

薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
112 (11) 837-845 (1992)

ドキソルビシン耐性に対するセファランチン効果の フローサイトメトリーによる解析

木皿重樹, 林 篤史, 前川絲子, 古沢 忍,*
高柳義男, 佐々木健一
東北薬科大学附属癌研究所

Assay of Flow Cytometry for the Effect of Cepharanthine on Resistance to Doxorubicin

Shigeki KISARA, Atsushi HAYASHI, Itoko MAEKAWA,
Shinobu FURUSAWA, Yoshio TAKAYANAGI,
and Ken-ichi SASAKI

Dept. Pharmacol. Toxicol., Cancer Res. Inst., Tohoku College
of Pharmacy, Komatsushima, Aoba-ku, Sendai 981, Japan

(Received May 1, 1992)

The biochemical activity of cepharanthine and the possible mechanism by which it reverses the resistance to doxorubicin in P388 leukemia cells were examined *in vitro*. The microfluorometric analysis of the cellular level of doxorubicin in drug-resistant cells showed that cepharanthine markedly enhanced the sensitivity of doxorubicin against resistant cells in the cellular level. Cepharanthine also enhanced the inhibitory effect of doxorubicin on the incorporation of thymidine into DNA in resistant cells. The analysis of DNA histogram obtained by flow cytometry showed that doxorubicin exerted its growth-inhibitory effect by blocking the cell cycle at the G₂ phase in P388 cells. At higher concentrations, doxorubicin prolonged the S phase and inhibited cell cycle progression to the G₂/M phase in cells. The treatment with cepharanthine potentiated these blocking effects induced by doxorubicin in cells. It seems that the modifications of the biological effect of doxorubicin by cepharanthine are due to the change of their ability to induce DNA damage in cells.

Keywords—cepharanthine; doxorubicin; P388 leukemia cells; drug-resistant cell; cell cycle; DNA damage

緒 言

アントラサイクリン系抗生物質のドキソルビシンは強力な制癌薬として臨床に繁用されるが、多剤耐性の出現は癌化学治療における大きな問題になっている。

ビスコクラウリン型アルカロイドであるセファランチンは、一般的に免疫機能増強作用、抗アレルギー作用、血液幹細胞増加作用をもち、放射線照射や制癌剤投与による白血球減少症や嘔吐症に用いられている¹⁻³⁾一方、多剤耐性に対する効果が報告されている。^{4,5)} その作用機序としては細胞膜への強い親和性により脂質構造を変化させたり、膜蛋白との相互作用など特に膜に対する作用が考えられている。このように、セファランチンは細胞膜との相互作用によって他の併用薬剤の細胞内への流入あるいは流出に作用し、また、Ca²⁺ 流入と phospholipase A₂ の阻害作用⁶⁾を有し、さらに natural killer (NK) 活性⁷⁾をはじめ、biological response modifiers (BRM)としての作用も

報告されており、制癌剤との併用療法に期待がもたれている。

先に著者ら⁸⁾は、セファランチンがドキソルビシンの耐性を改善し、ドキソルビシンの殺細胞作用を著しく高め、その抗腫瘍作用も強めることを報告した。本章では、ドキソルビン耐性細胞に対するセファランチンの作用機構をフローサイトメトリー及び顕微蛍光測光システム Argus 100 により解析した。

実 験 の 部

使用薬物 ドキソルビシンは協和発酵より購入した。セファランチン (Fig. 1) は化研生薬より供与された。これらの薬物は phosphate buffered-saline (PBS) に溶解あるいは希釈して *in vitro* の実験に用いた。

癌細胞 実験に使用したドキソルビン感受性 P388 (P388/S) 細胞は国立衛生試験所・JCRB 細胞バンク (東京) より入手した。ドキソルビン耐性 P388 (P388/DOX) 細胞は培養フラスコ内で初め低濃度のドキソルビンと接触させ、徐々に高濃度に移行させて約 30 倍の耐性を獲得させた。

培養方法 P388/S 及び P388/DOX 細胞は 10% 仔牛血清, 5×10^{-5} M 2-mercaptoethanol, 100 units/ml penicillin 及び 100 μ g/ml streptomycin を含む RPMI 1640 (Hazelton) 培養液にて、炭酸ガスインキュベーター中で浮遊培養した。

細胞増殖と殺細胞作用の測定 細胞培養はファルコンの培養チューブを用い、 5×10^4 個/ml の細胞数でスタートした。セファランチンは癌細胞と 24 及び 48 時間持続接触させたほか、ドキソルビンと共存下で 1 時間細胞接触させたのち、細胞を PBS にて遠心洗浄し新鮮培地で 24 及び 48 時間培養した。なお、その際にはセファランチンはドキソルビン添加の 5 分前に癌細胞に加えた。殺細胞作用は顕微鏡による trypan blue dye exclusion 法⁹⁾により判定した。

顕微蛍光測光システム Argus 100 による解析 ドキソルビシンの癌細胞における分布の測定は、癌細胞とドキソルビンとの接触 (2 時間, 37°C, CO₂ インキュベーター) によって、ドキソルビンが取り込まれた細胞を落射型蛍光顕微鏡 (Nikon DIAPHOT TDM, TMDEF2) を用いて行った。水銀ランプからの光は励起フィルター (450—490 nm) で波長を選択後、対物レンズを経て標本を照射し、細胞から生じる蛍光を吸収フィルター (590 nm) により波長を選び、超感度カメラによって測光された。これにより得られた画像を画像解析装置 (浜松ホトニクス ARGUS 100) のコントロールプログラムを使用して一定時間測光したものをデジタル値に変換し、このデータを積算後、バックグラウンドを差し引いた蛍光強度を表示した。

DNA 合成 細胞における DNA 合成は ³H-thymidine の細胞内への取り込みで測定した。このラジオアイソトープ (1 μ Ci/ml) を癌細胞 (1×10^6 個/ml) と培養したのち、癌細胞を PBS で遠心洗浄し、次いでトリクロロ酢酸 (TCA) を加え、沈澱した不溶性物質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。

フローサイトメトリーによる DNA ヒストグラムの解析 薬物と接触させた癌細胞を PBS で 2 回遠心洗浄し、薬物を含まない培養液にて、それぞれの時間培養後、癌細胞を採取し、PBS で 2 回遠心洗浄して、propidium iodide (Cycle TEST, BECTON DICKINSON) により DNA 染色したものをフローサイトメトリー (FACScan, BECTON DICKINSON) を用いて、DNA ヒストグラムを得た。なお、標準試料として chicken erythrocyte (DNA QC, BECTON DICKINSON)

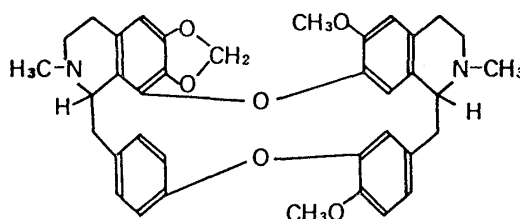


Fig. 1. Chemical Structure of Cepharanthine

を使用した。励起光として 488 nm を用い、588 nm で蛍光を測定した。

結

果

細胞内のドキソルビシンの分布

ドキソルビシン感受性であるマウス P388 細胞 (P388/S) 及びドキソルビシン耐性のマウス P388 細胞 (P388/DOX) を用いて、セファランチンを 15 分間細胞に接触させ、その後ドキソルビシンを加えて 2 時間インキュベートしたものについて取り込み量を測定した。ドキソルビシンは $5 \mu\text{g/ml}$ を用いた。3 次元表示にみられるように、P388/S 細胞では細胞の中心付近により多く存在していたが、P388/DOX 細胞ではドキソルビシンは細胞膜の周辺部に多くみられた。また、P388/DOX 細胞においてセファランチンを併用した場合にはドキソルビシンの細胞内への取り込み量の増大がみられた (Fig. 2)。

DNA 合成

P388/S 及び P388/DOX 細胞における ^3H -thymidine の細胞内取り込みにより細胞の DNA 合成への影響を検討した。

Fig. 3 に示すように、ドキソルビシンの核酸合成阻害は耐性細胞では著しく低下した。ドキソルビシン ($0.1\text{--}0.5 \mu\text{g/ml}$, 2 時間細胞接触) による ^3H -thymidine の耐性細胞への取り込み阻害の低下は、セファランチン ($1 \mu\text{g/ml}$) の処理により改善する傾向を示し、特に低濃度で強く認めた。このようにドキソルビシンの ^3H -thymidine の取り込み阻害に関して、セファランチンはドキソルビシンの効果を増強することを認めた。なお、実験に用いた濃度のセファランチンでは、 ^3H -thymidine の取り込みには影響はみられなかった。

フローサイトメトリーによる DNA ヒストグラムの分析

P388/S 及び P388/DOX 細胞の細胞周期に対するセファランチンの効果をフローサイトメトリーを用いて検討し、その結果を Fig. 4 及び Table I に示した。セファランチンの 24 時間の細胞接触は P388/S, P388/DOX 細胞ともに G_2/M 期をやや蓄積させ、とくに高濃度では G_1 期への移行が抑制されており、細胞の進行停止

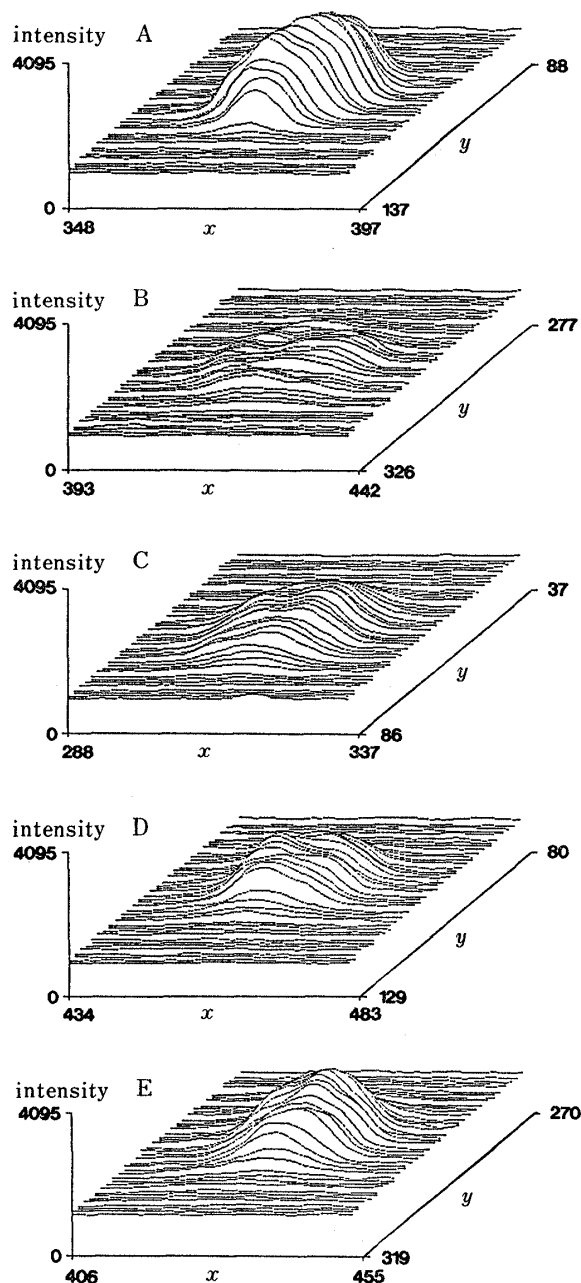


Fig. 2. Microfluorometric Analysis of the Cellular Level of Doxorubicin (DOX) of DOX-Sensitive P388 (P388/S) or -Resistant P388 (P388/DOX) Cells

P388/S cells were exposed to DOX ($5 \mu\text{g/ml}$, A) for 2 h. P388/DOX cells were exposed to DOX ($5 \mu\text{g/ml}$, B) in the presence or absence of cepharanthine (0.2 (C), 1 (D) and 5 (E) $\mu\text{g/ml}$) for 2 h.

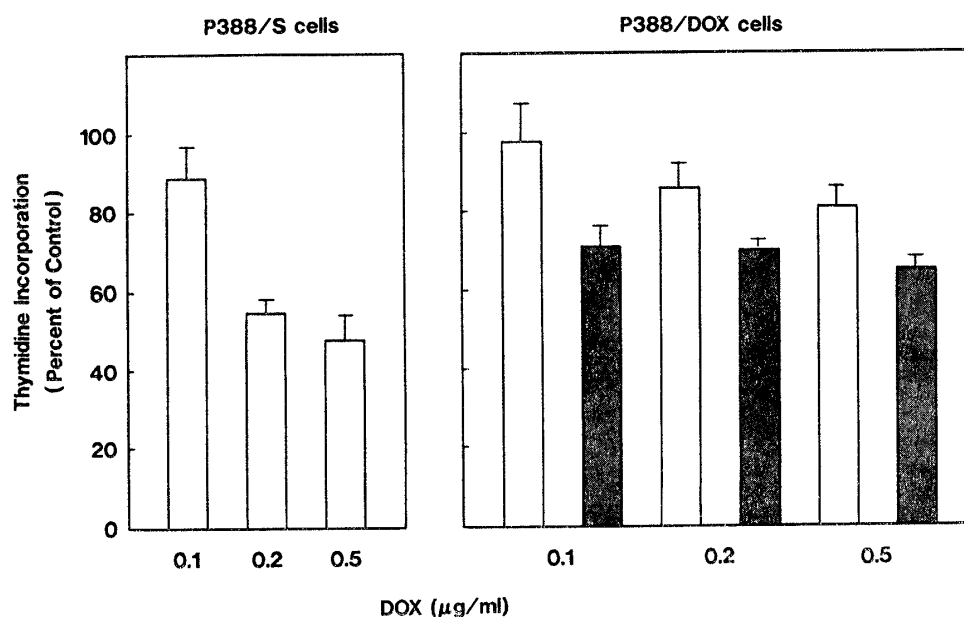


Fig. 3. Effect of Cepharanthine on DNA Synthesis Inhibition of DOX in P388/S and P388/DOX Cells

Cells (1×10^6 cells) were exposed to 0.1–0.5 µg/ml DOX in the presence (■) or absence (□) of cepharanthine (1 µg/ml) for 2 h at 37°C and cells were labeled for 1 h with ^3H -thymidine (1 µCi/ml).

TABLE I. Effect of Cepharanthine on the Cell Cycle Phase Distribution of P388/S and P388/DOX Cells

Cepharanthine (µg/ml)		P388/S cells			P388/DOX cells		
		G ₁	S	G ₂ /M	G ₁	S	G ₂ /M
24 h	0	54.3	37.8	7.9	57.1	36.4	6.5
	1	50.5	41.1	8.4	51.8	35.2	12.9
	2	47.3	48.4	4.4	52.3	35.4	12.3
	5	47.3	40.2	12.6	35.8	52.9	11.2
	10	39.0	46.9	14.1	33.1	53.9	13.0
48 h	0	55.5	35.8	8.7	56.0	38.7	5.3
	1	41.9	51.1	7.0	36.1	59.3	4.6
	2	38.1	48.2	13.7	33.2	62.2	4.5
	5	35.7	36.9	27.4	25.9	45.5	28.6
	10	27.5	58.8	13.7	19.6	70.3	10.1

Cells were exposed to cepharanthine for 24 or 48 h at 37°C.

作用が認められた。なお、その傾向は 48 時間後で強くみられ、5 µg/ml のセファランチンを用いた場合、P388/DOX 細胞ではとくに S 期の蓄積と G₁ 期の減少を認めた。また、10 µg/ml の濃度ではほとんどの癌細胞が死滅した状態であった。P388/S 及び P388/DOX 細胞の両細胞においては DNA パターンはほとんど差異が認められなかった。

次に、ドキソルビシンを P388/S 細胞と 1 時間接触後、細胞を遠心洗浄し新鮮培地に移し、さらに、24, 48 時間培養してフローサイトメトリーにより DNA 周期の変動を経時的に観察した。

24 時間後に P388/S 細胞の DNA ヒストグラムを分析した場合、ドキソルビシン (0.2–2 µg/ml)

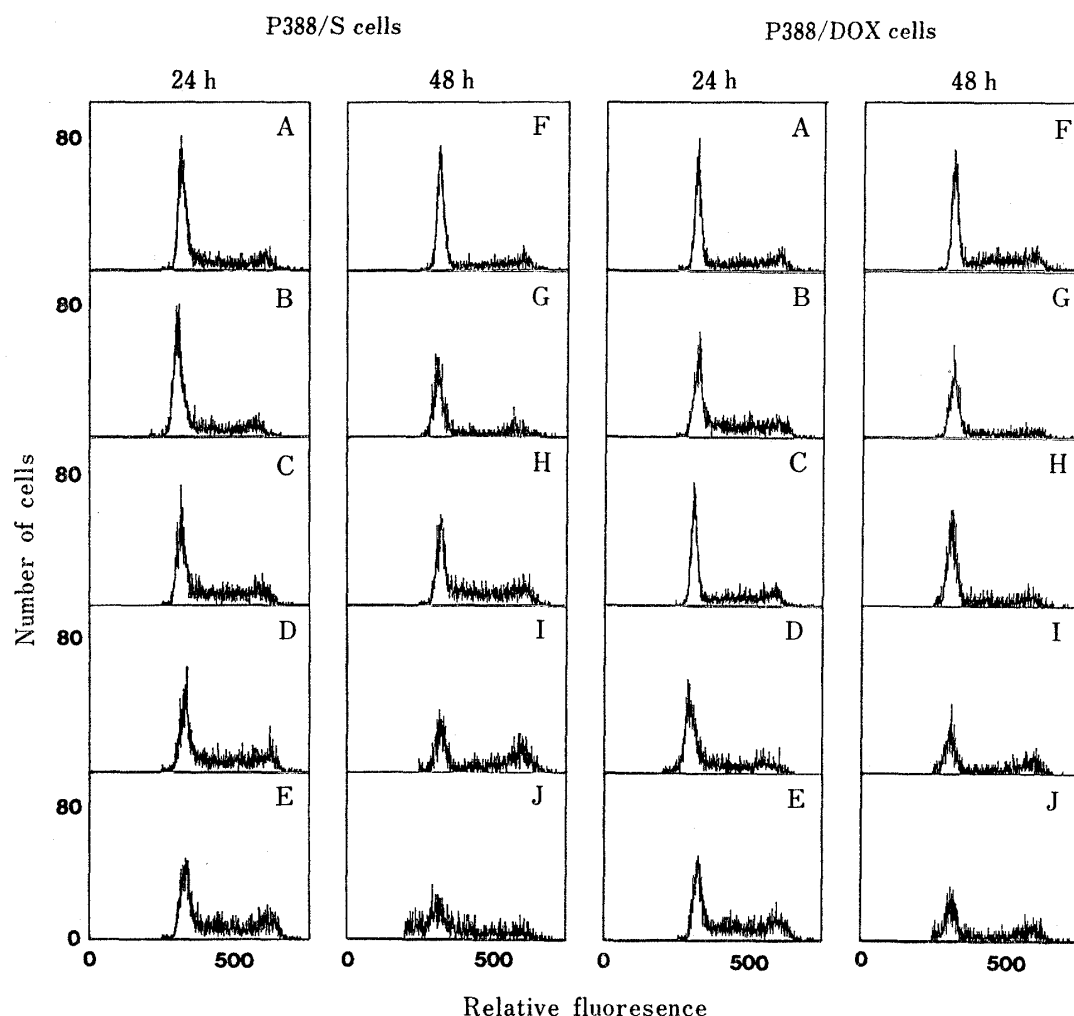


Fig. 4. Cepharanthine-Induced DNA Damage in P388/S and P388/DOX Cells

Cells were exposed to cepharanthine for 24–48 h. Changes in cell progression were analyzed with a flow cytometer (FACScan). A, F, control; B, G, cepharanthine 1 $\mu\text{g/ml}$; C, H, cepharanthine 2 $\mu\text{g/ml}$; D, I, cepharanthine 5 $\mu\text{g/ml}$; E, J, cepharanthine 10 $\mu\text{g/ml}$.

により G_1 期が減少し, G_2/M 期の増加の傾向が認められた (Fig. 5, Table II).

一方, 同じ 24 時間後に P388/DOX 細胞ではドキソルビシンによって大きな影響はみられず, 対照と同じ DNA ヒストグラムパターンを示した (Fig. 6). また, セファランチンとの併用では, ドキソルビシンを高濃度 (2 $\mu\text{g/ml}$) 使用した際に G_1 期が減少し G_2/M 期の増加を認めた (Table III). このことにより, ドキソルビシンの細胞回転に対する効果に対してセファランチンが影響することが明らかになった.

なお, 48 時間経過した場合には, とくにドキソルビシンを高濃度使用したときに, S 期の進行停止, あるいは細胞周期の進行停止作用がみ

TABLE II. Cell Cycle Phase Distribution of P388/S Cells after Treatment with DOX

Culture period	Phase	DOX ($\mu\text{g/ml}$)				
		0	0.2	0.5	1	2
24 h	G_1	55.0	44.8	45.8	40.3	38.2
	S	41.9	48.9	45.9	50.9	45.4
	G_2/M	3.2	6.4	8.3	8.8	16.5
48 h	G_1	51.4	32.7	16.7	13.7	—
	S	42.5	58.0	58.6	58.5	—
	G_2/M	6.0	19.3	24.8	27.8	—

P388/S cells were treated with DOX for 1 h. Flow cytometry was performed immediately after incubation in fresh medium for 24 or 48 h.

られた。

考 察

膜脂質のモジュレーターは制癌薬の作用に大きく影響する。¹⁰⁾ セファランチンは細胞膜を形成する脂質二重膜の内葉（細胞質側の脂質層）へ速やかに取り込まれ、¹¹⁾ 細胞膜機能の修飾作用を示すといわれる。

細胞膜を構成する分子は膜内を速く側方移動している。その運動は膜の脂質流動性として表現され、膜の柔らかさを示す1つの指標となっている。この流動性は、コレステロールのように比較的化学構造の堅い化合物が膜に挿入されると、その物質の挿入量に依存して低下し、リン脂質の配列がパッキングされ、膜機能も低下する。癌細胞では細胞膜内コレステロールの含有量が少なくなっており、そのため膜としての機能は正常細胞よりも高くなっている。

セファランチンはコレステロールと同じように膜流動性を低下させる作用をもつが、^{12,13)} その取り込まれる部位はコレステロールのそれと異なっていると考えられている。膜脂質の分子配列は定常状態ではかなり一定に保持されていて、膜攪乱物質 (membrane perturber) と呼ばれるものは、この配列を攪乱し分子運動を高めて膜の区画性を低下させたり (透過性の促進)、他の膜機能を阻害する。

落射型蛍光顕微鏡と画像解析装置からなる顕微蛍光測光システム Argus 100 は、フローサイトメトリーに比べ細胞などの形態の観察ができる上に生きた細胞を使用することができることから、細胞外からの刺激に対する細胞内物質の経時的な変化を観察することが可能である。

このシステムにより個々の細胞の薬物レベルをみた場合、ドキソルビシンの示す赤色蛍光は感受性細胞では細胞内全体に分布していたが、耐性細胞では細胞内部の分布は少なく、細胞膜周辺部に点在しているのが観察され、感受性細胞と耐性細胞ではドキソルビシンの分布に差異が観察された。このような P388/DOX 細胞におけるドキソルビシンの細胞内レベルの低下は、セファランチンにより抑制された。

ドキソルビシンの殺細胞作用の主な作用機序としては、DNA との結合による核酸合成の阻害が考えられている。2 本鎖 DNA 塩基対の間にドキソルビシンが平行にインターカレーションし、DNA の鋳型 (template) としての機能を失わせ、DNA 依存性の DNA 及び RNA 合成を阻害することから、class I の anthracycline に分類されている。¹⁴⁾ ドキソルビシンはその他に、DNA-トポイソメラーゼ II complex を安定化することにより DNA-トポイソメラーゼ II を阻害し、¹⁵⁾ 2 本

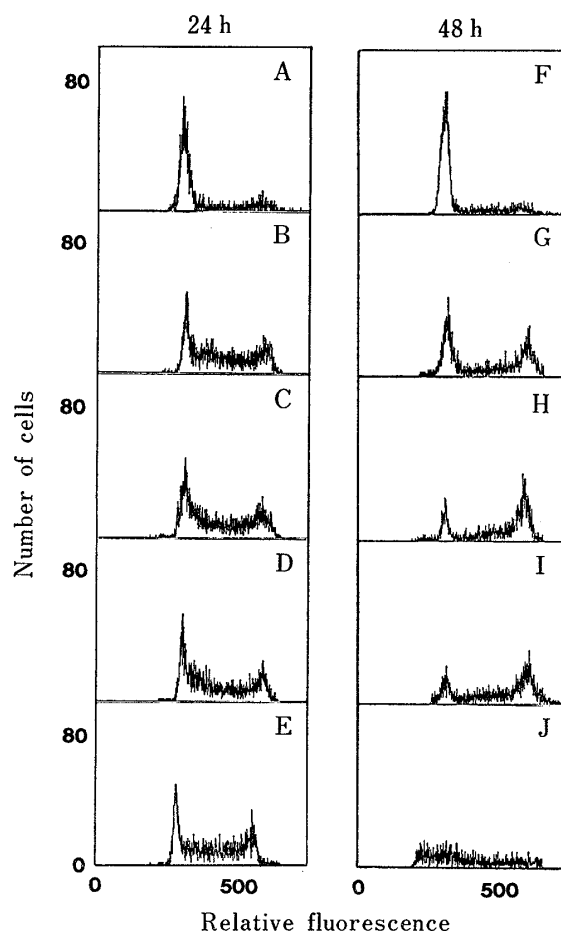


Fig. 5. DNA Histograms of P388 Cells Treated with DOX

For DNA damage studies, cell cultures were exposed to DOX for 1 h, rinsed with cold phosphate buffered saline, and incubated in drug-free medium for 24–48 h. A, F, control; B, G, DOX 0.2 µg/ml; C, H, DOX 0.5 µg/ml; D, I, DOX 1 µg/ml; E, J, DOX 2 µg/ml.

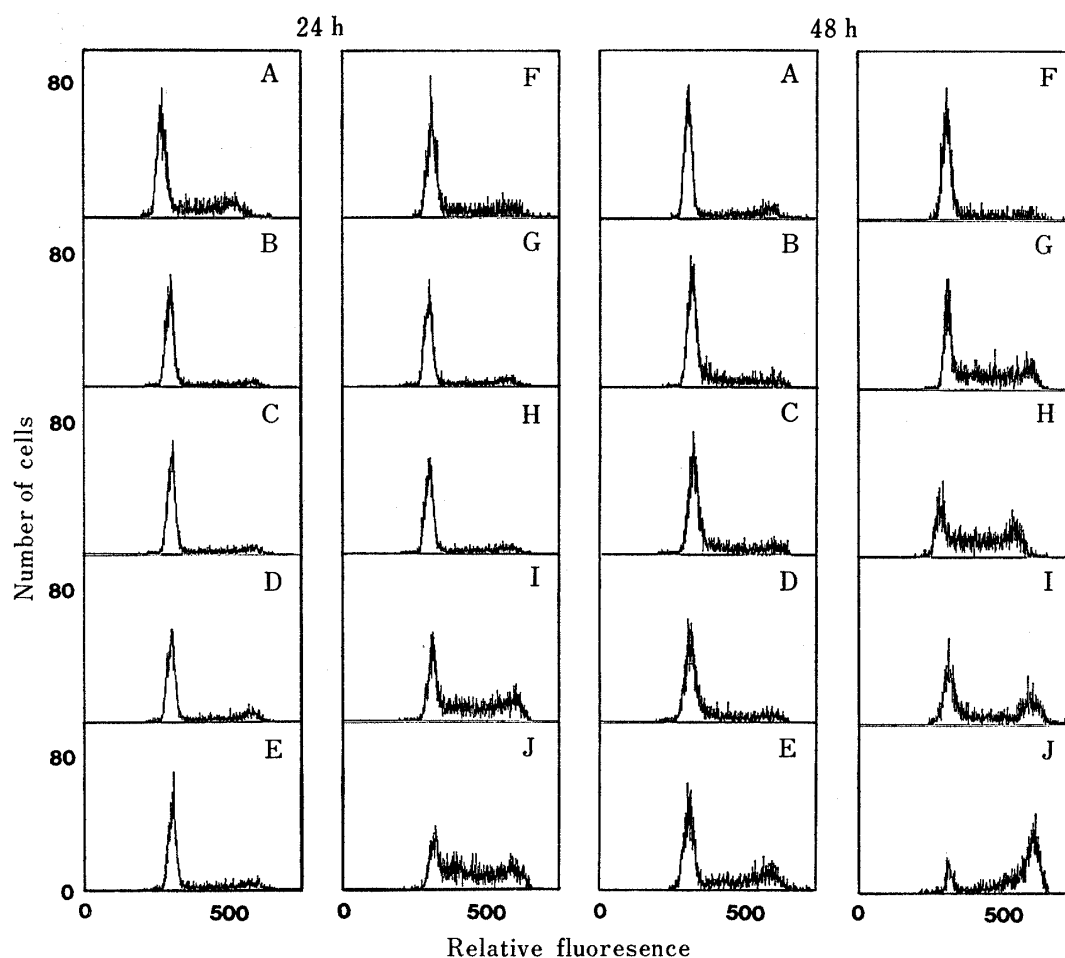


Fig. 6. DNA Histograms of P388/DOX Cells Treated with DOX Combined with Cepharanthine

For DNA damage studies, cell cultures were exposed to drugs for 1 h, rinsed with cold phosphate buffered saline, and incubated in drug-free medium for 24–48 h. A, control; B, DOX 0.2 $\mu\text{g/ml}$; C, DOX 0.5 $\mu\text{g/ml}$; D, DOX 1 $\mu\text{g/ml}$; E, DOX 2 $\mu\text{g/ml}$; F, cepharanthine 1 $\mu\text{g/ml}$; G, DOX 0.2 $\mu\text{g/ml}$ plus cepharanthine 1 $\mu\text{g/ml}$; H, DOX 0.5 $\mu\text{g/ml}$ plus cepharanthine 1 $\mu\text{g/ml}$; I, DOX 1 $\mu\text{g/ml}$ plus cepharanthine 1 $\mu\text{g/ml}$; J, DOX 2 $\mu\text{g/ml}$ plus cepharanthine 1 $\mu\text{g/ml}$.

TABLE III. Cell Cycle Phase Distribution of P388/DOX Cells after Treatment with DOX Alone, or Combined with Cepharanthine

Treatment	Phase	DOX ($\mu\text{g/ml}$)				
		0	0.2	0.5	1	2
24 h						
Control	G ₁	53.7	53.8	54.8	54.8	52.7
	S	39.5	39.0	40.7	38.3	39.3
	G ₂ /M	6.9	7.3	4.5	7.3	8.0
Cepharanthine (1 $\mu\text{g/ml}$)	G ₁	52.9	56.0	54.4	46.5	39.1
	S	39.8	37.8	39.3	39.5	31.6
	G ₂ /M	7.3	6.3	6.3	14.0	29.3
48 h						
Control	G ₁	55.9	56.9	53.2	50.0	54.9
	S	37.0	37.7	41.5	44.7	35.6
	G ₂ /M	7.2	5.4	5.3	5.2	9.5
Cepharanthine (1 $\mu\text{g/ml}$)	G ₁	54.6	52.3	43.3	41.7	12.2
	S	36.5	39.8	34.7	38.3	48.5
	G ₂ /M	8.9	8.4	22.0	20.0	39.3

P388/DOX cells were treated with DOX for 1 h in the presence or absence of cepharanthine (1 $\mu\text{g/ml}$). Flow cytometry was performed immediately after incubation in fresh medium for 24 or 48 h.

鎖 DNA の切断を起こしたり、あるいは活性酸素や過酸化脂質を生じさせたりする。

P388/DOX 細胞における ^3H -thymidine の取り込み実験において、ドキソルビシンの取り込み阻害作用は感受性細胞に比べ弱かったが、セファランチンを併用することによりドキソルビシンの阻害作用が強まることを認めた。このことは、ドキソルビシンの DNA 合成阻害に対するセファランチンの増強効果を示唆している。このように、セファランチンの作用の増強機構としては、癌細胞内のドキソルビシン濃度が上昇することに伴い DNA 合成の阻害が強められたことが大きく関係しているものと思われる。

ドキソルビシンの細胞回転に及ぼす作用は主に、 G_2 期ブロック¹⁶⁾が中心であり、濃度を上げるに従い S 期の進行停止、さらには細胞周期進行停止作用を示し、細胞の増殖抑制をきたすことが知られている。フローサイトメトリーによる P388/DOX 細胞の DNA ヒストグラムの分析から、ドキソルビシンによる G_2 期ブロックはセファランチンによって強められ、 G_2/M 期蓄積の増大を引き起こした。なお、ドキソルビシンの高用量ではとくに感受性の高い細胞に対し、S 期さらには細胞周期全体の進行停止を示し、これらにより増殖抑制をきたしたものとする。P388/DOX 細胞に対するセファランチンの作用は、このように、ドキソルビシンの G_2 期ブロックの増大に起因したものと思われる。

多剤耐性細胞ではその細胞膜上にいわゆる P-糖タンパク^{17,18)}が出現し、それがポンプの役割をしているいろいろな種類の制癌薬を細胞内から排出することが分かってきた。カルシウム拮抗薬による耐性の改善^{19,20)}は P-糖タンパクに作用することによるものといわれる。セファランチンの作用も細胞膜の P-糖タンパクの機能障害によるものと考えられている。

本報でのこれらの結果は、前報⁸⁾での 30 倍ほどのドキソルビシン耐性がセファランチンにより 6 分の 1 に改善されるというセファランチンの作用を説明するもので、その作用機構に関しては、今後さらに詳細な検討が必要である。

引用文献

- 1) N. Shiraishi, T. Arima, K. Aono, B. Inoue, Y. Morimoto, K. Utsumi, *Physiol. Chem. Phys.*, **12**, 299 (1980).
- 2) Y. Nishashi, Y. Koga, H. Gondo, K. Taniguchi, K. Nomoto, *Immunobiol.*, **170**, 351 (1985).
- 3) 阿部 岳, 稲村伸二, 赤須通範, 日薬理誌, **98**, 327 (1991).
- 4) K. Taketoshi, S. Yasuko, *J. Natl. Cancer Inst.*, **79**, 527 (1987).
- 5) H. Ito, H. Ito, H. Amano, H. Noda, *Jpn. J. Pharmacol.*, **56**, 195 (1991).
- 6) S. Watanabe, *Acta Med. Okayama*, **38**, 101, (1984).
- 7) 雁木淳一, 小野 稔, 後藤精俊, 紙谷普吾, 卜部貴光, 田中紀彰, 第 11 回アルカロイド研究報告集, 43 (1985).
- 8) T. Fujimura, H. Shibata, I. Maekawa, S. Furusawa, H. Kawauchi, K. Sasaki, Y. Takayanagi, *Jpn. J. Pharmacol.*, **54**, 464 (1990).
- 9) L. M. Weisenthal, J. A. Marsden, P. H. Dill, C. K. Macaluso, *Cancer Res.*, **43**, 749 (1983).
- 10) A. A. Spector, C. P. Burns, *Cancer Res.*, **47**, 4529 (1987).
- 11) T. Sato, Y. Kanaho, T. Fujii, *Cell Struct. Funct.*, **15**, 155 (1980).
- 12) K. Utsumi, M. Miyahara, K. Sugiyama, I. Sasaki, *Arch. Histochem. Cytochem.*, **9**, 59 (1976).

- 13) S. Nagatsuka, S. Nakazawa, *Biochem. Biophys. Acta*, **691**, 171 (1982).
- 14) 藤田 浩, 癌と化学療法, **18**, 2627 (1991).
- 15) K. M. Tewey, T. C. Rowe, L. Yange, B. D. Halligan, L. F. Liu, *Science*, **226**, 466 (1984).
- 16) P. G. Parsons, J. Lean, S. K. Khoo, J. Lark, *Biochem. Pharmacol.*, **38**, 31 (1989).
- 17) G. Bradley, M. Naik, V. Ling, *Cancer Res.*, **49**, 2790 (1989).
- 18) G.-M. Lai, Y.-N. Chen, L. A. Mickley, A. T. Fojo, S. E. Bates, *Int. J. Cancer*, **49**, 696 (1991).
- 19) M. Chatterjee, C. N. Robson, A. L. Harris, *Cancer Res.*, **50**, 2818 (1990).
- 20) N. A. Bruno, D. L. Slate, *J. Natl. Cancer Inst.*, **82**, 419 (1990).