

がん

クラリスロマイシンとエトポシド併用による肺腺癌に対する抗腫瘍作用とアポトーシス誘導について

及川 卓¹⁾ 南部静洋²⁾ 土原千春¹⁾ 館 由貴¹⁾ 八田理恵子¹⁾
 中川 研¹⁾ 土原一真¹⁾ 井口晶晴¹⁾ 戸部勇保¹⁾ 高橋昌克¹⁾
 石垣昌伸¹⁾ 長内和弘¹⁾ 梅 博久¹⁾

はじめに

肺癌に対するマクロライドの抗腫瘍作用の機序について、血管新生の抑制、癌細胞のマトリゲルへの浸潤や細胞外マトリックスに対する接着の阻害、NK活性の低下、サイトカイン産生など様々な報告がある。また、抗腫瘍剤とマクロライドとの併用効果についても報告がなされている¹⁾。

今回、VP-16にCAMを併用することによる肺腺癌に対する抗腫瘍作用の増強およびアポトーシス誘導の増強効果を明らかにするため、*in vitro*および*in vivo*実験にて検討した。また、アポトーシスの機序についても*in vitro*実験にて検討した。

方法

1. CAM, VP-16の抗腫瘍作用

A549細胞, LCSC#1細胞を96ウェル培養プレートに播種し, 24時間培養した。CAM (10, 50 $\mu\text{g/ml}$), VP-16 (1 ~ 4 $\mu\text{g/ml}$) の濃度で添加し, 48時間培養後, Cell Counting Kit-8を用いた測定法 (MTT法) にて評価した。

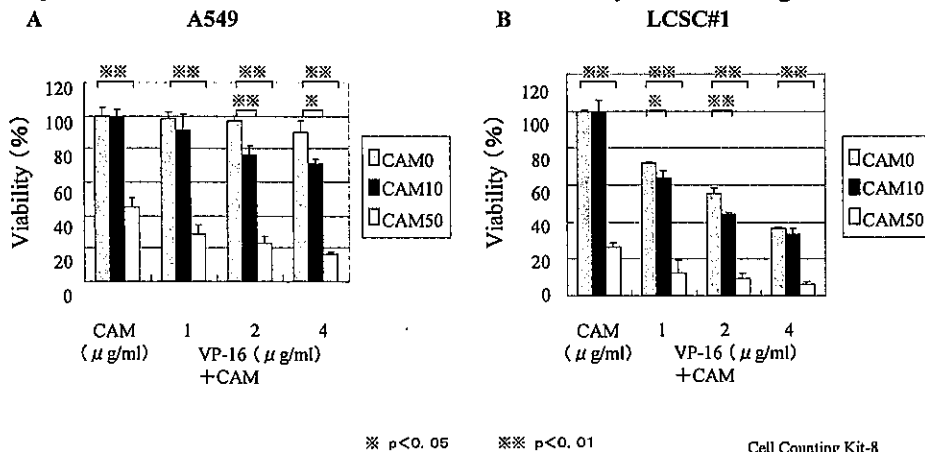
2. アポトーシス感受性

A549細胞, LCSC#1細胞を6ウェル培養プレートに播種し, 24時間培養した。CAM (10, 50 $\mu\text{g/ml}$), VP-16 (2 $\mu\text{g/ml}$) を添加し, 16時間培養後に細胞を回収し, Annexin V Apoptosis Detection Kit-1にて反応させた後, FACSにて解析した。

3. アポトーシス関連蛋白の発現

A549細胞, LCSC#1細胞を6ウェル培養プレ-

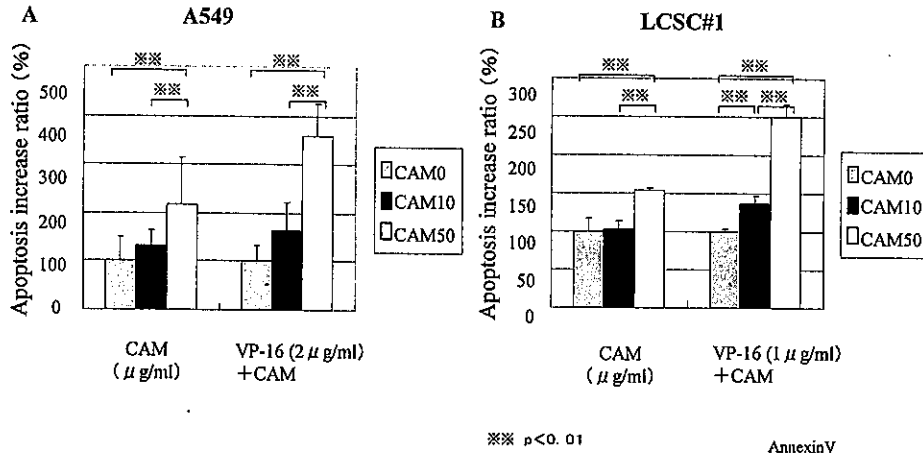
Fig. 1. Effect of VP-16, CAM, or VP-16+CAM on viability (48hr) in lung cancer cells.



CAM decreased viability of both A549 and LCSC#1 cells in a dose-dependent manner under VP-16 administration. CAM augmented the anti-tumor effect of VP-16.

¹⁾ 金沢医科大学呼吸機能治療学呼吸器内科, ²⁾ 日本イーライリリー株式会社

Fig. 2. Effect of VP-16, CAM, or VP-16 + CAM on apoptosis induction in lung cancer cells.



CAM augmented the apoptosis induction effect of VP-16 in a dose-dependent manner.

トに播種し、24時間培養した。CAM (10, 50 μg/ml), VP-16 (2 μg/ml) を添加し、16時間培養後に蛋白を抽出し、Western blotting法にて検討した。

4. LL/2細胞皮下移植マウスに対する抗腫瘍作用
LL/2細胞 1×10^5 cells/0.1ml を雌性C57BL6マウス (6週齢) の右鼠径部皮下に移植した。7日後に腫瘍径を測定し、control群、CAM単独群、VP-16単独群、CAMとVP-16併用群の計4群 (1群5匹) に分け、経口ゾンデ針でCAM (16mg/kg/day), VP-16 (0.5mg/kg/day) の強制胃内投与を連日1回14日間行い、経時的な腫瘍体積および体重を測定した。14日後に腫瘍を摘出し、ApopTag Peroxidase ISOL Kitを用いて染色し、アポトーシス数を顕微鏡下に評価した。

結果

1. A549細胞、LCSC#1細胞に対する腫瘍増殖抑制作用 (Fig. 1)

両細胞株において、VP-16投与下の肺腺癌細胞にCAMを併用することにより、VP-16単独投与と比較し有意差 ($P < 0.05$) をもって抗腫瘍作用の増強を認めた。

2. A549細胞、LCSC#1細胞に対するアポトーシス誘導 (Fig. 2)

両細胞株ともに、VP-16投与下にCAMを併用した群においては、同量のCAMを単独投与した場合

と比較し、より高度のアポトーシス細胞の増加を認めた。

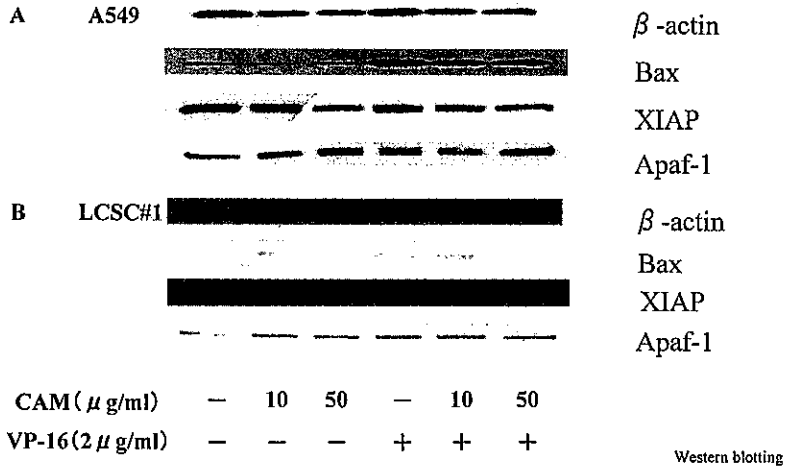
3. アポトーシス関連蛋白の発現 (Fig. 3)

A549細胞において、VP-16単独使用でBax発現亢進を認めたが、VP-16にCAMを併用しても更なるBaxの発現亢進は認められなかった。VP-16を単独投与してもXIAP発現は変化しなかったが、CAMを併用することにより軽度XIAPの発現抑制、Apaf-1の軽度発現亢進を認めた (Fig. 3A)。VP-16, CAM投与は、Bcl-2, Bcl-x1, Bad, JNKおよびTRADDの発現に影響しなかった (data not shown)。

4. 皮下移植LL/2細胞に対する抗腫瘍効果

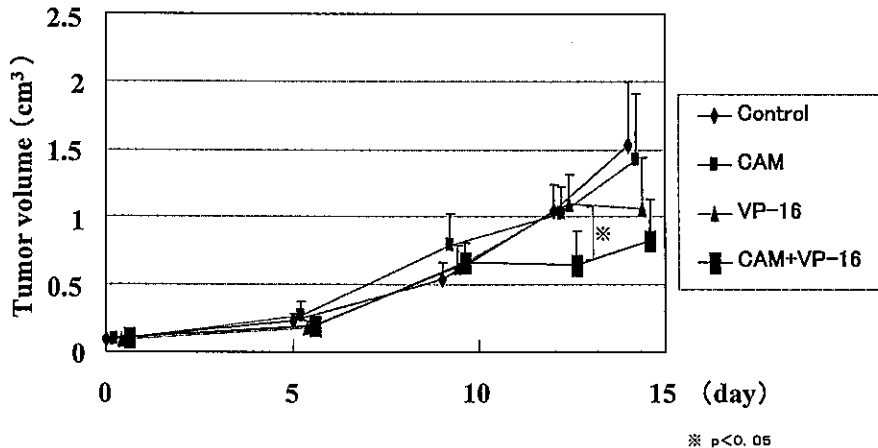
VP-16にCAMを併用した群では投与後12日目より他群 (control群、CAM群、VP-16群) と有意差 ($P < 0.05$) をもって抗腫瘍作用の増強 (腫瘍増大抑制作用) を認めた (Fig. 4)。体重変化には各群間で有意差は認められなかった (Fig. 5)。さらに薬剤投与14日後のマウス腫瘍組織中のアポトーシス細胞の割合について検討した結果、VP-16単独群と比較しVP-16にCAMを併用した群では更なるアポトーシス細胞の増加を認めた (Fig. 6: 各群間での光学顕微鏡400倍1視野下のアポトーシス細胞数の割合は、control群1.8%, CAM群0.8%, VP-16群14.8%, VP-16+CAM群26.8%であった)。

Fig. 3. Expression of apoptosis-related proteins in lung cancer cells (Western blot).



CAM tended to reduce XIAP expression both in A549 and LCSC#1 cells. VP-16 augmented Bax expression in A549 cells, but there was no further augmentation of Bax expression by CAM administration.

Fig. 4. Changes in tumor volume after administration of VP-16, CAM, or VP-16 + CAM in LL/2 injected mice.



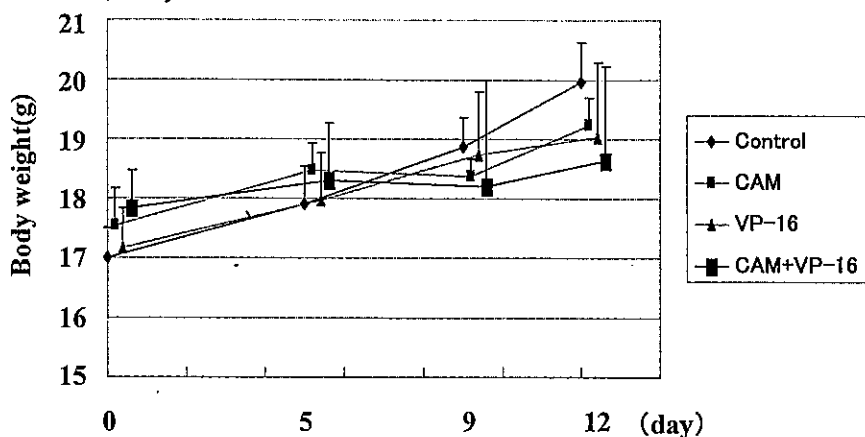
Increase in tumor volume was suppressed by VP-16 + CAM administration. CAM significantly augmented the anti-tumor effect of VP-16 in LL/2 injected mice *in vivo*.

考 察

*In vitro*および*in vivo*実験において、VP-16にCAMを併用することによる抗腫瘍作用とアポトーシス誘導の増強が認められた。抗癌剤にCAMを併用することにより細胞の抗癌剤耐性に関わるP糖蛋白の抑制を介して細胞内の抗癌剤濃度が上昇する可能性があるとの報告がある¹⁾。今回はVP-

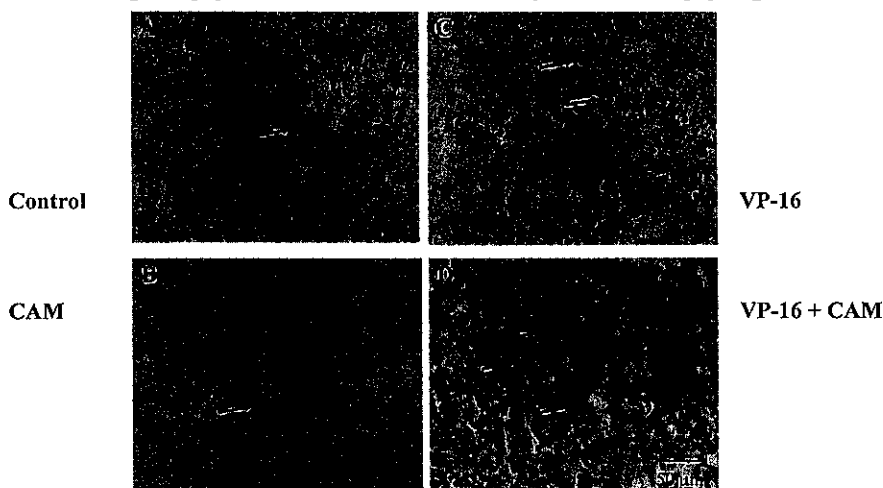
16の細胞内濃度を測定しなかったが、VP-16にCAMを併用することによりアポトーシス誘導が増強されていることが判明したため、アポトーシス増強機序に注目して検討した。VP-16のアポトーシスについては、過去の検討でBaxを介して細胞をアポトーシスへ導くことが知られており^{2,3)}、今回の実験でも、A549細胞にVP-16を投与

Fig. 5. Changes in body weight after administration of VP-16, CAM, or VP-16 + CAM in LL/2 injected mice.



There were no significant differences in body weight among the groups.

Fig. 6. Apoptosis in tumor tissue in LL/2 injected mice (Apop Tag).



Number of apoptotic cells (arrows) was greater in tumor tissue treated by CAM + VP-16 than that treated by VP-16 alone. CAM augmented the apoptosis induction effect of VP-16.

することによるBaxの発現増加を認めた。しかし、VP-16にCAMを併用しても更なるBaxの発現増加は認められなかった。このことよりVP-16にCAMを併用することによるアポトーシス増強は、抗癌剤のBaxを介する作用を増強するものではなく、別の機序がアポトーシス増加に関与していると考えられた。今回の検討ではA549細胞、LCSC#1細胞ともにWestern blotting法にてチトクロームc下

流にあたるアポトーシス関連蛋白であるXIAP発現の軽度抑制が認められた。XIAPが今回のアポトーシス亢進に関与している可能性が示唆されるが、XIAPの抑制は軽度であり、この機序のみですべてを説明しうるとは考えにくい。

今回の*in vivo*実験における検討では、VP-16にCAMを併用することによる体重減少を認めなかった。つまり宿主への副作用を増強させることな

く、抗腫瘍作用およびアポトーシス誘導の増強効果を期待できる可能性が示唆された。

今後、XIAPmRNA発現の検討や、その他の機序に関する検討が必要と考えている。

謝 辞

この研究は文部科学省科学研究費補助金 (C) (2) (16590768), 金沢医科大学HRCプロジェクト研究 (H2003-6, H2004-6), 同共同研究 (C2003-2, C2004-2) により行われた。

文 献

1) 北市清幸, 王 莉, 蔡 紹暉, 他: マクロライド系

抗生物質のP糖蛋白阻害作用: 癌細胞の抗癌剤耐性およびP糖蛋白の基質となりうる薬剤の体内動態への影響。Jpn. J. Antibiot. 54: 49~52, 2001

- 2) JIA L., PATWARI Y., SRINIVASULA S. M., *et al.*: Bax translocation is crucial for the sensitivity of leukemic cells to etoposide-induced apoptosis. *Oncogene* 20: 4817~4826, 2001
- 3) MIAO L., YI P., WANG Y., *et al.*: Etoposide upregulates Bax-enhancing tumour necrosis factor-related apoptosis inducing ligand-mediated apoptosis in the human hepatocellular carcinoma cell line QGY-7703. *Eur. J. Biochem.* 270: 2721~2731, 2003