

がん

肺腺癌の浸潤能に及ぼすクラリスロマイシンの効果

和田敏弘 佐田 誠 佐藤 潤 町屋純一 平間紀行 井上純人 高島典明
柴田陽光 久保田 功

はじめに

マクロライド系抗生剤のclarithromycin (CAM) には、抗菌作用や抗炎症作用の他に抗腫瘍効果があることが示唆されている¹⁾。実際、切除不能非小細胞肺癌患者への長期CAM投与が生存期間中央値の延長につながったとする報告もある²⁾。

しかし、肺癌に対するの抗腫瘍効果については、そのメカニズムも含め未だ不明な点が多く残されている。そこで我々は、肺腺癌細胞におけるCAMの細胞増殖能と浸潤能に対する効果について検討した。

材料及び方法

ヒト肺腺癌細胞のA549細胞を使用した。また、CAMはmethanolで溶解し、終濃度2 mg/ml, 4℃で保存した。

1) 細胞増殖能

2×10^4 個の細胞を、RPMI1640+10%FBS培地を含む96穴滅菌プレートに添加し24時間培養した。その後、CAM30 μ g/mlを含む無血清RPMI1640培地で培養した。CAM投与後、5, 24, 48, 72時間後にalamarBlue assayを用いて細胞増殖能を検討した。

2) 細胞浸潤能

細胞浸潤能は、Matrigel invasion assayを用いて検討した。CAM (0, 1, 10, 30 μ g/ml) を含む無血清RPMI 1640+1.5%methanol培地にて3日間培養した後細胞を回収し、24穴用cell culture insert (Becton Dickinson) に 2.5×10^4 個の細胞を添加した。また、NIH3T3細胞で24時間培養したRPMI 1640をchemoattractantとしてチャンパー下層に添加した。24時間後、下層表面に浸潤してきた細胞

を光学顕微鏡 $\times 200$ で数え、各群5視野の平均値で検討した。

3) Immunoblotting analysis

CAM (0, 1, 10, 30 μ g/ml) を含む無血清RPMI 1640+1.5%methanol培地にて3日間培養した後、lysis bufferにて蛋白を回収。Western blot analysisにてthymidine phosphorylase (TP) の発現を検討した。

4) RT-PCR

CAM (0, 1, 10, 30 μ g/ml) を含む無血清RPMI 1640+1.5% methanol培地にて3日間培養した後、TrizolにてRNAを抽出し、RT-PCRにてmatrix metalloproteinase (MMP)-2の発現量を評価した。

5) 細胞運動能

細胞運動能は、金コロイド法を用いて検討した。金コロイド粒子が付着したカバーガラスを35mm dishに置き、CAM (0, 1, 10, 30 μ g/ml) を含む無血清RPMI 1640+1.5%methanol培地2 ml加えた。各群に2000個の細胞を添加し、24時間後、細胞運動により金コロイドが剥れた部分の面積を測定することで細胞運動能を評価した。

結 果

細胞増殖能に対する、CAMの効果はalamarBlue assayにて検討した。CAM 30 μ g/ml投与群と、コントロール群とでは、細胞増殖能に有意な差は認められなかった (Fig. 1)。次に、癌転移において重要なステップである細胞浸潤能をMatrigel invasion assayで検討した。CAMは、A549細胞の浸潤能を濃度依存性に抑制し、CAM 30 μ g/ml投与群にて有意に抑制した (Fig. 2 A, B)。CAMは、A549細胞の浸潤能を抑制したが、そのメカニズムをさらに検討するため、これまで癌の転移・浸潤能と

Fig. 1. The effects of CAM on A549 cell proliferation.

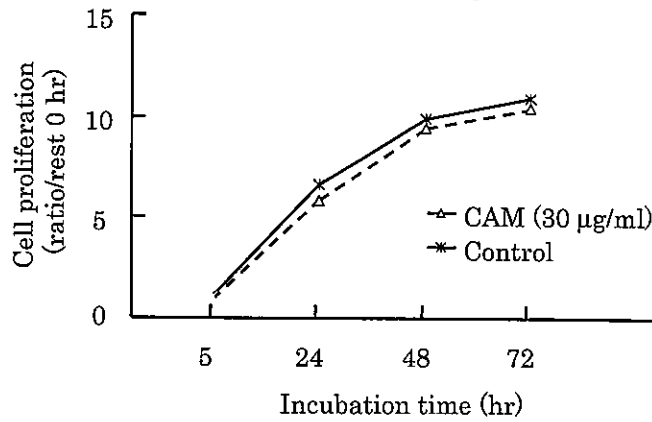
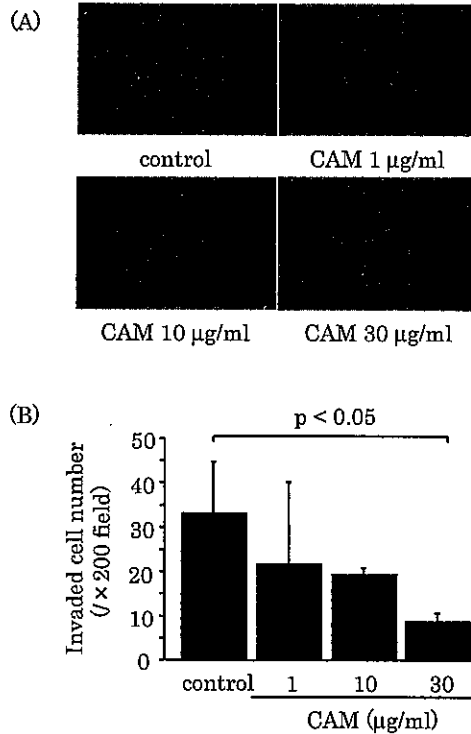


Fig. 2. Suppression of A549 cell invasion by CAM through Matrigel membrane.



の関連性が示唆されてきたTPの発現³⁾に対するCAMの効果について検討した。その結果、CAMはTPの発現を濃度依存性に抑制した (Fig. 3)。しかし、浸潤能に重要な影響を及ぼすMMP-2の発現の変化は認められなかった (Fig. 4)。また、浸潤

能に影響を与える他の因子である細胞運動能に対するCAMの効果をも金コロイド法にて検討した。CAMはA549細胞の運動能を濃度依存性に抑制した (Fig. 5 A, B)。

Fig. 3. TP expression in A549 cells treated with CAM.

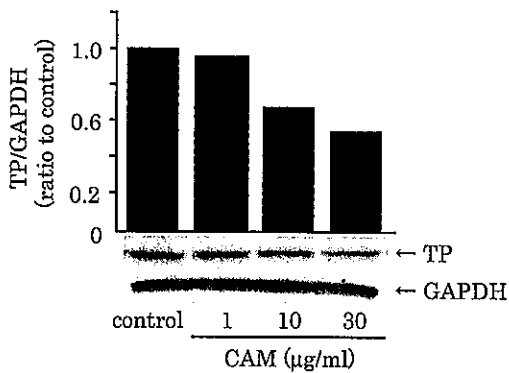


Fig. 4. The effects of CAM on MMP-2 expression.

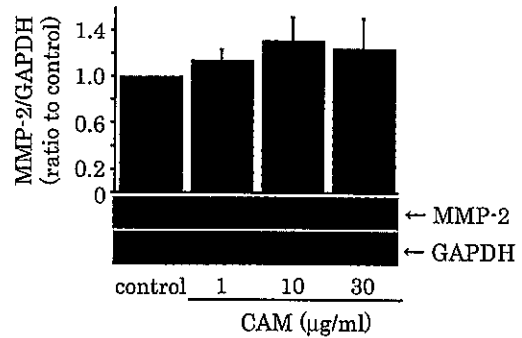
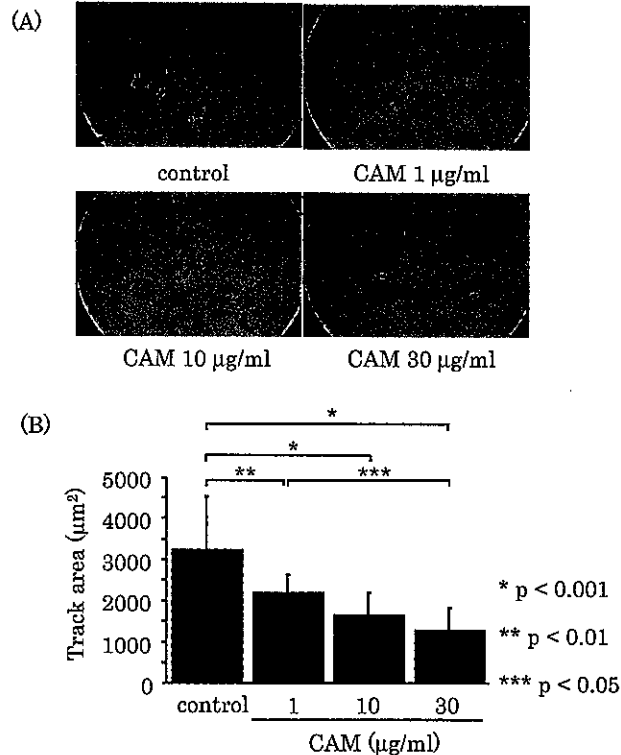


Fig. 5. Suppression of A549 cell motility by CAM.



考 察

これまで、CAM (6, 10 µg/ml) が³, A549細胞の増殖能を抑制したとの報告や⁴⁾, *in vivo*の実験にて、皮下に接種したLewis lung carcinoma (LLC) tumorsの増殖が³, CAM投与にて抑制されたとの報告がある⁵⁾。しかし、我々の行ったA549細胞に対

するCAMの効果の検討では、CAMは細胞増殖能には影響を及ぼさなかった (Fig. 1)。この違いは、使用したCAMの濃度、測定方法の違い、また、*in vitro*と*in vivo*での違いによる可能性が考えられる。次に我々は、CAMの抗腫瘍効果について検討するため浸潤能に着目した。CAMの転移・浸潤能

に対する効果については、これまで否定的な報告もある。ヒト肺腺癌細胞のPC-14や、ヒト扁平上皮肺癌細胞のRERF-LC-AIを用いた、*in vivo*での検討では、CAMの抗腫瘍効果は認められなかった⁶⁾。しかし、LLC細胞を用いたマウスモデルでの検討では、CAMが肺転移を抑制したとの報告もある⁷⁾。今回我々は、浸潤能についてA549細胞を用いた*in vitro*での検討を行ったが、その結果CAMはA549細胞の浸潤能を抑制することが確認された (Fig. 2 A, B)。CAMによるA549細胞の浸潤能抑制のメカニズムをさらに明らかにするため、我々はTPに対する効果に着目した。TPは血管新生因子として知られている⁸⁻¹²⁾、我々はこれまで*in vitro*, *in vivo*の検討において、肺線癌ではTPは血管新生よりむしろ転移・浸潤能に関連していると報告してきた³⁾。このTPの発現に対するCAMの効果について検討したところTPの発現は濃度依存性に抑制された (Fig. 3)。しかし、浸潤能に重要な役割のあるMMP-2の発現に対しては影響を与えず (Fig. 4)、CAMの抗腫瘍効果にMMP-2は関与していないことが示唆された。浸潤能に関連する因子としては、細胞外マトリックスの分解に関与するMMPsの他に、細胞運動能がある。そこで、CAMの細胞運動能に対する効果について検討したところ、CAMはA549細胞の運動能を濃度依存性に抑制することが確認された (Fig. 5 A, B)。以上の結果より、CAMによる抗腫瘍効果のメカニズムの1つとして、TPの発現抑制や、細胞運動能の減弱が考えられた。

今後は、TPの浸潤能に及ぼすメカニズムや、CAMの細胞運動能抑制のメカニズムをさらに詳細に検討するべきである。

文 献

- LABRO M. T. : Effect of macrolides on host natural defences ; in BRYSKIER A. J., BUTZLE J. P., NEU H. C., TULKENS P. M. (eds). Macrolides. Paris, Arnette Blackwell 1993 ; pp 389~408
- MIKASA K., SAWAKI M., KITA E., HAMADA K., TERAMOTO S., SAKAMOTO M., MAEDA K., KONISHI M., NARITA N. : Significant survival benefit to patients with advanced non-small-cell lung cancer from treatment with clarithromycin. *Chemotherapy*. 43 : 288~296, 1997
- SATO J., SATA M., NAKAMURA H., INOUE S., WADA T., TAKABATAKE N., OTAKE K., TOMOIKE H., KUBOTA I. : Role of thymidine phosphorylase on angiogenesis and invasive potential in non-small cell cancer. *Int. J. Cancer* 106 : 863~870, 2003
- 井上憲一, 坂田憲史, 芝崎正順, 西 裕一, 坂本芳雄, 松尾博司 : 肺癌細胞株 A549, SBC-3 の浸潤と増殖に対するマクロライド系抗生物質の抑制効果. *Jpn. J. Antibiot.* 51 : 79~80, 1998
- HAMADA K., MIKASA K., YUNOU Y., KURIOKA T., MAJIMA T., NARITA N., KITA E. : Adjuvant effect of clarithromycin on chemotherapy for murine lung cancer. *Chemotherapy* 46 : 49~61, 2000
- 矢野聖二, 曾根三郎, 山岸武弘, 明石 敏 : ヒト肺癌転移モデルおよびマウス腫瘍系におけるクラリスロマイシンの治療効果は有意か? *Jpn. J. Antibiot.* 51 : 72~74, 1998
- 濱田 薫, 坂本正洋, 三笠桂一, 寺本正治, 森 啓, 辻本正之, 前田光一, 古西 満, 澤木政好, 成田亘啓, 喜多英二 : マウス肺癌細胞接種モデルにおける clarithromycin の抗腫瘍効果に対する検討. *Jpn. J. Antibiot.* 50 : 28~31, 1997
- ISHIKAWA F., MIYAZONO K., HELLMAN U. : Identification of angiogenic activity and the cloning and expression of platelet-derived endothelial cell growth factor. *Nature* 338 : 557~562, 1989
- TAKEBAYASHI Y., AIYAMA S., AKIBA S., YAMADA K., MIYADERA K., SUMIZAWA T., YAMADA Y., MURATA F., AIKOU T. : Clinicopathological and prognostic significance of and angiogenic factor, thymidine phosphorylase in human colorectal carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 88 : 1110~1117, 1996
- MAEDA K., CHUNG Y., OGAWA Y., TAKATSUKA S., KANG S. M., OGAWA M., SAWADA T., ONODA N., KATO Y., SAWA M. : Thymidine phosphorylase/platelet-derived endothelial cell growth factor expression associated with hepatic metastasis in gastric carcinoma. *Br. J. Cancer* 73 : 884~888, 1996
- TOI M., HOSHINA S., TANIGUCHI T., YAMAMOTO Y., ISHITSUKA H., TOMINAGA T. : Expression of thymidine phosphorylase/platelet-derived endothelial cell growth factor in human breast cancer. *Int. J. Cancer* 64 : 79~82, 1995
- REYNOLDS K., FARZANEH F., COLLINS W. P., CAMPBELL S., BOURNE T. H., LAWTON F., MOGHADDAM A., HARRIS A. L., BICKNELL R. : Association of ovarian malignancy with expression of PD-ECGF. *J. Natl. Cancer Inst.* 86 : 1234~1238, 1994