In vitro 実験系による肺がん化学療法レジメンの 抗腫瘍効果の評価

斎藤由起子¹, 平野 剛^{1a}, 沖 洋充², 笠師久美子², 菅原 満^{2b},
小林正紀¹, 高橋夏子³, 板垣史郎¹, 井関 健^{*1, 2}

北海道大学大学院薬学研究院臨床薬剤学研究室¹

北海道大学病院薬剤部²

北海道大学大学院医学研究科³

In Vitro Evaluation of Anticancer Effects of Lung Cancer Chemotherapy Regimens

Yukiko Saito¹, Takeshi Hirano^{1a}, Hiromitsu Oki², Kumiko Kasashi², Mitsuru Sugawara^{2b},
Masaki Kobayashi¹, Natsuko Takahashi³, Shirou Itagaki¹ and Ken Iseki^{*1, 2}

*Laboratory of Clinical Pharmaceuticals and Therapeutics,
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University¹*

Department of Pharmacy, Hokkaido University Hospital²

Graduate School of Medicine, Hokkaido University³

[Received June 10, 2008
Accepted January 22, 2010]

Lung cancer is the leading cause of cancer mortality. There are 3 major types of lung cancer therapy-surgery, chemotherapy and radiotherapy. In most cases, chemotherapy is the first choice and cisplatin-based combination therapy plays a major role in lung cancer chemotherapy.

As the anticancer effects of lung cancer chemotherapy regimens have not been evaluated *in vitro*, we evaluated the effects of combination therapy with cisplatin and irinotecan (IP therapy) and that with cisplatin and etoposide (EP therapy), using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay in human lung adenocarcinoma A 549 epithelial cell line cells. In the MTT assay, drug solutions were added according to the same schedule as for the regimens. The exposure times of the drugs were their half-lives, and drug concentrations were the IC₅₀ values of the half-lives. Our results suggested that cisplatin had a much stronger antiproliferative effect than irinotecan and etoposide, and that all agents had a strong anticancer effect.

It has been shown that in these combination therapies, together, the drugs have a stronger anticancer effect than they do when given alone. For IP therapy, cell viability returned at day 28, while it returned at day 15 for EP therapy. These results suggested that the MTT assay can be used *in vitro* to evaluate cancer chemotherapy regimens as well as dosing schedules for IP therapy and EP therapy.

Key words lung cancer regimen, MTT assay, cisplatin, SN-38, etoposide

緒 言

がんは日本人の死亡原因疾病の第一位を占め、その死亡者数は年々増加傾向にある。全がん種の死亡率のうち

肺がんは男性では第一位を、女性では胃がんに次いで第二位を占めており、日本人のがん死亡原因の第一位に至った。肺がんはその組織型により小細胞肺がんとそれ以外の腺がん、扁平上皮がん、大細胞がんを含む非小細胞肺がんに大別される。小細胞肺がんは増殖速度が速

* 札幌市北区北 12 条西 6 丁目 ; Kita-12 jo, Nishi-6-chome, Kita-ku, Sapporo-shi, Hokkaido, 060 0812 Japan

a 現) 神戸大学医学部附属病院薬剤部(神戸市中央区楠町 7 丁目 5 2 ; 7 5 2, Kusunoki-cho, Chuo-ku, Kobe-shi, Hyogo, 060 0812 Japan)

b 現) 北海道大学大学院薬学研究院薬物動態解析学(札幌市北区北 12 条西 6 丁目 ; Kita-12 jo, Nishi-6-chome, Kita-ku, Sapporo-shi, Hokkaido, 060 0812 Japan)

く、抗がん剤に対する感受性も高いため化学療法が第一選択とされる。一方、非小細胞肺癌は増殖速度が遅く、抗がん剤に対する感受性も低いために手術や放射線療法などの局所療法が第一選択とされる¹⁾。しかしながら、切除不能の a~ 期の症例にはシスプラチンなどの白金製剤を含む化学療法が標準療法とされている。非小細胞肺癌化学療法はシスプラチンを含むレジメンの導入以降、その奏効率は 20~60% と上昇しているが、それが生存率の延長につながっているかは未だ明らかとなっていないのが現状である²⁾。

シスプラチンは白金錯体に分類される抗がん剤であり、特に固形がんに対し、高い抗腫瘍効果を示すものの腎毒性や消化器障害といった副作用が強いという特徴を有する薬剤である。日本においては、1979 年より臨床試験が開始され、1983 年に製造承認、1986 年には非小細胞肺癌も適応症に追加された³⁾。肺癌治療に対してはシスプラチンを基本としたレジメンが BSC(best supportive care)に対して有意に生存率の延長、症状の改善、QOL の向上をもたらすといわれている。併用する抗がん剤は第三世代とよばれるイリノテカンやパクリタキセル、ドセタキセル、ゲムシタピン、ビノレルビン、あるいは第二世代とよばれるエトポシド、マイトマイシンなどである。そのため、シスプラチンは肺癌治療における key drug であるといえる。

抗がん剤は他の薬剤と比較して治療域が狭く、抗腫瘍効果を期待して投与量を増加すると、副作用の発現頻度やその重篤度が高まる恐れがある。したがってがん化学療法の原則は適切な薬剤を正しい用量で、適応のある患者に投与することである。そのため、抗がん剤の選択においては、患者の全身状態や年齢、さらに腫瘍の性質や広がり、増殖速度などが考慮される。がん化学療法は適応のある抗がん剤が単剤で用いられるほか、抗腫瘍効果の増大あるいは副作用の軽減を目的として作用機序の異なる抗がん剤を組み合わせた多剤併用療法が広く用いられている。併用する薬剤の条件は、単剤でも有効であること、用量規制因子が異なること、作用機序が異なること、最大耐用量で投与できることが望ましい⁴⁾。さらにがん化学療法は薬剤の投与量や投与間隔などを定めたレジメンによって行われる。本研究では肺癌化学療法レジメンの抗腫瘍効果を *in vitro* 法により判定し、各種レジメンを評価することが可能か否かを検証した。また本検討では肺癌のモデルとして肺胞上皮のモデル細胞であり、ヒト肺扁平上皮がん由来の細胞株である A 549 細胞を用いた。本細胞は肺胞構造を有しており、過去にも抗がん剤感受性試験において使用されている^{5,6)}。そこで肺癌治療の key drug であるシスプラチンを基本とした多剤併用レジメンに着目し、その抗腫瘍効果を評価することとした。

方 法

1. 実験材料

1)細胞

肺癌のモデルとしてヒト肺扁平上皮がん由来 A 549 細胞を使用した。A 549 細胞は非動化した 10% FBS, 100 IU penicillin, 100µg/mL streptomycin を含む DMEM (SIGMA D 6429)を培養液とし、37 °C 5% CO₂ 95% air 条件下で 75 cm² フラスコ内(Coster Corning Incorporated)にて培養した。

2)薬剤

シスプラチン(シスプラチン注「マルコ」[®]、以下 CDDP と略す)はヤクルト本社株式会社より購入し、エトポシド(ラステット[®]注、以下、VP 16 と略す)は日本化薬株式会社より購入した。イリノテカン(以下、CPT 11 と略す)の活性代謝物である SN 38 は第一三共株式会社より原末の供与を受けた。SN 38 は dimethyl sulfoxide (DMSO)で溶解し、高濃度の薬液をフィルター(MILLEX[®]-GV PVDF 0.22µm)にてろ過した後、使用直前に培養液で希釈して用いた。CDDP と VP 16 は使用時に高濃度の薬液をフィルター(MILLEX[®]-GV PVDF 0.22µm)にてろ過した後、直接培養液で希釈した。

2. 抗腫瘍効果の評価法

抗腫瘍効果の評価は 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay⁷⁾にて行った。細胞懸濁液を $5 \times 10^2 - 2 \times 10^5$ cells/mL に調整し、96 穴平底マイクロプレート(FALCON 3072)に 50µL/well ずつ播種した。37 °C 5% CO₂ インキュベーター内で 24 時間予備培養した後、終濃度にあわせて調製した薬液を 50µL/well ずつ添加した。CO₂ インキュベーターにて一定時間薬液を培養細胞と接触させた。また、途中で薬液接触を中断し、継続し培養を行う際には、培養液を除去し Phosphate-buffered saline(PBS)を 100µL 添加しウェル内に残存した薬液を洗浄した。その後、培養液を 100µL 添加し、培養を継続した。反応終了前に培養液 100µL に対し 0.5% MTT-PBS ストック溶液(滅菌 PBS に MTT を溶解して調整)を 10µL/well ずつ添加しインキュベーター内で発色させた。反応後、培養液を吸引除去し、DMSO を 200µL/well 加えて細胞を溶解し、マイクロプレートリーダー(densitometer CS 9300, Shimadzu)にて 590 nm における吸光度を測定し、生成した MTT formazan の吸光度を求めた。細胞生存率は薬物未処理群(control)の吸光度に対する薬物処理群の吸光度の比(% of control)で示した。また、50% 増殖抑制濃度(IC₅₀ 値)の算出には解析ソフト Origin 6.1 J[®]を用いた。

3. 各レジメンの抗腫瘍効果の評価

各レジメンの抗腫瘍効果の評価は MTT assay にて行った。対象レジメンは CDDP を含むものから CDDP

と CPT 11 の併用療法(CDDP + CPT 11, 以下, IP 療法と略す)および CDDP と VP 16 の併用療法(CDDP + VP 16, 以下, EP 療法と略す)の 2 種を選択した。レジメンの投与スケジュールと同様に薬液を添加し, 28 日を 1 クールとして抗腫瘍効果を評価した(Fig. 1 および Fig. 2)。薬剤の添加濃度は各薬剤の静脈投与後の半減期^{3, 8, 9)}を指標として算出した IC₅₀ 値とした。薬剤接触時間は各々の薬剤の静脈投与後の半減期までとし, その後, 薬液を除去し培養液を添加して後培養を行った。これらの条件を用いることにより血中濃度の AUC と同等の濃度と時間の積が得られるものと考えた(Fig. 3)。なお, 1 クール終了後の抗腫瘍効果を評価するために後培養を

day 35 まで行った。

結 果

1. 各レジメンの抗腫瘍効果の評価

各レジメンの抗腫瘍効果の評価を行うにあたり, 薬剤の接触時間を各薬剤の静脈投与後の半減期, 接触濃度を半減期接触時の IC₅₀ 値とした。半減期接触時の CDDP, SN 38, VP 16 単剤の抗腫瘍効果をそれぞれ検討した結果(Fig. 4), 半減期接触時における CDDP, SN 38, VP 16 の IC₅₀ 値はそれぞれ $3.40 \pm 0.32 \mu\text{M}$, $1.29 \pm 0.44 \mu\text{M}$, $2.54 \pm 0.97 \mu\text{M}$ と算出された(Table 1)。以降のレジメン

Fig. 1. Methods for evaluation of IP therapy

Fig. 2. Methods for evaluation of EP therapy

Fig 3 . Relationship between AUC and product of drug concentration and exposure time

Fig 4 . Effect of anticancer drugs on the cell viability of A549 cells

A549 cells were exposed various concentrations of anti-cancer drugs for half-life, and the cell viability was assessed by MTT assay. Each point represents the mean $\pm$ S.D. of 6-12 measurements.

Table 1 . IC_{50} values of CDDP, SN 38 and VP 16 for half-life

	$t_{1/2}$ (h)	IC_{50} (μ M)
CDDP	100	3.40
SN-38	18.5	1.29
VP-16	4	2.54

Date were taken from Fig. 4

の抗腫瘍効果の評価においては算出した IC_{50} 値を接触濃度とした。

1) CDDP + CPT 11(IP)療法

CPT 11 は単剤でも約 20% 程度の奏効率が得られることが臨床試験により報告されている¹⁰⁾。また, CDDP と併用することにより奏効率が 48% に達したという成績も報告されており¹¹⁾, IP 療法は肺がん治療に対して高い奏効率を示すレジメンであるといえる¹²⁻¹⁴⁾。そこでまず IP 療法の抗腫瘍効果を評価した。IP 療法は CDDP を day 1 に CPT 11 を day 1, 8, 15 に投与するレジメンである。

その結果, CDDP 単剤で処理した細胞の生存率は薬液除去後(day 5)も day 28 までゆるやかに低下し, day 35 には回復する傾向が認められた(Fig. 5 a)。一方, SN 38 処理した細胞の生存率は day 1 投与後, 薬液を除去し後培養することにより 49.9%(day 2)から 58.0%(day 5)へ上昇し回復する傾向が認められた。しかしながら, その後の day 8 および day 15 の投与により day 22 にはその細胞生存率は 13.8% にまで低下した(Fig. 5 b)。SN 38 単剤の場合には細胞生存率は day 2 から day 5 にかけて回復が認められたものの, CDDP を併用した IP 療法の細胞生存率は著しく低下した。また, その後 day 28 までほぼ一定であった IP 療法の細胞生存率も day 35 には 22.5% にまで回復していた(Fig. 5 c)。

以上の結果より, CDDP は長期間にわたって抗腫瘍効果を示すことが示唆された。一方, SN 38 は day 2 から day 5 にかけて細胞生存率の回復が認められた。このことは, CPT 11 の 1 回目の投与により死滅したがん細胞が回復してきたところを再投与によりさらに攻撃するというレジメンの投与スケジュールに相関する結果であると考えられる。

2) CDDP + VP 16(EP)療法

EP 療法は欧米においては非小細胞肺がんの第一選択として広く汎用されているレジメンである。また, 日本においては EP 療法と胸部放射線療法の併用は他の治療方法と比較して毒性が少なく, さらに CDDP に放射線増感作用があることから放射線療法との併用に最も適したレジメンとして汎用されている^{15, 16)}。そこで次に EP 療法の抗腫瘍効果を評価した。EP 療法は CDDP を day 1 に VP 16 を day 1, 2, 3 に投与するレジメンである。

その結果, CDDP 単剤で処理した細胞の生存率は IP 療法のときと同様の推移を示し, day 5 において薬液を除去した後も低下が認められた(Fig. 6 a)。一方, VP 16 を day 1 から day 3 まで投与したときの細胞生存率は VP 16 除去後 40.9%(day 5)と最低値を示した後は経時的に回復し, day 28 にはほぼ 100% にまで回復していた(Fig. 6 b)。EP 療法の細胞生存率は VP 16 を day 1 から day 3 までに投与後, 薬液を除去しているにもかかわらず day 5 において 28.6% と顕著に低下していた。さらにその細胞生存率は CDDP の有する抗腫瘍効果のために day 15 まで直線的に低下し, それ以降回復する傾向が認められた(Fig. 6 c)。

Fig 5 . Effects of CDDP, SN 38 and IP therapy on the cell viability of A549 cells
A549 cells were exposed to $3.40\mu\text{M}$ CDDP for 100 hours on day 1(a), $1.30\mu\text{M}$ SN 38 for 18.5 hours on day 1, day 8 and day 15 (b) and CDDP plus SN 38 (c), and the cell viability was assessed by MTT assay. Each point represents the mean $\pm$ S.D. of 5-15 measurements.

以上の結果より、CDDP と VP 16 を併用した EP 療法においては各々の単剤のときと比較して抗腫瘍効果が増大することが示された。

考 察

HTCA(Human Tumor Clonogenic Assay)^{17,18)}や CD-DST (Collagen gel droplet embedded culture drug sensitivity test)¹⁹⁾, MTT assay などの *in vitro* 抗がん剤感受性試験が臨床効果の予測あるいは新規抗がん剤のスクリーニングなどがん化学療法の基礎的研究手段を目的に使用されてい

る^{20,21)}。その中でも MTT assay は簡便に施行でき、検査室レベルにおいても行い得る臨床応用可能な方法である。そこで本研究では種々の抗がん剤感受性試験のうち MTT assay に着目し肺がんのモデルとして A 549 細胞を用いて IP 療法および EP 療法の抗腫瘍効果を *in vitro* において評価した。

まず薬剤の接触時間を静脈投与時の半減期、接触濃度を半減期接触時の IC_{50} 値とすることによって、静脈投与後の血中濃度の AUC と同等の薬剤接触面積を得られると想定し、各レジメンの抗腫瘍効果の評価を行った。その結果、細胞周期非依存的な薬剤である CDDP は薬

Fig 6 . Effects of CDDP, VP 16 and EP therapy on the cell viability of A549 cells
A549 cells were exposed to $3.40\mu\text{M}$ CDDP for 100 hours on day 1 (a), $2.00\mu\text{M}$ VP 16 for 4 hours on day 1, day 2 and day 3 (b) and CDDP plus VP 16 (c), and the cell viability was assessed by MTT assay. Each point represents the mean $\pm$ S.D. of 6-16 measurements.

液除去後も強い抗腫瘍効果を有していた。一方、細胞周期依存性の薬剤であるCPT 11およびVP 16は薬液除去後の抗腫瘍効果は弱いものの、薬液接触時には強い抗腫瘍効果を有していた。このことより多剤併用レジメンにおいてCDDPは単回投与でありCPT 11およびVP 16は複数の投与をしていることが評価できた。また、これら作用機序の異なる薬剤を併用することによって抗腫瘍効果が増大することが示された。また実際の臨床では肺癌治療に対してCPT 11を単剤で用いるレジメンも使

用される。日本における標準的なCPT 11の投与量は単剤の場合は 100 mg/m^2 であり、CDDPと併用される場合は 60 mg/m^2 あるいは 80 mg/m^2 である。本評価系において多剤併用によって各薬剤を減量できる可能性も示された。

IP療法の検討においてSN 38単剤で認められた抗腫瘍効果より、CPT 11は単回投与ではなく1週間ごとの投与が有効であることが示唆された。EP療法の検討においてday 15以降に細胞生存率の若干の回復が認めら

れたことから、通常用いられているレジメンよりも短い日数を1クールとすることも考えられる。しかしながら、実際の臨床では抗がん剤の抗腫瘍効果だけではなく副作用の出現も考慮しなければならない。多くの抗がん剤において骨髄抑制のNadirは7-14日前後であることから、EP療法が21日を1クールとして適応されている可能性が高い。しかしながら、本評価系においては副作用の出現までは評価できないため、今後改良していかななくてはならない問題である。

以上のことより、MTT assayを用いた本評価系によりがん化学療法レジメンの臨床的抗腫瘍効果がシュミレーションできる可能性が示唆された。今後は細胞周期等を考慮し、さらなる評価系の改善を試みる。

がん化学療法施行時には骨髄抑制などの重篤な副作用も問題となる。In vitroにおける各種レジメンの抗腫瘍効果を評価することにより、各薬剤の減量が可能となり副作用の軽減にもつながる。今度、本評価系を用いて有効なレジメンのエビデンスの構築に寄与できることが期待される。

引用文献

- 1) 日本肺癌学会編, “EBMの手法による肺癌診療ガイドライン”, 2005年度版, 2005, pp.1-195.
- 2) C. Pepe, B. Hasan, T.L. Winton, L. Seymour, B. Graham, R. B. Livingston, D.H. Johnson, J.R. Rigas, K. Ding, F.A. Shepherd, Adjuvant vinorelbine and cisplatin in elderly patients: National Cancer Institute of Canada and Intergroup Study JBR. 10, *J. Clin. Oncol.*, **25**, 1553-1561 (2007).
- 3) シスプラチン注「マルコ」, 医薬品インタビューフォーム, ヤクルト本社株式会社, 2005.
- 4) 国立がんセンター中央病院内科レジデント編 “がん診療レジデントマニュアル”, 第2版医学書院, 2002, pp.1-333.
- 5) Y. Kano, M. Akutsu, S. Tsunoda, K. Mori, K. Suzuki, K. Adachi, In vitro schedule-dependent interaction between paclitaxel and SN-38 (the active metabolite of irinotecan) in human carcinoma cell lines, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **42**, 91-98 (1998).
- 6) M.J. Edelman, H. Quam, B. Mullin, Interaction of gemcitabine, carboplatin and paclitaxel in molecularly defined non-small-cell lung cancer, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **48**, 141-144 (2001).
- 7) T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival; Application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods*, **65**, 55-63 (1983).
- 8) トポテシン注, 医薬品インタビューフォーム, ヤクルト本社株式会社, 2007.
- 9) I.L. Peter, L.S. Maurice, The Clinical Pharmacology of Etoposide and Teniposide, *Clin. Pharmacokinet.*, **12**, 223-252, Review (1987).
- 10) Non-small Cell Lung Cancer Collaborative Group, A metaanalysis using update on individual patients from 52 randomized clinical trials, *Br. Med. J.*, **311**, 899-909 (1995).
- 11) P.A. Bunn Jr, K. Kelly, New chemotherapeutic agents prolong survival and improve quality of life in non-small cell lung cancer: A review of the literature and future directions, *Clin. Cancer Res.*, **4**, 1087-1100 (1998).
- 12) T. Tsurou, T. Matsuzaki, M. Matsushita, H. Saito, T. Yokokura, Antitumor effect of CPT 11, a new derivative of camptothecin, against pleiotropic drug-resistant tumors in vitro and in vivo, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **21**, 71-74 (1988).
- 13) S. Negoro, N. Masuda, Y. Takada, T. Sugiura, S. Kudoh, N. Katakami, Y. Ariyoshi, Y. Ohashi, H. Niitani, M. Fukuoka, Randomised phase III trial of irinotecan combined with cisplatin for advanced non-small-cell lung cancer, *Br. J. Cancer*, **88**, 335-341 (2003).
- 14) K. Noda, Y. Nishiwaki, M. Kawahara, S. Negoro, T. Sugiura, A. Yokoyama, M. Fukuoka, K. Mori, K. Watanabe, T. Tamura, S. Yamamoto, N. Saijo, Irinotecan plus cisplatin compared with etoposide plus cisplatin for extensive small-cell lung cancer, *N. Engl. J. Med.*, **346**, 85-91 (2002).
- 15) M. Takada, M. Fukuoka, M. Kawahara, T. Sugiura, A. Yokoyama, S. Yokota, Y. Nishiwaki, K. Watanabe, K. Noda, T. Tamura, H. Fukuda, N. Saijo, Phase study of concurrent versus sequential thoracic radiotherapy in combination with cisplatin and etoposide for limited-stage small-cell lung cancer: results of the Japan Clinical Oncology Group Study 9104, *J. Clin. Oncol.*, **20**, 3054-3060 (2002).
- 16) M.C. Perry, W.L. Eaton, K.J. Propert, J.H. Ware, B. Zimmer, A.P. Chahinian, A. Skarin, R.W. Carey, H. Kreisman, C. Faulkner, R. Comis, M.R. Green, Chemotherapy with or without radiation therapy in limited small-cell carcinoma of the lung, *N. Engl. J. Med.*, **316**, 912-918 (1987).
- 17) A.W. Hamburger, S.E. Salmon, Primary bioassay of human tumor stem cells, *Science*, **197**, 461-463 (1977).
- 18) S.E. Salmon, A.W. Hamburger, Immunoproliferation and cancer: a common macrophage-derived promoter substance, *Lancet*, **8077**, 1289-1290 (1978).
- 19) 小林昶運, 谷坂圭造, 近藤直人, 水戸欣子, 肥塚正博, 横内秀起, 東山聖彦, 児玉恵, 土井修, 山田正信, 中山秀光, 家木良彰, 糸井真一, 三宅正幸, 瀧俊彦, 原聡, 安富正幸, 福田義孝, 新しい In Vitro 抗癌剤感受性試験 Collagen gel Droplet embedded culture Drug Sensitivity Test (CD-DST)法の確立とその臨床有用性, 癌と化学療法, **22**, 1933-1939 (1995).
- 20) 下山正徳, 田中和彦, 木村禧代二, 人がん細胞の薬剤感受性度 - 再増殖試験(regrowth assay)による薬剤感受性度測定とその意義 -, 癌の臨床, **25**, 75-83 (1979).
- 21) 中川和彦, 西条長宏, In vitro 抗癌剤感受性テスト - その現状と今後の展望, 医学のあゆみ, **141**, 533-537 (1987).