原 著

血小板に及ぼす制癌剤の影響
——リン脂質代謝, Ca^{2+} 動態について——北田 親穂* 橋爪 誠* 塩田 啓仁*
粉川 皓年* 安永幸二郎*Effects of antineoplastic agents on platelet functions—studies
on phospholipid metabolism and Ca^{2+} mobilizationChikaho KITADA*, Makoto HASHIZUME*, Keiji SHIOTA*,
Terutoshi KOKAWA* and Kojiro YASUNAGA*

Key words: anthracyclines, arachidonic acid release,
calcium ion mobilization, aequorin

In order to clarify the mode of inhibition of Anthracyclines (Daunomycin and Adriamycin) on platelet functions, we investigated the influence on phospholipid metabolism and calcium ion mobilization during activation of platelets. Stimulation of ^{14}C -arachidonic acid-labeled platelets with thrombin (0.1 U/ml) induced formation of diglyceride (DG) and phosphatidic acid (PA) and liberation of arachidonic acid (AA). Anthracyclines dose-dependently inhibited liberation of AA, whereas they had no influence on formation of DG and PA. Cytoplasmic free calcium ion concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$) was measured in aequorin-loaded platelets. Anthracyclines had little effect on the elevation of $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ induced by thrombin. On the other hand, A 23187-induced elevation of $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ was remarkably suppressed by treatment of drugs. Reduction of release of AA was also seen. The inhibitory effect of Adriamycin was always less than that of the same dose of Daunomycin. These results suggest that Anthracyclines may inhibit the activity of calcium-dependent phospholipase which liberates AA through the disturbance of calcium utilization. Calcium mobilization is also inhibited in A 23187-stimulated platelets. Phospholipase C activity is not affected by these drugs.

* 関西医科大学第一内科〔〒570 大阪府守口市文園町1〕, First Department of Internal Medicine, Kansai Medical University, Osaka, Japan. 受付: 1987.7.14. 受理: 1987.9.25.

緒 言

Adriamycin (ADM) や Daunomycin (DM) 等のアントラサイクリン系制癌剤が血小板凝集能、放出能に対して抑制作用を有すること、またこれら薬剤は外因性アラキドン酸代謝に対する関与は少ないこと等を以前に報告した¹⁾。今回その血小板機能への抑制機序についてリン脂質代謝、内因性アラキドン酸代謝、 Ca^{2+} 動態の面から検討を加えた。

I. 実験方法

健康人男子末梢血より 3.8% クエン酸ソーダ 1/10 容を添加した PRP を得、各実験に用いた。

1. 標識洗浄血小板の作成

PRP に ^{14}C -arachidonic acid ($0.5 \mu\text{Ci}/\text{ml}$) を添加し、 37°C で 1 時間孵置し血小板を標識した。その後 ACD 液 (1/6 v) を加え 2200 rpm で 10 分間遠心し pellet を得た。これを 1 mM EGTA 含有 Hepes-Tyrode 液で 2 回洗浄し、最終的に Ca^{2+} 1 mM 含有の Hepes-Tyrode 液に浮遊させ、血小板数は $10^9/\text{ml}$ に調整した。

2. 血小板脂質の抽出分離

上記の標識洗浄血小板 $250 \mu\text{l}$ をトロンビン $0.1 \text{ U}/\text{ml}$ 、コラーゲン $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、A 23187 $0.5 \mu\text{M}$ でおのおの刺激し、 37°C で一定時間孵置した。また、薬剤はアゴニスト添加 3 分前に処置した。脂質の抽出は Bligh & Dyer の方法に準じておこなった。すなわち、 0.9 ml の chloroform-methanol 混液 (1:2, v/v) を添加、氷冷して反応を停止させ、次いで 0.3 ml の chloroform、 0.3 ml の water を添加後遠心して下層を採取し、窒素ガスで乾固した。ethyl-acetate/2, 2, 4-trimethylpentane/acetic acid/water (90/50/20/100, v/v) の溶媒を用いて薄層クロマトグラフィーにて脂質を分離後、phosphatidic acid (PA), arachidonic acid (AA) の分画をスタンダードで確認し、その放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。又 diglyceride (DG) 分離のためには petroleum ether/diethyl ether/acetic acid (80/20/1, v/v) の溶媒系により展開した^{2,3)}。

3. 血小板内 Ca^{2+} 濃度の測定

Johnson の報告通り Aequorin を人血小板内に導入し、その発光量を測定した⁴⁾。すなわち PGE_1 添加 Hepes-Tyrode 液に浮遊させた洗浄血小板を作成し、10 mM EGTA, 5 mM ATP 存在下で $0.2 \text{ mg}/\text{ml}$ の Aequorin とインキュベートしてこれを血小板内にとりこませた。次いで遠心後 10 mM MgCl_2 , 5 mM ATP 存在下で 0°C , 60 分間インキュベートして膜の透過性を回復させ、室温に戻した後 Sepharose 2 B カラムでゲル濾過し、Aequorin 導入洗浄血小板を得た。血小板凝集と細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) の測定には Platelet Ionized Calcium Aggregometer (Chrono-Log) を用いた。尚、薬剤を用いた場合その着色による減光作用を認めたため、calibration 計測時にも同濃度の薬剤を添加して補正を加えた。

使用した薬剤の濃度は、前回報告したように各アゴニストによる凝集を約 50% 抑制する濃度を用いた。

II. 結 果

1. 血小板リン脂質代謝に及ぼすアントラサイクリン系制癌剤の影響

標識洗浄血小板をトロンビン $0.1 \text{ U}/\text{ml}$ で活性化すると、刺激直後に DG 分画の放射活性の一過性増大、続いての漸減、また PA 分画の放射活性の経時的増加も観察され、トロンビン刺激による phospholipase C (PL-C) の活性化を反映した (図 1)。これに対する薬剤の影響を検討するために DM ($10\sim40 \mu\text{g}/\text{ml}$) にて標識血小板をあらかじめ 37°C で 3 分間処置した後同様に刺激し、10 秒後に停止させて DG の、また 3 分後に停止させて PA の放射活性変動に及ぼす影響を検討した。その結果、DM 添加によっても DG, PA の産生に対しては明らかな変動を見だし得なかった。ADM ($50\sim200 \mu\text{g}/\text{ml}$) の添加によっても同様に、DG, PA の産生抑制は認められなかった (図 2)。次に血小板をコラーゲン ($4 \mu\text{g}/\text{ml}$) で刺激した際の PA 産生に対する薬剤の影響を観察したが、これに対しても DM ($10\sim40 \mu\text{g}/\text{ml}$) または ADM ($50\sim200 \mu\text{g}/\text{ml}$) の添加は明らかな作用は見

Thrombin 0.1 U/ml

Fig. 1 Autoradiogram of agonist induced-phosphatide formation.

PA : phosphatidic acid

AA : arachidonic acid

12-HETE : 12-hydroxy-5, 8, 10, 14-eicosatetraenoic acid

HHT : 12L-hydroxy-5, 8, 10-heptadecatrienoic acid

3min. after exposure of Thrombin (0.1 U/ml)

Fig. 2 Effects of drug on formation of phosphatide and release of arachidonate.

a) Thrombin (0.1 U/ml)

Collagen (4 μg/ml)

b) A23187 (0.5 μM)

Fig. 3 Effects of Daunomycin and Adriamycin on lipid changes.

a) Dose-dependent inhibition of drugs on release of arachidonic acid induced by thrombin and collagen. (3 min. after exposure)

○—○ : phosphatidic acid

△—△ : diglyceride

●—● : arachidonic acid

b) Effect of Daunomycin on time course of A 23187-stimulated release of arachidonic acid.

△—△ : control

▲—▲ : Daunomycin (20 μg/ml)

Each point indicates the mean ± S.D. of 3 experiments.

られなかった (図 3)。

2. 内因性 AA 代謝に及ぼす薬剤の影響

トロンビンやコラーゲン刺激によってひき起こされる AA 遊離の増加は、あらかじめ血小板を薬剤とインキュベートしておくことにより明らかに抑制を受けた。この抑制は薬剤の用量依存的にその強度を増し、DM の方が ADM より

Fig. 4 Effects of Daunomycin and Adriamycin on elevation of cytosolic Ca^{2+} concentration induced by thrombin, and A 23187. Each point indicates the mean $\pm$ S.D. of 3 experiments.

り強い効果を有した。

又、A 23187 (0.5 μM) による経時的な AA 遊離の増大も 20 $\mu\text{g/ml}$ の DM 処置により、著明に抑制された (図 3)。

3. 細胞内 Ca^{2+} 動員に及ぼす薬剤の影響

トロンビン 0.1 U/ml 刺激により $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は $7.6 \pm 2.5 \mu\text{M}$ まで増加した。DM 20 $\mu\text{g/ml}$ 添加後は $6.8 \pm 2.4 \mu\text{M}$, ADM 20 $\mu\text{g/ml}$ 添加後は $7.2 \pm 2.2 \mu\text{M}$ と明らかな低下は認められなかった。コラーゲン 4 $\mu\text{g/ml}$ の刺激でも同様に薬剤処理によっても明らかな $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加の抑制はみられなかった。これに対して A23187 (0.5 μM) 刺激においては $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 変化に及ぼす薬剤の影響は強く、 $9.8 \pm 2.2 \mu\text{M}$ から DM 20 $\mu\text{g/ml}$ 添加により $3.6 \pm 1.6 \mu\text{M}$ に又、ADM 20 $\mu\text{g/ml}$ 添加により $4.2 \pm 1.2 \mu\text{M}$ に各々低下を認めた。この場合、EGTA 2 mM を加えて細

胞外 Ca^{2+} をキレートした場合よりも、薬剤の添加による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 低下の方が著明であった (図 4, 5)。

III. 考 察

トロンビン等による血小板活性化においては膜レセプターの刺激により、PL-C の活性化が生じイノシトールリン脂質の代謝が亢進することがその初期反応とされている⁵⁾。その結果、膜結合 Ca^{2+} の遊離や dense tubular system 等からの Ca^{2+} 動員等によって $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の増加をきたし、後続の Ca^{2+} 依存性の細胞内各種反応がひきおこされて full activation に至る。この血小板活性化の引き金となる脂質代謝と Ca^{2+} 動員に及ぼす薬剤の影響を検討したが、トロンビン刺激による DG, PA の産生に対しては DM, ADM 共に明らかな抑制は認め得なかつ

Fig. 5 Effects of Daunomycin and Adriamycin on elevation of cytosolic Ca^{2+} concentration induced by thrombin, A 23187 and collagen. Each column indicates the mean $\pm$ S.D. of 3 experiments.

た。細胞内の初発反応である PL-C 活性化の指標となる DG, PA 産生に対する影響が認められないということは、これら薬剤の膜レセプター部位への関与や刺激シグナルの細胞内への伝達、共役した PL-C 活性化等に対しては特異的な作用機構を有していないことを意味した。 Ca^{2+} 動員機構に対しても、トロンビン刺激後にエクオリンによって検出される Ca^{2+} シグナルへの影響は少なく、イノシトール turnover に連動した細胞内 Ca^{2+} 動員にも特に作用点はないように思われた。同時に観察したトロンビン刺激後の AA 遊離は薬剤の存在により明らかな抑制を受けた。AA の遊離に際しては血小板においても数種類のホスホリパーゼの存在が報告されており、アゴニストの種類によってもその主導的パターンには差があるとされているが、その活性化には Ca^{2+} による調節を受けている⁶⁾。薬剤の存在下ではトロンビンやコラーゲン刺激後に十分 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が増加しても AA 遊離は抑制されていた。これは、AA 遊離のためのホスホリパーゼの活性化が障害されているた

めで、その一因として Ca^{2+} の利用障害が推察された。同条件下で観察した凝集反応も部分的な抑制を受けたが、アラキドン酸代謝以外にも血小板活性化に必要な他の Ca^{2+} 依存性の反応を障害している可能性が考えられた。A 23187 刺激の場合は $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加に対する薬剤の効果は大きく、明らかに A 23187 自身による Ca^{2+} 動員系路そのものを抑制した。この場合、EGTA 存在により細胞外 Ca^{2+} の関与をなくした際の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加の抑制よりも薬剤の効果の方が大きく、細胞内の Ca^{2+} 移動を抑制しているものと思われた。又、AA 遊離に対する抑制も著明であったが、A 23187 刺激では AA 遊離は Ca^{2+} 依存性の phospholipase A_2 によるものとされており、薬剤による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加の抑制の結果と考えられた。A 23187 でひきおこされる Ca^{2+} 動員に対する薬剤の抑制機序は現在明らかではないが、本薬剤は amphiphilic な性状を有し、膜分画への非特異的な親和性を持つことから、A 23187 が作用する Ca^{2+} 貯蔵部位に対して、その膜上でなんらかの interaction をお

よぼす可能性が推察された。

以上よりアントラサイクリン系制癌剤の血小板機能に対する抑制機序は、アゴニストによって異なり、トロンビンやコラーゲンの場合は活性化初期反応により動員された Ca^{2+} の一部利用障害をきたすことにより、又 A23187 刺激では初発の Ca^{2+} 動員効果そのものに対し抑制的に作用するものと考えられた。

文 献

- 1) 橋爪 誠, 粉川皓年, 塩田啓仁, 安永幸二郎: 血小板に及ぼす制癌剤の影響—Adriamycin と Coenzyme Q_{10} の血小板機能に及ぼす影響について. 血液と脈管, **16**; 201~204, 1985.
- 2) Lapetina, E.G., Chandrabose, K.A. and Cuatrecasas, P.: Ionophore A23187-and thrombin-induced platelet aggregation: Independence from cycloxygenase products. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **75**; 818~822, 1978.
- 3) Billah, M.M., Lapetina, E.G. and Cuatrecasas, P.: Phospholipase A_2 and phospholipase C activities of platelets. J. Biol. Chem., **255**; 10227~10231, 1980.
- 4) Johnson, P.G., Ware, J.A., Cliveden, P.B., Smith, M., Dvorak, A.M. and Salzman, E. W.: Measurement of ionized calcium in blood platelets with the photoprotein Aequorin. J. Biol. Chem., **260**; 2069~2076, 1985.
- 5) Agranoff, B.W., Murthy, P. and Seguin, E. B.: Thrombin-induced phosphodiesteratic cleavage of phosphatidylinositol bisphosphate in human platelets. J. Biol. Chem., **258**; 2076~2078, 1983.
- 6) Rittenhouse-Simmons, S. and Deykin, D.: The activation by Ca^{2+} of platelet phospholipase A_2 . Biochim. Biophys. Acta, **543**; 409~422, 1978.

●白血病治療の理論と実際！

白血病の化学療法—基礎と臨床—

編集 滋賀医科大学学長 脇坂行一 専門医28名分担執筆
A 5 判 292頁 図60 表42 定価5,800円(千300円)

白血病，とくに急性白血病といえは，輸血以外になすすべもなく手をこまねいて見てるのが実情であった。しかし近年，白血病の化学療法が進歩し，白血病の治癒についても一縷の光明が顕われてきた。本書は白血病の化学療法の理論と実際に焦点をしぼり，第一線の研究者による熱心な討議をまとめたものである。我国の白血病の治療指針書である。

●内容：〔白血病細胞の増殖異常と核酸代謝〕1. Leukemogenesisと白血病細胞のRNA dependent DNA polymerase 活性，2. 白血病細胞のDNA合成系酵素活性と代謝調節，3. ヒトリンパ球におけるpyrimidine合成の調節，4. 急性白血病経過中の芽球動態とDNA合成能，5. ヒトリンパ性白血病細胞のgenetic transcription，6. 白血病細胞におけるRNA合成，7. Radioautographyによる白血病細胞増殖異常の解析，8. Non-dividing compartmentに属する白血病細胞の意義，〔抗白血病剤の作用機序と臨床効果〕1. 抗白血病剤の投与経路による効果の差異とその機序，2. 白血病細胞におけるcytosine arabinosideとcycloctidineの作用機序，3. 抗白血病剤の殺細胞作用に及ぼす濃度因子と作用時間，4. 急性白血病の寛解導入，維持ならびに寛解強化療法について，5. 骨髄内白血病細胞の動態の解析による白血病化学療法，6. 慢性骨髄性白血病の治療と予後，7. 白血病治療中の白血病細胞減少曲線について。