Biochim. Biophys. Acta* 939 : 238-246, 1988.
- 19) Bégin, M. E., Das, U. N., Ells, G., Horrobin, D. F.: Selective killing of human cancer cells by polyunsaturated fatty acids. *Prostagland. Leukotr. Med.* 19 : 177-186, 1985.