ヒト甲状腺細胞株に対する各種抗癌剤の有効性 および分化度による差異

獨協医科大学内分泌内科

山 中 徹, 菱 沼 昭

Different Effects of Anticancer Drugs on Two Human Thyroid Cell Lines with Different Stages of Differentiation

Tohru YAMANAKA, Akira HISHINUMA

Department of Endocrinology, Internal Medicine Dokkyo University School of Medicine, Mibu, Tochigi, 321-02, Japan

We established two human thyroid tumor cell lines. One cell line (hPTC) was established from the tissue of a papillary thyroid carcinoma surgically excised from a 27-year-old female patient. The other cell line (hAG) was established from the tissue of an adenomatous goiter excised from a 59-year old female patient. Synthesis of cAMP by hPTC and hAG increased when they were stimulated by TSH. hPTC and hAG continued to divide as a monolayer in a tissue culture for three years and two years, respectively.

We assessed the efficacy of anticancer drugs (doxorubicin:ADR, cisplatin:CDDP, nimustine:ACNU, bleomycin:BLM, cyclophosphamide:CPA, aclarubicin:ACR) with respect to hPTC. The hPTC cells were cultured in 24-well plates in the presence of the anticancer drugs for 48 hours, and the cellular DNA of the live cells was measured with diaminobenzoic acid. ADR had the lowest ED50 ($0.029 \mu\text{g/ml}$) and the clinical blood concentration was 13.8 times that of the ED50. The clinical blood concentration divided by ED50 for the other anticancer drugs are, in order of higher values, 2.3 for CPA, 1.7 for BLM, 1.2 for CDDP, 0.5 for ACR, and less than 0.1 for ACNU. ADR showed time-independent effects since a 2-hour exposure of ADR to the hPTC cells resulted in the significant reduction of the cellular DNA content of the live cells even after 48 hours. The effects of the other anticancer drugs were time-dependent.

We then studied the difference of the effects of ADR on hPTC and hAG. ED50 for hPTC was significantly low ($0.035 \mu\text{g/ml}$) compared to that for hAG ($0.460 \mu\text{g/ml}$). Since free radical formation is one of the major anticancer mechanisms of ADR the effects of free radicals on ED50's for hPTC and hAG were measured by adding glutathione (GSH), N-acetylcysteine (NAC), buthionine sulfoximine (BSO), and α -tocopherol (α -toco) into the culture media. GSH catches up with free radicals in the extracellular fluid. NAC promotes production of GSH in the cytoplasm, but BSO interferes with the production of GSH in the cytoplasm. α -toco catches up with free radicals on the plasma membrane. GSH and α -toco did not effect ED50 for hPTC and hAG. However, NAC increased ED50 for hPTC and hAG, and BSO reduced ED50 for hPTC and hAG. The effects of NAC and BSO on ED50 for hPTC were greater than those for hAG. These studies showed that a radical formation in the cytoplasm was one of the major mechanisms of the cytotoxicity of ADR and that hPTC was more vulnerable to ADR than hAG.

In conclusion, ADR was one of the most potent anticancer drugs for the human thyroid cancer cell line. The cytotoxic activity of ADR was more efficient with respect to hPTC than to hAG. Such ADR effects were at least partly due to free radical formation.

Keywords: Papillary thyroid carcinoma, Adenomatous goiter, Anticancer drug, Adriamycin, Free radical

はじめに

現在日本において、甲状腺癌のなかで悪性度の高い未分化癌は2.7～3.5%と少なく悪性度の低い分化癌は、乳頭癌75～88%、濾胞癌8～18%と多数をしめている¹⁾。分化癌の予後は一般的に良好であるが、周囲臓器に浸潤し切除不能となった症例や、遠隔転移を起こした症例では、手術と術後¹³¹I治療、または¹³¹I治療とTSH抑制治療が行われている^{2,3)}。分化癌で¹³¹I治療、TSH抑制治療が効果なく、腫瘍の増大を認める例が抗癌剤療法の適応になり、現在臨床的に使用されている投与法は未分化癌に準じてadriamycinとcyclophosphamideの併用療法などである²⁾。しかし、抗癌剤療法の適応となった分化癌は初回治療例中3.7%に過ぎず⁴⁾、このため分化癌に対する抗癌剤療法を検討したものは少ない。

我々は、手術により摘出された甲状腺乳頭癌組織および腺腫様甲状腺腫組織より、それぞれ分化度の異なる細胞株を樹立した^{5,6)}。両細胞株はTSHに反応してcAMPを産生するという共通の性質を有していたが、甲状腺乳頭癌細胞株(hPTC)はTSHにより増殖が抑制され、一方腺腫様甲状腺腫細胞株(hAG)はTSHにより増殖が促進されるという相違点も認められた。protein kinase Cやtyrosine kinaseの活性化、およびestrogenは両細胞株の増殖を促進した。我々はまず、各種抗癌剤を培養液に添加し、hPTCに対する作用を比較検討した。次に一番殺細胞作用の強かったadriamycinをhPTCおよびhAGに作用させ、両細胞株に対する殺細胞作用の差を見出し、さらにadriamycinによるfree radicalの産生という観点から、比較検討を加えた。

方 法

実験Ⅰ 各種抗癌剤のhPTCに対する作用

実験Ⅰ-1 各種抗癌剤のED₅₀

hPTCを24-well plateで10% FBS+10⁻⁸M EGF加Ham's F-12培養液にて培養し各種濃度の抗癌剤

doxorubicin hydrochloride (Adriacin, ADR) : 協和発酵提供

cisplatin (Randa, CDDP) : 日本化薬提供

nimustine hydrochloride (Nidran, ACNU) : 三共製薬提供

bleomycin hydrochloride (Bleomycin, BLM) : 日本化薬提供

cyclophosphamide (Endoxan, CPA) : 塩野義製薬提供

aclarubicin hydrochloride (Aclacinon, ACR) : 山之内製薬提供

を添加し、生細胞のDNAをDABA法⁷⁾にて測定した。各抗癌剤の濃度は常用血中濃度(ADR:0.4 μg/ml⁸⁾ CDDP:2.0 μg/ml⁹⁾ ACNU:2.0 μg/ml¹⁰⁾ BLM:2.0 μg/ml¹¹⁾ CPA:3.0 μg/ml¹²⁾ ACR:0.02 μg/ml¹³⁾)を参考にその上下5桁の濃度を添加した。各種抗癌剤を添加し、48時間後死んだ細胞は培養液中に浮遊し生細胞は培養血に付着している(Fig.1)ので、浮遊している死細胞を洗浄後生細胞を99.5% ethanolにて固定し空气中で乾燥させ、各wellに20% 3,5-diamino-benzoic acid (DABA; 東京化成)を300 μl分注し、60℃で45分

間処理した。1N HCl 750 μ l を添加し反応を中止させた後、spectrophotometer (CAF-100, 日本分光) にて 380nm で励起, 500nm で蛍光測光した。Sermon sperm DNA (SIGMA) を用いて標準曲線を描き DNA 量を定量した。ED₅₀ は抗癌剤濃度と生細胞 DNA 量との dose-response curve を描き, DNA 量が 50% となる抗癌剤濃度として求めた。

実験 I - 2 各種抗癌剤の殺細胞効果の差 (時間依存性)

各種抗癌剤を常用血中濃度で 2 時間のみ作用させ, 抗癌剤を含まない培養液にてさらに 22 時間, 46 時間培養し, 各 well の DNA を DABA 法にて測定した。

実験 II hPTC と hAG に対する ADR の殺細胞作用の差

hAG と hPTC とに ADR を 10⁻⁸M EGF 存在下に 48 時間持続的に作用させ, 各 well の DNA 量を DABA 法にて測定し, ED₅₀ を算定した。

実験 III hPTC と hAG に対する ADR による free radical の殺細胞作用の差

まず hPTC と hAG の培養液に Glutathion (GSH; 和光純薬) 2mM¹⁴⁾ および N-acetylcystein (NAC; 和光純薬) 1.5mM¹⁵⁾ を各々単独に hPTC と hAG の培養液に添加し ADR を 48 時間持続的に作用させ, 各 well の DNA 量を DABA 法にて測定し ED₅₀ の変化を見た。次に Buthionine Sulfoximine (BSO; sigma)¹⁶⁾ 単独および α -tocopherol (エーザイ) 単独での殺細胞作用を見るため, ADR 非存在下に各種濃度の BSO および α -tocopherol を各々単独に hPTC と hAG の培養液に添加し 48 時間持続的に作用させ, 各 well の DNA 量を DABA 法にて測定した。次に 0.05 μ g/ml という少量の BSO および, 一般的な血中濃度である 4 μ g/ml¹⁷⁾ の α -tocopherol を各々 hPTC と hAG の培養液に添加し ADR を 48 時間持続的に作用させ, 各 well の DNA 量を DABA 法にて測定し ED₅₀ の変化を見た。

統計

計測値の統計学的有意差の検討は student's t-test にて行い, $p < 0.05$ を有意とした。ED₅₀ 算出には DNA 量を ADR 濃度の対数の 2 次または 3 次式で近似したが, $R^2 > 0.98$ と良好の近似となった。

Fig. 1 A photomicrograph of the hPTC cells after ADR treatment Dead cells (A) float in the medium and live cells (B) stick to the bottom of plastic wells. x400

結 果

実験Ⅰ 各種抗癌剤のhPTCに対する作用

実験Ⅰ-1 各種抗癌剤のED₅₀

Epidermal Growth Factor (EGF；湧永製薬)は甲状腺細胞を脱分化させ増殖を促進するため¹⁸⁾¹⁹⁾，分化癌の低分化癌のモデルとしてEGF存在下にhPTCに各種抗癌剤を添加した。各種抗癌剤を持続的に48時間作用させ求めたED₅₀および常用血中濃度/ED₅₀はTable.1に示す通りである。ADRではED₅₀は0.029 μ g/ml，常用血中濃度/ED₅₀は13.8と最大の効果を示し，CPA，BLM，CDDP，ACRの順に作用は弱くなりACNUでは常用血中濃度/ED₅₀は0.1以下であった。

Table 1 ED₅₀ and clinical blood concentration divided by ED₅₀ for anti-cancer drugs reacted on hPTC

The hPTC cells were cultured in Ham's F12 medium supplemented with 10% FBS and 10⁻⁸M EGF in the presence of ADR, CDDP, ACNU, BLM, CPA, and ACR in 24-well plates. After 48-hour incubation the live cells were fixed by ethanol and their DNA were measured. ED₅₀ is a dose with half maximum effect. The clinical blood concentrations are 0.4 μ g/ml for ADR, 2.0 μ g/ml for CDDP, 2.0 μ g/ml for ACNU, 2.0 μ g/ml for BLM, 3.0 μ g/ml for CPA, and 0.02 μ g/ml for ACR.

anticancer drugs	ED ₅₀ μ g/ml	Clinical Blood Concentration / ED ₅₀
doxorubicin (ADR) hydrochloride	0.029	13.8
cisplatin (CDDP)	1.7	1.2
nimustine (ACNU) hydrochloride	> 2.0	< 0.1
bleomycin (BLM) hydrochloride	1.2	1.7
cyclophosphamide (CPA)	1.3	2.3
aclarubicin (ACR) hydrochloride	0.04	0.5

実験Ⅰ-2 各種抗癌剤の殺細胞作用の差（時間依存性）（Fig.2）

抗癌剤はその殺細胞効果より濃度依存性のものと、時間依存性のものに分類されている。ADRを作用させた群では24時間後、48時間後にはADR作用前のDNA量の80%、15%と有意（ $p<0.01$ ）の減少を示した。しかし他の抗癌剤では24時間後では有意の増殖が認められなかったものの、48時間後には再び有意（ $p<0.01$ ）の増殖が認められた。

実験Ⅱ hPTCとhAGに対するADRの殺細胞作用の差（Fig.3）

ADRのED₅₀はhPTCでは0.035 μ g/ml、hAGでは0.460 μ g/mlでhAGのED₅₀はhPTCのED₅₀の約13倍となり、hAGはhPTCより明らかにADRの殺細胞作用に対して抵抗性を示した。

Fig. 2 Time course of the DNA contents of the hPTC cells after two-hour exposure to the anticancer drugs

The hPTC cells were cultured in the presence of the anticancer drugs for two hours and the media were changed to the drug-free medium. After 22 hours and 46 hours after the medium change the cells were fixed by ethanol and DNA of the live cells were measured. The vertical lines represent mean $\pm$ SD (n=4). *, $p<0.01$

Fig. 3 ED₅₀'s of ADR for hPTC and hAG

The hPTC cells and the hAG cells were cultured at various concentrations of ADR in 24-well plates. The live cells were fixed by ethanol and their DNA were measured. The vertical lines represent mean $\pm$ SD (n=4).

実験Ⅲ hPTCとhAGに対するADRによるfree radicalの殺細胞作用の差

GSHは細胞膜を通過せず、培養液中のGSHは細胞外のfree radicalのみを捕捉する。Fig.4に示すように、ADRのED₅₀はhPTCではGSH非存在下では0.024 μg/ml, GSH存在下では0.022 μg/ml, hAGではGSH非存在下では0.582 μg/ml, GSH存在下では0.622 μg/mlで、GSH添加群と無添加群とのED₅₀の差はなく、free radicalを細胞外にて捕捉してもADRの殺細胞作用に変化はなかった。

$$\text{h P T C (- G S H)}: y = 0.160 - 0.311 \log x - 0.049 (\log x)^2 - 0.015 (\log x)^3 \quad R^2 = 0.997$$

$$\text{h P T C (+ G S H)}: y = 0.092 - 0.226 \log x + 0.053 (\log x)^2 + 0.014 (\log x)^3 \quad R^2 = 1.000$$

$$\text{h A G (- G S H)}: y = 0.521 - 0.885 \log x - 0.333 (\log x)^2 - 0.043 (\log x)^3 \quad R^2 = 0.997$$

$$\text{h A G (+ G S H)}: y = 0.566 - 0.847 \log x - 0.371 (\log x)^2 - 0.057 (\log x)^3 \quad R^2 = 0.987$$

Fig. 4 ED₅₀'s of ADR for hPTC and hAG in the presence and absence of GSH

The hPTC cells and the hAG cells were cultured at various concentrations of ADR in the presence and absence of 2mM GSH. After 48-hour incubation the cells were fixed and their DNA were measured. The vertical lines represent mean $\pm$ SD (n=4).

$$\begin{aligned} \text{h P T C (- N A C)} &: y = 0.047 - 0.174 \log x + 0.171 (\log x)^2 + 0.038 (\log x)^3 \quad R^2 = 0.997 \\ \text{h P T C (+ N A C)} &: y = 0.098 - 0.288 \log x + 0.123 (\log x)^2 + 0.033 (\log x)^3 \quad R^2 = 0.997 \\ \text{h A G (- N A C)} &: y = 0.562 - 0.557 \log x - 0.164 (\log x)^2 - 0.019 (\log x)^3 \quad R^2 = 0.998 \\ \text{h A G (+ N A C)} &: y = 0.820 - 0.490 \log x - 0.192 (\log x)^2 - 0.028 (\log x)^3 \quad R^2 = 1.000 \end{aligned}$$

Fig. 5 ED₅₀'s of ADR for hPTC and hAG in the presence and absence of NAC

The hPTC cells and the hAG cells were cultured at various concentrations of ADR in the presence and absence of 1.5mM NAC. After 48-hour incubation the cells were fixed and their DNA were measured. The vertical lines represent mean $\pm$ SD (n=4).

$$\begin{aligned}
 \text{hPTC}(-\text{BSO}): y &= 0.034 - 0.077 \log x + 0.130 (\log x)^2 + 0.027 (\log x)^3 \quad R^2 = 0.983 \\
 \text{hPTC}(+\text{BSO}): y &= 0.049 - 0.077 \log x - 0.053 (\log x)^2 - 0.016 (\log x)^3 \quad R^2 = 0.993 \\
 \text{hAG}(-\text{BSO}): y &= 0.223 - 0.411 \log x - 0.076 (\log x)^2 - 0.002 (\log x)^3 \quad R^2 = 0.999 \\
 \text{hAG}(+\text{BSO}): y &= 0.183 - 0.282 \log x - 0.016 (\log x)^2 + 0.004 (\log x)^3 \quad R^2 = 0.989
 \end{aligned}$$

Fig. 6 ED₅₀'s of ADR for hPTC and hAG in the presence and absence of BSO

The hPTC cells and the hAG cells were cultured at various concentrations of ADR in the presence and absence of 0.05 μg/ml BSO. After 48-hour incubation the cells were fixed and their DNA were measured. The vertical lines represent mean ± SD (n=4).

$$\begin{aligned} \text{h P T C } (-\alpha\text{-toco}) &: y = 0.205 - 0.393 \log x - 0.066 (\log x)^2 - 0.013 (\log x)^3 \quad R^2 = 1.000 \\ \text{h P T C } (+\alpha\text{-toco}) &: y = 0.174 - 0.368 \log x + 0.002 (\log x)^2 + 0.003 (\log x)^3 \quad R^2 = 1.000 \\ \text{h A G } (-\alpha\text{-toco}) &: y = 0.526 - 0.675 \log x + 0.109 (\log x)^2 + 0.001 (\log x)^3 \quad R^2 = 0.997 \\ \text{h A G } (+\alpha\text{-toco}) &: y = 0.524 - 0.687 \log x + 0.148 (\log x)^2 - 0.008 (\log x)^3 \quad R^2 = 1.000 \end{aligned}$$

Fig. 7 ED₅₀'s of ADR for hPTC and hAG in the presence and absence of α -tocopherol
The hPTC cells and the hAG cells were cultured at various concentrations of ADR in the presence and absence of 4 μ g/ml α -tocopherol. After 48-hour incubation the cells were fixed and their DNA were measured. The vertical lines represent mean $\pm$ SD (n=4).

細胞膜を通過し、細胞内にてGSHの生成を促進させるNACを培養液を添加し、hPTCとhAGへのADRの作用の変化を調べた。Fig.5に示すように、hPTCでのADRのED₅₀はNAC非存在下では0.026 μ g/ml, NAC存在下では0.042 μ g/ml, hAGでのED₅₀はNAC非存在下では0.550 μ g/ml, NAC存在下では1.520 μ g/mlであった。NAC添加群と無添加群との差はhPTCで約1.6倍, hAGで約3倍であり, free radicalを細胞内にて捕捉するとADRの殺細胞作用は減弱し, またこのNACの細胞保護作用はhPTCよりhAGに強く働いた。

細胞膜を通過し細胞内にてGSHの生成を抑制するBSOをhPTCとhAGの培養液に添加し、各濃度のADRによる殺細胞作用の変化を見た。BSOは単独でも高濃度では殺細胞作用があると考えられるため、まずBSO単独での殺細胞作用を検討した。BSO単独投与ではhPTCおよびhAGの増殖は5 μ g/ml以下ではほとんど変化を受けなかったで、0.05 μ g/mlという少量のBSOを添加した。BSO無添加群と添加群でのADRのED₅₀はFig.6に示すようにhPTCではそれぞれ0.025 μ g/ml, 0.0006 μ g/ml, hAGではそれぞれ0.262 μ g/ml, 0.165 μ g/mlで、BSO添加群と無添加群との差はhPTCで約42倍, hAGで約1.6倍であった。これよりfree radicalの細胞内の捕捉作用を抑えるとADRの殺細胞作用は増強し、またこのBSOの殺細胞増強作用はhAGよりhPTCに強く働いた。

α -tocopherolは細胞膜上でfree radicalを捕捉するので、hPTCとhAGの培養液に添加しADRの殺細胞作用を検討した。 α -tocopherol単独投与では、hPTCおよびhAGの増殖は α -tocopherol濃度4 μ g/mlまではほとんど変化を認められなかった。そこで α -tocopherol 4 μ g/mlを用い無添加群と添加群のhPTCに対するADRのED₅₀の差を検討したが、Fig.7に示すようにそれぞれのED₅₀は、0.028 μ g/ml, 0.033 μ g/mlであり、hAGでもそれぞれのED₅₀は0.525 μ g/ml, 0.525 μ g/mlであった。 α -tocopherol添加群と無添加群とのED₅₀の差はなく、free radicalを細胞膜内にて捕捉してもADRの殺細胞作用に変化はなかった。

考 察

ヒト甲状腺乳頭癌細胞株(hPTC)はヒト甲状腺乳頭癌組織より樹立し、ヒト腺腫様甲状腺腫株(hAG)はヒト腺腫様甲状腺腫組織より樹立した²⁹⁾。両細胞株とも、TSHに反応しcAMPを産生するという甲状腺細胞の機能を保持していた。しかし、hPTCとhAGはその樹立した組織の分化度により異なった性質を示しており、hPTCは悪性腫瘍細胞のモデルとして、hAGは過形成組織より樹立されたが、in vitroではEGFを加えることにより良性腫瘍に近い細胞のモデルとして考えられる。hPTCのdoubling timeは18時間と短く増殖が活発であり、hAGのdoubling timeは60時間と長かった。またhAGはTSHにより増殖が促進され、hPTCはTSHにより増殖が抑制されるという差異を有していた。臨床的にも、乳頭癌の一部はTSH抑制療法に反応を示さず²⁰⁾、その傾向はより未分化な細胞に認められると思われる。またFRTL-5細胞よりsub-cloningされたより未分化なFRTL-TC細胞はTSHにより増殖が抑制される²¹⁾。この2つの細胞株を用いて、甲状腺癌に対する各種抗癌剤の有効性および分化度の差による殺細胞作用差、抗癌剤の殺細胞作用の機序について検討した。

現在甲状腺分化癌に対して使用されている抗癌剤は、CDDP, BLM, CPA, ADRなどであるが、有効例を認めたものはADR(CPA併用)のみであり、完全寛解例はなかったと報告されている²²⁾。ADRが抗癌剤療法の中心になるということは甲状腺の分化癌、未分化癌に共通であり、実験I-1においてもADRの殺細胞作用のED₅₀は0.029 μ g/mlと最強であった。また実験I-2よりADRを2時間のみ作用させることでも48時間後まで殺細胞作用を有しており、甲状腺分化癌に関しては今回使用した抗癌剤のなかでADRのみがその作用は時間に依存していなかったと言える。Anthracycline系抗癌剤はその作用機序の一つとしてDNA 2本

鎖間に間入してDNA 2本鎖の開離を障害することが知られている²³⁾，ADRは同じAnthracycline系抗癌剤であるACRより強力にDNAと結合しているため²⁴⁾，ADRはACRより作用が強いと考えられた。多剤併用療法ではADR+CPAやADR+CDDPが使用されるが^{22,25)}，当研究の結果においてもCPAはADRの次に殺細胞作用が強く，またCDDPの常用血中濃度もED₅₀の1.2倍と有効性を認めた。

実験Ⅱに示されているようにhAGの殺細胞作用に対しADRのED₅₀は0.460 μ g/mlで，hPTCでのED₅₀ (0.035 μ g/ml)の約13倍であった。これは，hAGとhPTCの分化度の差と考えられるとともに，ADRの殺細胞作用の機序とも関係していると考えられた。ADRの殺細胞作用の機序としては次の3つが報告されている²⁵⁾。

1. DNA intercalation & inhibition of topoisomerase 2
2. Radical formation
3. Interaction with cell membranes

この内我々は，radical formationに注目した。ADRはAnthracycline系の抗生物質で，quinone構造を持ち，microsomeのNADPH-cytochrome P450還元酵素系により1電子還元され，semiquinone radicalが生成される。Semiquinone radicalは酵素の1電子還元によるO₂を生成し，またその還元によってhydroxyl radicalが生成される²⁶⁾。NADPH-cytochrome P450還元酵素は核膜にも存在し，生成されたfree radicalがDNA鎖を切断し抗癌作用を示すと考えられている²⁷⁾。

実験Ⅲでは，ADRのhPTCおよびhAGに対する殺細胞作用を，細胞外，細胞内，細胞膜のfree radical量を操作することにより

1. 甲状腺癌細胞に対するADRの殺細胞作用はfree radicalに依存しているか
2. ADRのhPTCとhAGに対する殺細胞作用差はfree radicalに関係があるか
3. ADRの殺細胞作用は細胞外，内，膜のどこのfree radicalによるものか

を検討した。まず主要な水溶性抗酸化物質でありradicalの捕捉作用を持つGSHを培養液（細胞外）に添加したが，ADRの殺細胞作用に変化はなかった。次に細胞内のGSH濃度を変化させfree radicalの作用を検討するため，NACとBSOを培養液に添加した。NACはGSHをcystineより生成する γ -glutamylcystine-synthetaseの合成を促進するとともに，NAC自身が細胞内に入り γ -glutamylcystine synthetaseの基質となり，細胞内GSH濃度を増加させる¹⁴⁾。一方，BSOは γ -glutamylcystineの合成を阻害し，細胞内GSH濃度を低下させる¹⁶⁾。NAC添加群のED₅₀は無添加群のED₅₀に対し，hPTCで約1.6倍，hAGで約3倍であり，BSO添加群のED₅₀は無添加群のED₅₀に対しhPTCで約1/42，hAGで約1/1.6であり，ADRのED₅₀は細胞内radical濃度に依存していると考えられた。最後に細胞膜内の主要な抗酸化物質であり，細胞膜に対するradical attackによって生成される脂質過酸化radicalを捕捉し細胞膜防御作用を持つ α -tocopherol¹⁷⁾を添加したが，hPTCおよびhAGともにED₅₀の変化はなかった。以上より，甲状腺癌細胞に対するADRの殺細胞作用はradicalに依存しており，細胞内free radicalのみが殺細胞作用と関連していた。これは甲状腺癌細胞でもmicrosomeおよび核膜にNADPH-cytochrome P450還元酵素が存在し，生成されたfree radicalは一時細胞質内に貯蔵されその後核質内でDNA鎖を切断し殺細胞作用を発現したと考えられた。またADRのhPTCおよびhAGに対する殺細胞作用差はNACおよびBSO添加時にも認められ，NACにより細胞内のfree radicalを減少させた時では，hPTCへの保護作用はhAGより弱く，BSOにより細胞内free radicalを増加させた時も，hPTCはhAGよりさらに細胞障害されやすくなっていた。甲状腺癌に対する抗癌剤療法時に，NACのような細胞内にてfree radicalの捕捉作用を持つ物質を併用することによって，より分化した細胞を保護することも可能だと思われる。またBSOのようなfree radicalを増加させる物質を抗癌剤療法時に併用すると，抗

癌剤の投与量は減少し、抗癌剤の一部の副作用を減らすことができると期待される。つまり甲状腺腫瘍細胞に対し抗癌剤、特にADRはより未分化の腫瘍細胞に有効であり、free radical量を操作することでより腫瘍細胞に選択性を持たせられると思われる。

結 語

- 1) TSHに反応性を有するヒト甲状腺乳頭癌細胞株 (hPTC) を樹立した。各種抗癌剤の有効性を検討するため、hPTCに各抗癌剤を48時間持続的に作用させると、ADRの殺細胞作用 (ED_{50} : $0.029 \mu\text{g/ml}$) が最強であり、常用血中濃度は ED_{50} の13.8倍であった。また、各種抗癌剤をhPTCに2時間のみ作用させた場合、ADRのみ48時間後でも殺細胞作用を認めたが、他の抗癌剤は再増殖が認められた。
- 2) hPTCと同様の方法にてTSHに反応性を有するヒト腺腫様甲状腺腫細胞株 (hAG) を樹立した。hAGにADRを48時間持続的に作用させると ED_{50} はhPTCの13倍でADRの殺細胞作用に明らかに抵抗性を示した。
- 3) GSHと α -tocopherolを各々hPTCおよびhAGの培養液に添加したが ED_{50} に変化はなく、hPTCおよびhAGの細胞外および細胞膜ではADRのfree radicalは作用が認められなかった。また、NACとBSO各々をhPTCおよびhAGの培養液に添加すると、NAC添加群は無添加群に対してADRの ED_{50} はhPTCで約1.6倍、hAGで約3倍となり、BSO添加群は無添加群に対して ED_{50} はhPTCで約1/42倍、hAGで約1/1.6倍となった。これは殺細胞作用に有効なADRのfree radicalは細胞質内に存在し、ADRのhPTCとhAGに対する殺細胞作用差は一部free radicalの殺細胞作用差に起因し、free radicalの殺細胞作用はhAGよりもhPTCにより強く働き、それはhPTCがhAGよりも未分化な細胞株であるためと思われる。

謝辞

稿を終えるに臨み、御指導を賜りました下田新一教授に深謝いたします。また各種抗癌剤および α -tocopherolを御提供いただいた製薬会社各社に深謝いたします。

本論文の要旨は第65回日本内分泌学会学術総会で発表した。

文 献

- 1) 岩浅武彦, 牧内正夫, 降旗力男: 結節性甲状腺腫と甲状腺癌. 治療. 1978;60:59-69
- 2) 岩浅武彦: 1) 甲状腺癌 D, 化学療法. 日本臨床. 1988;46:991-995
- 3) 鈴木 章, 岩崎博幸, 小林 薫, 真鍋嘉尚, 尾崎修武, 伊藤国彦, 呉 吉雄, 松本昭彦, 三村 孝, 東 与光, 嶋岡勝太郎: 甲状腺癌の放射線療法, 化学療法. 外科診断 1989;31:723-733
- 4) 河西信勝, 坂本穆彦, 小川伸一郎, 内田正興: 甲状腺低分化癌の臨床. 癌の臨床. 1981;27:20-25
- 5) Hishinuma A, Yamanaka T, Kasai K, So S, Bamba N, Shimoda S-I. Growth regulation of the human papillary thyroid cell line by protein tyrosine kinase and cAMP-dependent protein kinase. Endocrin. J. (Tokyo) 1994, in print
- 6) Hishinuma A, Yamanaka T, Kasai K, So S, Tseng C-C, Bamba N, Ohtake H, Shimoda S-I. Different growth control of the two human thyroid cell lines of adenomatous goiter and papillary carcinoma. (投稿中)
- 7) Hinegartner RT. An improved fluorometric assay for DNA. Anal. Biochem. 1971;39:197-201
- 8) 根岸嗣治, 高平汎志: The absorption, excretion, distribution and metabolism of adriamycin (Adriamycinの生体内動態). 基礎と臨床. 1973;7:73-79
- 9) 澤田益臣: Cisplatinの生体内動態について. 産婦人科の実際. 1983;32:2117-2118
- 10) 仁井谷久暢: 抗癌剤10年のあゆみ, ACNUについて. 癌と化学療法. 1988;15:727-731
- 11) Tomohisa T, Yasuhiko M, Katsutoshi T. Bleomycins: Basic Research. Gann Monograph on Cancer Research. 1989;36:59-70
- 12) Hancock EJ, Kilbrn DG. The effects of cyclophosphamide on in vitro cytotoxic response to a syngeneic tumor. Cancer Immunol.

- Immunother. 1982;14:54-60
- 13) 藤田 浩: 抗癌剤の薬理動態, *Pharma. Medica.* 1985;13:186-198
  - 14) Villani F, Galimberti M, Monti E, Piccinini F, Lanza E, Rozza A, Favalli L, Poggi P, Zunino F. Effect of Glutathion and N-acetylcysteine on in vitro and in vivo cardiac toxicity of Doxorubicin. *Free Rad. Res. Comms.* 1990;11:145-151
  - 15) Unverferth DV. The efficacy of N-acetylcysteine in preventing doxorubicin-induced cardiomyopathy in dogs. *Sem. Oncol.* 1988;10:2-6
  - 16) Durse L, Mimnaugh EG, Myers CE, Sinha BK. Potentiation of Doxorubicin cytotoxicity by buthionine sulfoximine in multidrug-resistant human breast tumor cells. *Cancer Res.* 1989;49:511-515
  - 17) 美濃 真, 玉井 浩: ビタミンA. *日本臨床.* 1982;40:306-308
  - 18) Roge PPr, Van Heuverswyn B, Lambert C, Reuse S, Vassart G, Dumont JE. Antagonistic effects of thyrotropin and epidermal growth factor on thyroglobulin mRNA level in cultured thyroid cells. *Eur. J. Biochem.* 1985;152:239-245
  - 19) Kasai K, Ohmori T, Koisumi N, Hosoyo T, Hiraiwa M, Emoto T, Hattori Y, Simoda S-I. Regulation of thyroid peroxidase activity by thyrotropin epidermal growth factor and phorbol ester in porcine thyroid follicles cultured in suspension. *Life Sci.* 1989;45:1451-1459
  - 20) Mazzaferri EL, Young RL, Oetel JE, Kammerer WT, Page CP. Papillary thyroid carcinoma: the impact of therapy in 576 patients. *Medicine (Baltimore).* 1977;56:171-196
  - 21) Endo T, Shimura H, Saito T, Omayo T. Cloning of malignancy transformed rat thyroid (FRTL) cells with thyrotropin receptors and their growth inhibition by 3', 5' cyclic adenosine monophosphate. *Endocrinology.* 1990;126:1492-1497
  - 22) Shimaoka K, Schoenfeld DA, Dewys WD, Creech RH, Deconti R. A randomized trial of doxorubicin versus doxorubicin plus cisplatin in patient with thyroid carcinoma. *Cancer.* 1985;56:2155-2160
  - 23) Nakamura T. Chemotherapy of acute leukemia from the viewpoint of the action mechanism of antitumor agents. *Acta Haematol. Jpa.* 1980;43:1022-1033
  - 24) 中村 徹, 安藤精章: 新しい抗白血病剤の作用機序とその適応. *総合臨床.* 1984;33:1275-1283
  - 25) Calabrest P, Chabner BA. Antineoplastic Agents. In: Gilman AG, eds, *Goodman & Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics.* 8th ed. Pergmon Press, 1990:1241-1244
  - 26) Bachur NR, Gordon SL, Gee MV, Kon H. NADPH cytochrome P-450 reductase activation of quinone anticancer agents to free radicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1979;76:954-957
  - 27) 中野 稔: 抗癌. 八木國夫, 中野 稔監修, 仁木鋭雄編, 活性酵素. 医歯薬出版 1987:222-240

(受付日: '94.6. 1)

(採択日: '94.9.12)