Cisplatin 耐性 KB 細胞の樹立とその性状

— カルシウム拮抗剤による耐性克服 —

堀 芳朗・山崎 典子・熊澤 博文
山下 敏夫・熊澤 忠躬・河本 圭司*

Establishment and Characteristics of a Cisplatin-Resistant KB Cell Line

— Enhancement of Cisplatin Effect against Cisplatin Resistance
by a Ca Channel Blocker —

Yoshiro Hori, Noriko Yamazaki, Hirobumi Kumazawa, Toshio Yamashita,
Tadami Kumazawa and Keiji Kawamoto
(Kansai Medical University)

Cisplatin resistance was examined with the use of KB cells and KB-rc cells (cisplatin-resistant KB cells). Their viability under the influence of cisplatin and verapamil was determined with trypan blue staining. Verapamil reinforced the effect of cisplatin on both KB cells and KB-rc cells. In a study of cell kinetics with flow cytometry S phase accumulation was observed when verapamil was added to cisplatin. The Ca channel blocker, verapamil increases the effect of cisplatin.

Key words: flow cytometry, cisplatin resistance, verapamil, KB cells

はじめに

癌に対して種々の抗癌剤が開発されその効果は大きく進歩してきたが、再発癌に対して薬剤耐性がみられ治療の上でこれを克服することが大きな問題となってきた。しかし、この薬剤耐性の機序についてはまだ十分に解明されておらず、臨床的な治療方法も確立していないのが現状である。最近、抗癌剤耐性を克服するためにカルシウム拮抗剤を抗癌剤と併用すれば有用であるとの報告がなされている¹⁾²⁾。著者ら

はすでに cisplatin に対する耐性株を KB 細胞で樹立しており (cisplatin 耐性 KB 細胞: KB-rc 細胞)、今回、この耐性株を用いてカルシウム拮抗剤の耐性株克服の有用性について flow cytometry (FCM) を用いて細胞動態を解析したので報告する。

材料と方法

1) 培養細胞

口腔底癌株化細胞である KB 細胞 (CCL-17) と、それより樹立した KB-rc 細胞 (cisplatin 耐

性 KB 細胞)³⁾とを使用した.

2) カルシウム拮抗剤併用時の cisplatin 殺細胞効果の検討

対数増殖期にある 5×10^5 /ml の KB 細胞を用いて cisplatin (ブリストルマイヤーズ) $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度の FBS (牛胎児血清) 添加 MEM 培養液下において, カルシウム拮抗剤 verapamil (エーザイ) を $50, 100 \mu\text{M}$ になるように同時に添加し 24 時間培養し, PBS で洗浄後さらに 48 時間 (通算 3 日間) 培養後, Trypan blue 染色にて生細胞数を測定した. また, verapamil 無添加についてもコントロールとして同様に測定した.

一方, KB-rc 細胞についても cisplatin $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ と $3.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ との二種類の濃度のものを作製し, KB 細胞のときと同様の培養液下において, verapamil の濃度が, $50, 100 \mu\text{M}$ になるように同時に添加し 24 時間培養し, PBS で洗浄後さらに 48 時間培養後, Trypan blue 染色にて生細胞数を測定した. verapamil 無添加についてもコントロールとして同様に測定した.

3) flow cytometry による細胞動態の解析

KB 細胞, KB-rc 細胞の両株化細胞について

cisplatin 濃度 $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ の FBS 添加 MEM 培養液下において, verapamil を $5, 10, 50, 100 \mu\text{M}$ になるように同時に添加し 24 時間培養し, PBS で洗浄後さらに 48 時間培養後, FITC 標識 BrdU-PI 二重染色法^{4)~6)}で細胞動態を FCM (FACS tar Becton Dickinson 社)を用いて検討した. verapamil 無添加についても同様に検討した.

二重染色法による contourgraph は図 1 のように横軸は PI 染色による DNA 量, 縦軸は FITC 標識 BrdU による BrdU 陽性細胞を示し, 各細胞周期の分画を測定した.

結 果

1) Trypan blue 染色を用いた verapamil 添加時の viability の検討

KB 細胞において cisplatin $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 接触すると軽度 viability の低下がみられた. つぎに verapamil $50 \mu\text{M}$ 添加することにより viability は低下し, cisplatin の作用増強効果がみられた (図 2). しかし, コントロールの KB 細胞増殖は verapamil のみの投与でもその濃度が $100 \mu\text{M}$ と高くなると viability が低下し, 高濃度の verapamil ではそれ自体に細胞の障害を認

図 1 FITC 標識 BrdU-PI 二重染色法の contourgraph

図 2 cisplatin $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$, verapamil $50 \mu\text{M}$ 添加による KB 細胞数の変化

めた(図3)。

KB-rc 細胞においても cisplatin にまず 50 μ M 濃度の verapamil を添加した時の cisplatin の作用増強効果をみた。cisplatin 0.5 μ g/ml に 50 μ M verapamil を加えてもその作用増強効果は cisplatin 耐性株においては強くなかった(図4)。しかし, cisplatin 3.0 μ g/ml に verapamil を加えた場合, 50, 100 μ M と濃度依存性にそ

図3 verapamil による cisplatin 作用増強効果の変化(KB細胞)

図4 cisplatin 0.5 μ g/ml, verapamil 50 μ M 添加による KB-rc 細胞数の変化

の効果は増強した(図5)。また, verapamil 自体による細胞の障害は KB-rc 細胞の方が KB 細胞よりも少なかった(図5)。

2) 細胞動態よりみた verapamil の作用機序の検討

KB 細胞では, cisplatin 0.5 μ g/ml の時 S 期細胞はコントロール14.9%と比べ33.5%に, また G₂M 期細胞もコントロール23.4%より52.2%と高値を示した(図6上段左, 中央)。

verapamil 5 μ M 併用することにより S 期細胞は60.9%とさらに増加したが, G₂M 期細胞は変化なかった(図6上段右)。verapamil 濃度が 50, 100 μ M と高濃度になると S 期細胞は80%前後の高値を示したが G₂M 期細胞は verapamil 濃度が高くなると低下した(図6下段中央, 右)(表1)。

KB-rc 細胞では, cisplatin 0.5 μ g/ml の時, S 期細胞は32.1%とコントロールと比べて変化なかったが, verapamil 5 μ M 併用すると48.6%と増加し, G₂M 期細胞は8.4%より12.9%とやや増加した(図7上段中央, 右)。verapamil 濃度が高くなると徐々に S 期細胞の割合は高くなった(図7下段)。しかし, KB 細胞と比較してその値はやや低かった。verapamil 50, 100 μ M の高濃度では G₂M 期細胞は7.0%, 5.4%とやや減少した(図7下段中央, 右)(表2)。

図5 verapamil による cisplatin 作用増強効果の変化(KB-rc細胞)

図 6 verapamil による cisplatin 作用時細胞動態の変化(KB細胞)

表 1 verapamil による cisplatin 作用時細胞動態の変化(KB細胞)

	G ₀ G ₁ (%)	S(%)	G ₂ M(%)
KB control	61.7	14.9	23.4
+ cisplatin 0.5 $\mu\text{g/ml}$	14.3	33.5	52.2
+ cisplatin 0.5 $\mu\text{g/ml}$ + verapamil 5 μM	10.1	60.9	29.0
+ cisplatin 0.5 $\mu\text{g/ml}$ + verapamil 10 μM	8.1	79.6	12.3
+ cisplatin 0.5 $\mu\text{g/ml}$ + verapamil 50 μM	7.4	83.5	9.1
+ cisplatin 0.5 $\mu\text{g/ml}$ + verapamil 100 μM	13.2	79.4	7.4

図7 verapamil による cisplatin 作用時細胞動態の変化(KB-rc細胞)

表2 verapamil による cisplatin 作用時細胞動態の変化(KB-rc細胞)

	G ₀ G ₁ (%)	S(%)	G ₂ M(%)
KB-rc control	58.9	32.7	8.4
+ cisplatin 0.5 μ g/ml	42.3	32.1	25.6
+ cisplatin 0.5 μ g/ml + verapamil 5 μ M	38.5	48.6	12.9
+ cisplatin 0.5 μ g/ml + verapamil 10 μ M	31.7	51.3	17.0
+ cisplatin 0.5 μ g/ml + verapamil 50 μ M	27.7	65.3	7.0
+ cisplatin 0.5 μ g/ml + verapamil 100 μ M	18.2	76.4	5.4

考 察

抗癌剤耐性に関する研究はこれまで種々の培養細胞株を使って行われている。抗癌剤により樹立される耐性株は、多剤にわたり耐性を示す多剤耐性株であることが多く、P-glycoprotein が細胞膜に発現し、さらに、多剤耐性 KB 細胞からは P-glycoprotein 発現に関連した MDR1 遺伝子も単離されている^{7)~9)}。また、その耐性克服に関して、Tsuruo らは、verapamil 等のカルシウム拮抗剤の有用性も併せて報告している¹⁾²⁾。

一般に flow cytometry による方法は癌細胞を研究する上で有効な手段のひとつとしてしばしば用いられている方法である¹⁰⁾¹¹⁾。今回、著者らが樹立した cisplatin 耐性 KB 細胞株 (KB-rc 細胞) においてカルシウム拮抗剤が耐性克服に有効かどうかを flow cytometry を用いて細胞動態より検討した。cisplatin の作用機序はすでに我々が報告しているように 3 日目に S 期から G₂M 期のブロックを起こすと考えられている¹⁰⁾。一方、カルシウム拮抗剤が抗癌剤の増強効果をもつとの報告はなされているが¹²⁾¹³⁾、細胞周期における作用機序についての報告はみられない。今回著者らが行った BrdU/DNA 二重染色法を用いたその作用機序の検討では、カルシウム拮抗剤である verapamil の併用は S 期のみの集積を 3 日目に起こしていることが判明し、また viability の低下もみられた。したがって cisplatin とカルシウム拮抗剤は S 期ブロックを起こし、殺細胞効果を増強したと考えられる。

一方、cisplatin 耐性株である KB-rc 細胞においても cisplatin とカルシウム拮抗剤の併用により S 期ブロックを起こし、殺細胞効果を増強することが明らかになった。しかし、verapamil 単独でも高濃度になると細胞障害性がみられ、本実験の濃度は一般に臨床で用いられる濃度よりも高く、臨床応用に際しては注意が必要と思われる。また、verapamil 単独での細胞障害の程度が、KB 細胞の場合と比較して

KB-rc 細胞において低かったことは、cisplatin 耐性の機序を解明するために興味を持たれるところである。

これまで cisplatin 耐性克服の検討については、数種の薬剤において報告が行われているが、カルシウム拮抗剤が有効であったとする報告も含め、種々の耐性株について種々の報告がみられる。Onoda ら¹²⁾はカルシウム拮抗剤である nifedipine が、菊地ら¹³⁾はカルモデュリン阻害剤が耐性克服に有効であったと報告している。また、Morikage ら¹⁴⁾はカルシウム拮抗剤等は有効ではなく amphotericin B が有効であったと報告している。これらの相違は一般に耐性の機序が多岐にわたって存在しているためと考えられ¹⁵⁾、種々の耐性株についての多角的な検討が必要であると思われる。

頭頸部癌に対して臨床的に cisplatin を使用する例が多いが、再発癌に対して前回の薬剤耐性を獲得していることが多く、次回薬剤選択は難しい。このような状況のもとで、著者らは cisplatin 耐性株を樹立しており、さらに耐性克服のためのカルシウム拮抗剤の検討は有意義と思われる。今回の実験で、cisplatin 耐性株に対してカルシウム拮抗剤が有効であったことにより、臨床への応用が可能かもしれない。

ま と め

KB-rc 細胞においても cisplatin とカルシウム拮抗剤の併用により KB 細胞と同様に S 期ブロックを起こし viability の低下がみられた。

本論文の一部は第49回日本癌学会総会において発表した。

参考文献

- 1) Tsuruo T, Iida H, Tsukagoshi S, et al : 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.
- 2) Tsuruo T, Iida H, Tsukagoshi S, et al : Increased accumulation of vincristine and adriamycin in drug-resistant P388 tumor cells following

- incubation with calcium antagonists and calmodulin inhibitors. *Cancer Res* **42** : 4730~4733, 1982.
- 3) 堀 芳朗, 山崎典子, 和田安弘, 他 : Cisplatin 耐性 KB 細胞の樹立とその性状 —Flow cytometry による細胞動態の解析—. 耳鼻臨床 **83** : 1591~1598, 1990.
- 4) Gratzner HG : Monoclonal antibody to 5-bromo and 5-iododeoxyuridine ; a new reagent for detection of DNA replication. *Science* **218** : 474~476, 1982.
- 5) Krishan A : Rapid flow cytometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. *J Cell Biol* **66** : 188~193, 1975.
- 6) Kawamoto K, Kawakami K, Kawamura Y, et al : New sensitivity test using flow cytometry. *Neurooncology* **6** : 361~370, 1988.
- 7) Gros P, Neriah Y, Croop JM, et al : Isolation and expression of complementary DNA that confers multidrug resistance. *Nature* **323** : 728~731, 1986.
- 8) Ueda K, Cardarell C, Gottesman MM, et al : Expression of a full length cDNA for the human MDRI (P-glycoprotein) gene confers multidrug-resistance in mouse and human cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **84** : 3004~3008, 1987.
- 9) Tsuruo T : Mechanisms of multidrug resistance and implications for therapy. *Jpn J Cancer Res* **79** : 285~296, 1988.
- 10) Wada Y, Kawamoto K, Oka S, et al : Clinical evaluation for the mechanism of cisplatin with bromodeoxyuridine by flow cytometry and clinico-histological study. *Life Sci* **44** : 259~264, 1989.
- 11) 山崎典子, 堀 芳朗, 榑 徳子, 他 : 頭頸部腫瘍細胞動態の FCM を用いた研究 —第 2 報 : 癌細胞検出の基礎的研究—. 耳鼻臨床 **83** : 809~815, 1990.
- 12) Onoda JM, Nelson KK, Tailor JD, et al : In vivo characterization of combination antitumor chemotherapy with calcium channel blocker and cis-diamminedichloroplatinum (II). *Cancer Res* **49** : 2844~2850, 1989.
- 13) 菊池義公, 岩野一郎, 宮内宗徳, 他 : シスプラチン耐性ヒト卵巣癌細胞株の樹立とその耐性機構. *Acta Obst Gynaec Jpn* **40** : 379~383, 1988.
- 14) Morikage T, Bungo M, Inomata M, et al : Reversal of cisplatin resistance with amphotericin B in a non-small cell line. *Jpn J Cancer Res* **82** : 747~751, 1991.
- 15) 桑野信彦 : 腫瘍耐性の機構. *病態生理* **2** : 901~910, 1983.

(原稿受付 : 平成 4 年 5 月 6 日
原稿採択 : 平成 4 年 7 月 20 日 急載
別刷請求先 : 堀 芳朗
〒570 守口市文園町 1
関西医科大学耳鼻咽喉科学教室)