ラット腹水肝癌 AH130 細胞における Mitomycin C の取り込み様式¹⁾

宮本謙一,* 松永孝之, 脇 能広, 越浦良三

北陸大学薬学部

The Mode of Mitomycin C Uptake in Rat Ascites Hepatoma AH130 Cells

KENICHI MIYAMOTO,* TAKAYUKI MATSUNAGA, YOSHIHIRO WAKI
and RYOZO KOSHIURA

Department of Pharmacology, Hokuriku University School of Pharmacy,
Ho-3 Kanagawa-machi, Kanazawa, 920-11, Japan

(Received January 27, 1986)

The mode of uptake of mitomycin C (MMC) was examined by use of rat ascites hepatoma AH130 cells. The uptake of MMC into AH130 cells increased in proportion to the cell number and the extracellular concentration of MMC. The uptake was non-saturable and temperature-dependent but not inhibited by metabolic inhibitors such as ouabain, 2,4-dinitrophenol, sodium azide or iodoacetic acid. MMC was rapidly metabolized in the cells and its metabolites accumulated with the time of incubation. Intact MMC in the cells was only a little. The uptake of MMC was, however, not affected by the metabolites accumulated in the cells. Amphotericin B potentiated the uptake and cytotoxicity of MMC. On the other hand, dibucaine diminished not only the uptake but also the cytotoxicity of MMC.

These results suggest that MMC is taken up into rat ascites hepatoma AH130 cells in an energy-independent manner but the uptake is non-saturable because MMC is rapidly metabolized in the cells.

Keywords—mitomycin C; rat ascites hepatoma AH130 cell; uptake; metabolic inhibitor; metabolite; accumulation

制癌剤に対する癌細胞の耐性機序の解明と耐性克服を目的として癌細胞における各種制癌剤の細胞膜輸送機構に関する研究が数多く行われている。²⁾ Mitomycin C (MMC) の細胞膜輸送機構に関する研究は, MMC の標識体が容易に利用出来ないためほとんど行われていない。石川は,³⁾ 細胞に取り込まれた MMC を抽出, 定量することにより, Ehrlich 腹水癌細胞における MMC の取り込み様式はエネルギー非依存的であると報告している。しかし, MMC は主としてミクロソームで代謝的活性化を受け,⁴⁾ すみやかに細胞構成成分と結合することが示されている。⁵⁾ これらの報告から, 細胞に取り込まれた MMC の未変化体のみの定量により MMC の取り込み様式を検討するのは不適切であると考えられる。

我々は, 交感神経 β 刺激薬である isoproterenol が MMC の制癌効果を増強し, この増強作用は細胞内 adenosine 3',5'-cyclic monophosphate の上昇に伴う MMC の細胞への取り込み亢進によることを報告した。⁶⁾ 本稿では, ラット腹水肝癌 AH130 細胞における MMC の取り込み様式を細胞内及び細胞外液中の MMC 量を測定することにより検討したところ, MMC はエネルギー非依的に細胞に取り込まれるが, 細胞内ですみやかに代謝されるためその取り込みは非飽和的に進むことを示す知見を得たので報告する。

実 験 の 部

試薬 本実験で用いた試薬は次の通りである。Mitomycin C (MMC, 協和発酵), amphotericin B (Sigma), dibucaine hydrochloride (帝国化学), ouabain (Merck Japan), 2,4-dinitrophenol, sodium azide, iodoacetic acid (和光純薬)。

癌細胞 ラット腹水肝癌 AH130 細胞を雌性ドンリ्यूラット (体重 100—150 g, 静岡実験動物センター) の腹腔内に 1 週間毎に移植して継代維持した。本実験では, 細胞を移植後 7—9 日目に腹腔内より採取し, phos-

phate-buffered saline (PBS) あるいは Hanks' 溶液で洗浄することにより血球を除去した後用いた。

細胞培養 Eagle's minimum essential medium (Eagle's MEM) に細胞 (4×10^5 cells/ml) を懸濁し、各薬物で前処理した後 MMC で 30 分間処理した。処理細胞を洗浄し 10% 牛胎児血清を含む Eagle's MEM に懸濁した後 35 mm plastic petri dish (Falcon) に 2 ml ずつ分注し、37°C の CO₂ incubator で 2 日間培養した。細胞の生存率は、Trypan Blue 染色法により判定した。

MMC の取り込み量の測定 PBS に細胞 (10^7 cells/ml) を懸濁し、各薬物で前処理した後、更に MMC で処理した。細胞懸濁液を遠心後その上清中の MMC を以下に述べる方法により定量し、最初に添加した MMC 量からの減少量を MMC の取り込み量とした。また細胞 (8×10^7 cells/2 ml) を MMC (40 μ g/ml) で処理し、洗浄後処理細胞を methanol 0.5 ml 中で sonicate し、4°C で一晩放置することにより細胞内の MMC とその代謝物を抽出した。MMC とその代謝物を前報^{8b)}で述べた方法で定量、確認した。その方法を以下に簡略に述べる。

a) 分光光度法——試料の 360 nm における吸光度を分光光度計 (日立 100-20 型) で測定し、あらかじめ作製した検量線より MMC 量を算出した。

b) 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 法⁷⁾——試料をセルロース汙紙 (0.45 μ m, 東洋汙紙) で汙過後 10 又は 25 μ l を HPLC に注入し、313 nm の吸光度で MMC の代謝物を確認した。また MMC 量は、363 nm の吸光度でのピーク高さによる検量線から算出した。

装置：高速液体クロマトグラフ：Yanaco L-5000, 分光光度計：Yanaco M-315 spectromonitor 2 台, カラム：逆相 Yanapak ODS-A (25 cm $\times$ 4.6 mm)。

測定条件：移動相：10 mM リン酸緩衝液 (pH 6.0)-methanol (7:3, v/v), 流速：1 ml/min, 検出波長：313, 363 nm。

Fig. 1. Uptake of MMC into AH130 Cells under the Various Conditions

Cells (10^7 cells/ml) were exposed to MMC (10 μ g/ml) for 60 min at 37°C. Each experiment was carried out by varying incubation time (A), cell number (B), concentration of MMC (C) and incubation temperature (D).

実 験 結 果

ラット腹水肝癌 AH130 細胞による MMC の取り込み

AH130 細胞による MMC の取り込みを種々の条件下で行った。Fig. 1 は処理時間、細胞数、MMC 濃度及び処理温度を各々変えた時の MMC の取り込み量を示す。AH130 細胞への MMC の取り込み量は、処理時間と共に増加し、30 分で $1.7 \mu\text{g}/10^7 \text{ cells}$ 、120 分では $4.8 \mu\text{g}/10^7 \text{ cells}$ の MMC が取り込まれたが、その速度は処理時間と共に低下する傾向にあった (Fig. 1 A)。また MMC は、細胞数 (Fig. 1 B) 及び MMC の処理濃度 (Fig. 1 C) に比例して取り込まれた。更に MMC は、 0°C ではほとんど取り込まれないが、 22°C 以上では処理温度の上昇に伴い MMC の取り込み量も急激に増加し、 32°C で $1.3 \mu\text{g}/10^7 \text{ cells}$ 、 42°C では $3.2 \mu\text{g}/10^7 \text{ cells}$ の MMC が取り込まれた (Fig. 1 D)。

次に細胞に取り込まれた MMC を抽出し、その抽出液を HPLC で検討した。Chart 1 に示すように、細胞抽出液中には 363 nm に吸収効率の高い MMC と共に 313 nm の方が吸収効率の高い MMC の代謝物と考えられる 6 つのピークが認められた。細胞抽出液中に認められる未変化の MMC は微量であり、処理時間に無関係にほぼ一定であった。一方、代謝物は処理時間と共に増加し、特に保持時間 9.1 分と 12.1 分のピークにおける代謝物の増加が顕著であった。

そこで、細胞内に蓄積した代謝物がその後の MMC の取り込みに影響するか否かを検討した。Table I に示すように、細胞を各濃度の MMC で前処理し、代謝物が蓄積していると思われる細胞においてもその後の MMC の取り込み量は変らなかった。

次に AH130 細胞による MMC の取り込みに対する代謝拮抗剤の影響を検討した。Table II に示すように、細胞を ouabain, 2,4-dinitrophenol, sodium

TABLE I. Effect of Pretreatment with MMC on Further Uptake of MMC into AH130 Cells

Pretreated concentration of MMC ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	MMC uptake (% of initial concentration)
0	27.5 ± 1.5
2.5	25.8 ± 1.9
5.0	23.9 ± 2.9
10	25.8 ± 2.5
20	26.5 ± 2.6
40	27.6 ± 1.9

Cells ($10^7 \text{ cells}/\text{ml}$) were pretreated with varying concentrations of MMC for 60 min and then washed twice. The washed cells were further exposed to MMC ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) for 60 min at 37°C .

TABLE II. Effect of Metabolic Inhibitors on the Uptake of MMC into AH130 Cells

Inhibitors	Concentration (mm)	MMC uptake (% of non-treated cells)
Ouabain	0.1	106.8 ± 6.9
2,4-Dinitrophenol	1.0	106.9 ± 5.2
Sodium azide	1.0	113.6 ± 5.8
Iodoacetic acid	10	103.3 ± 9.3

Cells ($10^7 \text{ cells}/\text{ml}$) were pretreated with each metabolic inhibitor for 10 min and further exposed to MMC ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) for 60 min. The amounts of MMC in the supernatant of cell suspension were measured by a direct spectrophotometry except in the case of 2,4-dinitrophenol using HPLC.

Chart 1. High-Performance Liquid Chromatograms of the Cell Extract

Cells ($8 \times 10^7 \text{ cells}/2 \text{ ml}$) were exposed to MMC ($40 \mu\text{g}/\text{ml}$) for the indicated time at 37°C . Methanol extract of the cells was applied to HPLC. The wavelength of the detector was 313 nm (left panel) and 363 nm (right panel). The retention time of MMC was 14.4 min.

azide あるいは iodoacetic acid で前処理しても MMC の取り込み量は著しい影響を受けなかった。

MMC の取り込みと細胞毒性に対する Amphotericin B と Dibucaine の影響

ポリエン抗生物質の1つである amphotericin B は、種々の物質の膜透過性を高めることが知られている。⁸⁾ そこで、AH130 細胞の MMC の取り込み及び細胞毒性に対する amphotericin B の影響を検討した。Fig. 2 A に示すように、MMC の取り込み量は amphotericin B の前処理により増加し、10 $\mu\text{g/ml}$ の amphotericin B で約 2 倍に増加した。また MMC の細胞毒性も amphotericin B によって増強された (Fig. 2 B)。この相乗的な増強

Fig. 2. Effect of Amphotericin B on the Uptake (A) and the Cytotoxicity (B) of MMC

Cells (10^7 cells/ml in A and 4×10^5 cells/ml in B) were pretreated with varying concentrations of amphotericin B for 10 min and further exposed to MMC (10 $\mu\text{g/ml}$ in A and 0.05 $\mu\text{g/ml}$ in B) for 30 min. Open circle: amphotericin B, closed circle: amphotericin B+MMC.

Fig. 3. Effect of Dibucaine on the Uptake (A) and the Cytotoxicity (B) of MMC

Cells (10^7 cells/ml in A and 4×10^5 cells/ml in B) were pretreated with varying concentrations of dibucaine for 10 min and further exposed to MMC (10 $\mu\text{g/ml}$ in A and 0.3 $\mu\text{g/ml}$ in B) for 30 min. Open circle: dibucaine, closed circle: dibucaine+MMC.

効果は、amphotericin B 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ までの低濃度では明らかであったが、それ以上の高濃度では、amphotericin B 自身の細胞毒性が表れるため細胞毒性は相加的となった。

次に局所麻酔薬である dibucaine による MMC の取り込み及び細胞毒性への影響を検討した。MMC の取り込み量は、dibucaine の前処理濃度の増加と共に減少し、dibucaine 10^{-6}M では未処理細胞の約 15% の取り込み量にまで低下した。しかし、それ以上の濃度ではむしろ増加する傾向を示した (Fig. 3 A)。また MMC の細胞毒性も dibucaine の前処理により低下し、MMC 単独処理での細胞生存率は約 50% であるのに対し、dibucaine 10^{-6}M 前処理により約 70% の生存率を示した (Fig. 3 B)。しかし、 10^{-6}M 以上の濃度では dibucaine 自身の細胞毒性が表れるため細胞毒性は相加的となった。

考 察

MMC は、細胞数及び細胞懸濁液中の MMC 濃度に比例して細胞に取り込まれたが、その取り込み量は、MMC と 120 分処理した後も飽和に達しなかった (Fig. 1 A—C)。しかし、細胞への MMC の取り込みは、各種代謝阻害剤によって影響を受けなかった (Table II)。これらの結果は、ラット腹水肝癌 AH130 細胞における MMC の取り込み様式は、エネルギーに依存しない受動輸送であることを示唆している。石川は、⁸⁾ Ehrlich 腹水癌細胞における MMC の取り込み様式は、エネルギー非依存的であると報告している。また Byfield と Calabro-Jones は、⁹⁾ 増殖期と休止期の T リンパ球における制癌剤の用量-作用曲線から、MMC の他 nitrosourea 及び procarbazine などは担体非依存的に取り込まれると推論している。実際、MMC は親水性であると共に親油性でもあり、¹⁰⁾ ラット腹水肝癌 AH130 細胞においても MMC は受動拡散で取り込まれると考えられる。

ここで、MMC の取り込み様式が受動拡散ならば何故非飽和性でしかも多量の MMC を取り込みうるのかという疑問が生じる。そこで、MMC を細胞に取り込ませた後抽出し、HPLC で確認したところ、未変化 MMC は微量であり、大部分は代謝物として検出された (Chart 1)。細胞内 MMC 濃度を細胞体積 ($1300\text{ }\mu\text{m}^3/\text{one cell}$) から概算すると約 $2.1 \times 10^{-6}\text{M}$ であり、細胞懸濁液中の MMC 濃度 $1.2 \times 10^{-4}\text{M}$ の約 1.8% となり、細胞内外で MMC の濃度勾配は十分に存在すると思われる。MMC の代謝的活性化は、肝臓^{4,11)}あるいは癌細胞¹²⁾を用いて研究されている。MMC は、主にミクロソームに存在する NADPH-cytochrome P-450 reductase により還元されてアルキル化能を有する活性化体に変換され、¹³⁾ 更に数種の代謝物が生成する。¹⁴⁾ 核に存在する xanthine oxidase によっても MMC の活性化体が生成し、¹⁵⁾ また代謝物が生じることが報告されている。¹⁴⁾ その他、thioredoxin reductase や DT-diaphorase が MMC の活性化あるいは解毒化に関与することが示唆されている。¹⁶⁾ AH130 細胞に取り込まれた MMC もこれらの酵素によって代謝されるため 6 種の代謝物が生成したと考えられるが、どの酵素が主に関与しているかは明らかではない。また AH130 細胞内に蓄積した MMC の代謝物は、その後の MMC の取り込みには全く影響しないことから (Table I)、代謝物は MMC の受動拡散には拮抗しないと思われる。更に Fig. 1 D でみられた MMC 取り込みの温度依存性は、温度上昇に伴う細胞膜流動性の変化¹⁰⁾あるいは MMC 代謝酵素の温度依存性を反映していると考えられる。このように、MMC は細胞に取り込まれた後急激に代謝されるため、非飽和的に取り込みが進むものと思われる。

ポリエン抗生物質は、膜ステロールと結合し、膜構造の形態変化を生じると共に物質の膜透過性を亢進させることが知られている。¹⁷⁾ 制癌剤に関してもポリエン抗生物質の併用により制癌効果が増強されることが報告されている。^{8a)} 本実験においても高濃度の MMC による細胞毒性は、amphotericin B の低用量との併用により増強され、これは MMC の取り込み増加とよく相関した (Fig. 2)。一方、局所麻酔薬である dibucaine の併用によって MMC の取り込み及び細胞毒性は共に抑制された (Fig. 3)。水野と石田は、¹⁸⁾ mouse mammary carcinoma において、dibucaine や lidocaine の併用により MMC の細胞毒性が抑制されることを報告している。更に彼等は、bleomycin や peplomycin では局所麻酔薬によって細胞毒性が増強され、これは局所麻酔薬による Ca^{2+} 代謝の変化に起因すると推論している。MMC の取り込みや細胞毒性に対する局所麻酔薬の抑制効果の機序は知られていないが、局所麻酔薬が細胞膜あるいは MMC 代謝酵素に直接あるいは Ca^{2+} 代謝を介して抑制効果を発現しているとも考えられる。

引用文献及び注

- 1) 日本薬学会第 105 年会にて発表, 金沢, 1985 年 4 月.
- 2) G. J. Goldenberg, A. Begleiter, "Handbook in Experimental Pharmacology," Vol. 72, B. W. Fox, M. Fox, (ed.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, 1984, p. 241.
- 3) 石川雅久, 札幌医誌, **35**, 251 (1969).
- 4) H. S. Schwartz, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **136**, 250 (1962).
- 5) J. Ørstavik, *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B*, **82**, 270 (1974).
- 6) a) T. Matsunaga, M. Iwasaki, K. Miyamoto, R. Koshiura, *J. Pharmacobio-Dyn.*, **6**, 25 (1983); b) K. Miyamoto, T. Matsunaga, Y. Waki, R. Koshiura, *J. Pharmacobio-Dyn.*, **9**, 452 (1986); c) K. Miyamoto, T. Matsunaga, Y. Waki, R. Koshiura, *Jpn. J. Pharmacol.*, **40**, 350 (1986).
- 7) J. D. Hartigh, W. J. V. Oort, *Anal. Chim. Acta*, **127**, 47 (1981).
- 8) a) 桑野信彦, 癌と化学療法, **8**, 681 (1981); b) B. Deuticke, M. Kim, C. Zöllner, *Biochim. Biophys. Acta*, **318**, 345 (1973).
- 9) J. E. Byfield, P. M. Calabro-Jones, *Nature* (London), **294**, 281 (1981).
- 10) S. Wakaki, *Antibiot. Chemother.*, **8**, 228 (1958).
- 11) T. Komiyama, T. Oki, T. Inui, *J. Pharmacobio-Dyn.*, **2**, 407 (1979).
- 12) K. A. Kennedy, S. Rockwell, A. C. Sartorelli, *Cancer Res.*, **40**, 2356 (1980).
- 13) K. A. Kennedy, S. G. Sligar, L. Polomski, A. C. Sartorelli, *Biochem. Pharmacol.*, **31**, 2011 (1982).
- 14) S.-S. Pan, P. A. Andrews, C. J. Glover, N. R. Bauchur, *J. Biol. Chem.*, **259**, 959 (1984).
- 15) S. R. Keyes, D. C. Heimbrook, P. M. Fracasso, S. Rockwell, S. G. Sligar, A. C. Sartorelli, *Adv. Enzyme Regul.*, **23**, 291 (1985).
- 16) 野沢義則, 生化学, **47**, 52 (1975).
- 17) 野沢義則, 蛋白質 核酸 酵素, **22**, 115 (1977).
- 18) S. Mizuno, A. Ishida, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **105**, 425 (1982); *idem*, *Cancer Res.*, **42**, 4726 (1982).