

## 薬剤耐性細胞におけるアドリアマイシンの細胞内取り込みと 細胞膜電位差の相関

浅海 淳一<sup>1)</sup>・川崎 祥二<sup>2)</sup>・西川 光治<sup>1)</sup>・高 献 書<sup>1)</sup>・  
黒田 昌宏<sup>1)</sup>・平木 祥夫<sup>1)</sup>

Relationship between intracellular uptake of adriamycin and membrane potential in ADR resistant Ehrlich ascites tumor cells

Jun-ichi ASAUMI<sup>1)</sup>, Shoji KAWASAKI<sup>2)</sup>, Koji NISHIKAWA<sup>1)</sup>,  
Masahiro KURODA<sup>1)</sup>, Xian SHU GAO<sup>1)</sup>, and Yoshio HIRAKI<sup>1)</sup>

We observed adriamycin (ADR) uptake and cellular transmembrane potential [amount of intracellular fluorescence of 3,3'-(Di-n-hexyl)-2,2'-oxacarbocyanine iodide (NK-2280)] in ADR-resistant cells established from Ehrlich ascites tumor cells (EATC) and wild type EATC.

In ADR-resistant cells, ADR uptake and the cellular transmembrane potential decreased as the degree of resistance increased. 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid (DIDS) induced markedly decreases of ADR uptake and the cellular transmembrane potential.

A good correlation was observed between ADR uptake and transmembrane potential in cultured cells.

**Key Words :** Adriamycin, Cell Membrane Potential, Flow Cytometry, ADR-Resistant Cells, DIDS

### 1. 緒 言

今日、癌化学療法を重ねる度に効果が低下する現象がみられ、癌細胞が抗癌剤に耐性を獲得することが問題になっている。そして、ある抗癌剤に耐性を獲得した癌細胞は他のいくつかの抗癌剤に耐性を獲得している多剤耐性を示すことが報告されている<sup>1),2)</sup>。また、adriamycin (ADR)は高頻度に用いられる抗癌剤で、二重鎖DNAの塩基間に intercalateし、DNAの転写および複製機能を阻害する anthracycline系 の抗生物質である<sup>3)</sup>、ADRに対して耐性を獲得した細胞は、その細胞膜にいくつかの特殊タンパク質を合成しており<sup>1),4)-7)</sup>、中でも170kDaのP-glycoprotein (P-gp)は細胞内に流入したADRを排泄する機能を持つタンパク質である<sup>1),2),8)</sup>。

一方、3, 3'-(Di-n-hexyl)-2, 2'-oxacarbo-

cyanine iodide (NK-2280)は細胞膜電位に関連して吸着したり、取込まれたりする蛍光物質である<sup>9),10)</sup>。

著者らは、薬剤耐性を克服する目的でエールリッヒ腹水癌 (EATC) からADRに耐性を持つ cell lineを樹立した。今回、著者らはこのADR耐性細胞とその親株 (wild type EATC) を使用し、ADRおよびNK-2280の取込みの関係について検討した。

### 2. 材料と方法

#### 1) 細胞および培養

細胞はエールリッヒ腹水癌細胞 (EATC) を使用した。EATCより0.2, 0.5, 1, 5, 10 $\mu$ g/mlの濃度のADRを含む培養液中で増殖可能な細胞 (0.2-, 0.5-, 1-, 5-, 10- $\mu$ g-ADR-resistant EATC)を

1) 岡山大学医学部放射線医学教室

2) 岡山大学医療技術短期大学部診療放射線技術学科

樹立した。継代培養はDulbecco's modified Eagle medium (DMEM) (日水製薬) に penicilline (100 単位/ml), streptomycin (100 $\mu$ g/ml) (明治製菓) および10% calf serum (Hyclone) を添加した培養液を使用し, 37.0 $^{\circ}$ Cにて5% CO<sub>2</sub>+95% airのCO<sub>2</sub> incubatorで行った。ADR-resistant EATCはそれぞれの濃度のADRを含む培養液中で継代培養し, 実験には, 1週間前よりADRを含まない培養液中で培養した細胞を使用した。

#### 2) 薬剤

ADR (協和発酵), 4, 4'-diisothiocyantostilbene-2, 2'-disulfonic acid (DIDS) (Sigma) は蒸留水に溶解し, 冷凍保存したものを実験の都度解凍し直ちに使用した。DIDSの使用濃度は0.5 mMであった。3, 3'-(Di-n-hexyl)-2, 2'-oxacarbocyanine iodide (NK-2280) (日本感光色素研究所)は99.5% ethanolに溶解し, 使用時に濃度調節を行った。ADR及びNK-2280の使用実験はyellow light 下で行った。

#### 3) ADR取り込みの測定

ADRは488nmで励起すると556nmと582nmにピークをもつ蛍光を発する蛍光物質であることから, Flow cytometry (FCM) を用いて細胞1個当たりの細胞内蛍光量を測定した。細胞内ADR測定は, 細胞を25cm<sup>2</sup>フラスコ (Falcon) に播種し, 37 $^{\circ}$ C温水中に直接浸けた。ADRの反応濃度は10  $\mu$ g/mlで, 反応時間は60分であった。ADR処理後細胞を遠心し, 冷PBSで洗滌し, 0 $^{\circ}$ C (氷中) に保ち, 40 $\mu$ mナイロンメッシュで濾過した。FCMはEPICS PROFILE IIを用い, 488nmで励起し, 530 nm以上の蛍光量を20,000個の細胞で測定した。得られたヒストグラムから細胞1個当たりの平均蛍光量を求め, この値よりコントロール (ADR非処理) の細胞の平均蛍光量 (細胞の自然蛍光) を差し引いた量を平均細胞内ADR量とした<sup>11)-13)</sup>。

#### 4) NK-2280取り込みの測定

NK-2280は488nmで励起すると495nmにピークをもつ蛍光物質であることから, 488nmで励起し, 500nm以上の蛍光量を測定した<sup>14)</sup>。NK-2280の取り込みはADRと同様の方法で行った。NK-2280の濃度は, 0.6 $\mu$ Mであり, 反応時間は20分間

であった。

#### 5) 反応液

NK-2280とADRの取り込みの実験に使用した反応液は上記培養液 (10%仔牛血清を含む) にそれぞれの濃度に成るように薬剤を加えた。

### 3. 結 果

#### 1) ADR耐性細胞のNK-2280とADRの細胞内取り込み

EATCの親株 (wildtype) とADRに耐性の細胞5種類 (0.2-, 0.5-, 1-, 10- $\mu$ g-ADR-resistant EATC) を使用し, NK-2280及びADRの取り込みを観察した。

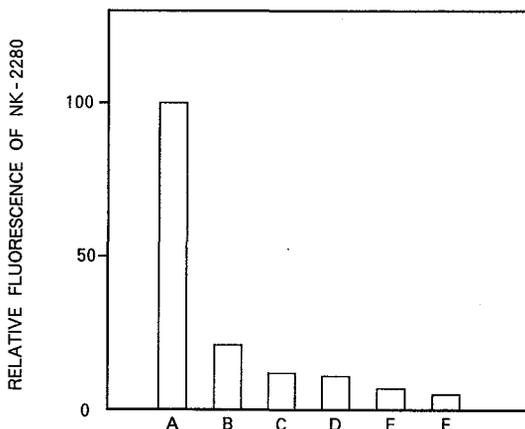


図1 アドリアマイシン (ADR) に対する耐性度と細胞膜電位の関係

A: wildtype, B: 0.2 $\mu$ g/ml, C: 0.5 $\mu$ g/ml, D: 1 $\mu$ g/ml, E: 5 $\mu$ g/ml, F: 10 $\mu$ g/mlのADR濃度で増殖するEhrlich ascites tumor cells (EATC) 耐性細胞を使用した。細胞をNK-2280 (0.6 $\mu$ M) 20分間, 37 $^{\circ}$ Cの条件下で処理し, NK-2280の細胞内取り込みをFCMにて測定した

ADR耐性細胞のNK-2280の取り込みはwild-type EATCと比較して減少を示した (図1)。wildtype EATCの取り込みを100%とすれば, 0.2- $\mu$ g-ADR-resistant EATCでは21%であった。ADR耐性細胞の中でADRに対する耐性度の高い細胞 (ADR濃度の高い状態で維持培養している細胞) ほどNK-2280の取り込みは減少していた。

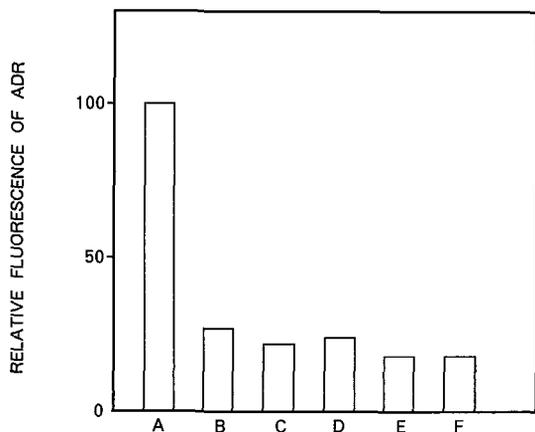


図2 各種アドリアマイシン (ADR) 耐性細胞のADRの細胞内取り込み

A : wildtype, B : 0.2  $\mu$ g/ml, C : 0.5  $\mu$ g/ml, D : 1  $\mu$ g/ml, E : 5  $\mu$ g/ml, F : 10  $\mu$ g/mlのADR濃度で増殖するEhrlich ascites tumor cells (EATC) 耐性細胞を使用した。細胞をADR (10  $\mu$ g/ml) 60分間, 37°Cの条件下で処理し, ADRの細胞内取り込みをFCMにて測定した

ADRの取り込みは図2に示すようにwildtype EATCの取り込みを100%とすれば, 0.2- $\mu$ g-ADR-resistant EATCでは27%であった。0.5-, 1-, 5-, 10- $\mu$ g-ADR-resistant EATCではそれぞれ22, 24, 18, 18%であった。NK-2280と同様にADR耐性細胞の中でADRに対する耐性度の高い細胞ほどADRの取込みは減少を示した。

#### 2) NK-2280及びADRの細胞内取り込みに対するDIDSの影響

Wild type EATC及び耐性細胞として1- $\mu$ g-resistant EATCを用いた。前述の実験条件にDIDS加え, NK-2280とADR取り込みに対するDIDSの作用を観察した。

DIDSを加えるとADR及びNK-2280の取り込みは抑制された。DIDSを加えるとADRの取り込みはwildtype EATCでは34%, 耐性細胞では25%であった。NK-2280の取り込みはwildtypeでは55%, 耐性細胞では55%であった。両細胞ともにDIDSによってNK-2280及びADRの取り込みは有意に減少していた ( $p < 0.01$ ) (図3)。

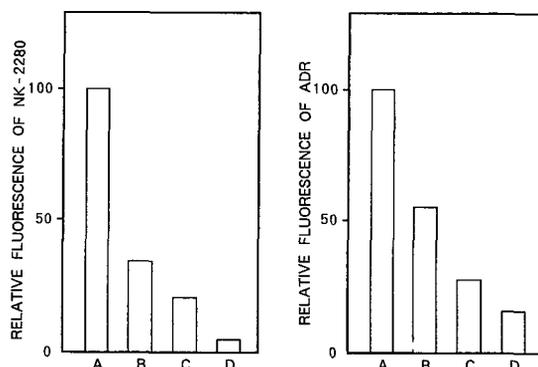


図3 NK-2280とADRの細胞内取り込みに対するDIDSの効果

細胞はwildtype Ehrlich ascites tumor cells (EATC) と1- $\mu$ g-ADR resistant EATCを使用した。

A : wildtype EATC without DIDS

B : wildtype EATC with DIDS

C : 1- $\mu$ g-ADR resistant EATC without DIDS

D : 1- $\mu$ g-ADR resistant EATC with DIDS

左図 : NK-2280の取り込み,

右図 : ADRの取り込み

#### 4. 考 察

ADRは, 生理的条件下では陽性に荷電していることから, ADRの取り込みは常に陰性に荷電している細胞膜電位差に影響されると考えられている<sup>14)-17)</sup>。一方, NK-2280は細胞の膜電位に関連して吸着したり, 取り込まれたりする蛍光物質である<sup>9), 10)</sup>。

今回, 著者らはEATCから樹立した5種類のADRに耐性の細胞とその親株を用いて, NK-2280とADRの取り込みを測定し, 細胞膜電位差とADRの取り込みとの関係について検討した。

Wild type EATC, 0.2-, 0.5-, 1-, 5-, 10- $\mu$ g-ADR-resistant EATCとADRに耐性度の高い(濃い濃度のADRを含む培養液中で培養した細胞)ほどNK-2280とADRともに取り込みは減少し(図1, 2), 両者はよく相関していた。強い耐性をもつ細胞ほど膜電位差が少ないこと, 排泄力が大きいこと, あるいは両者が考えられた。従って, 臨床上での癌細胞の制ガン剤に対する耐性度を知る上の指標としてNK-2280の取り込みを測定することは有用であることを示唆している。

一方、DIDSの作用は $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$  exchangeの阻害<sup>18)</sup>や $\text{Ca}^{2+}$ ポンプの不活性化<sup>19)</sup>することが知られている。図3に示すように、DIDSによりNK-2280とADRの取り込みはともに著明に減少し ( $p < 0.01$ )、やはり両者はよく相関を示した。従来、ADRの細胞内取り込みは受動輸送によると考えられていたが、DIDSによりADRの細胞内取り込みを抑制することができることから、ADRの細胞内流入は細胞の生理学的環境に影響されることを示唆している。著者らの結果からADRの流入にはDIDSにより膜電位差が減少したこと、あるいは塩素イオンポンプの変化<sup>20)</sup>により影響されていると考えられる。ADRの細胞内流入に及ぼす生理学的因子を明らかにすることは、化学療法において薬剤耐性の発現機構を明らかにするうえで重要なことと考えられ、今後検討を加えたい。

## 5. 謝 辞

本研究は、文部省研究費がん特別研究 (01010026, 02151022, 03151022)、奨励研究 (602850225306)、平成4年度文部省特定研究経費の援助を受けた。

## 文 献

- 1) Bradley, G., Juranka, P. F. and Ling, V.: Mechanism of multidrug resistance. *Biochim. Biophys. Acta*, 948:87-128, 1988
- 2) Tsuruo, T.: Mechanisms of multidrug resistance and implications for therapy. *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)* 79:285-296, 1988
- 3) Zunino, F., Gambetta, R., DiMarco, A. and Zaccara, A.: Interaction of daunomycin and its derivatives with DNA. *Biochim. Biophys. Acta*, 277:489-498, 1972
- 4) Hamada, H., Okochi, E., Oh-hara, T. and Tsuruo, T.: Purification of the Mr 22,000 calcium-binding protein (sorcini) associated with multidrug resistance and its detection with monoclonal antibodies. *Cancer Res.* 48:3173-3178, 1988
- 5) Sugawara, I., Okochi, E., Hamada, H., Tsuruo, T. and Mori, S.: Cellular and tissue distribution of MRK20 murine monoclonal antibody-defined 85-kDa protein in adriamycin-resistant cancer cell lines. *Jpn. J. Cancer Res. (GANN)* 79:1101-1110, 1988
- 6) Hamada, H., Okochi, E., Watanabe, M., Oh-hara, T., Sugimoto, V., Kawabata, H. and Tsuruo, T.: Mr 85,000 membrane protein specifically expressed in adriamycin-resistant human tumor cells. *Cancer Res.* 48:7082-7087, 1988
- 7) Deuhars, K. L. and Ling, V.: P-glycoprotein and multidrug resistance in cancer chemotherapy. *Semin. Oncol.* 16:156-165, 1989
- 8) Kessel, D. and Wilberding, C.: Anthracycline resistance in P388 murine leukemia and its circumvention by calcium antagonists. *Cancer Res.* 45:1687-1691, 1985
- 9) Hoffman, J. F. and Laris, P. C.: Determination of membrane potentials in human and *amphium* red blood cells by means of a fluorescent probe. *J. Physiol.* 239:519-552, 1974
- 10) Cohen, L. B., Salzberg, B. M., Davila, H. V., Ross, W. N., Landowne, D., Waggoner, A. S. and Wang, C.H.: Changes in axon fluorescence during activity: molecular probes of membrane potential. *J. Membrane Biol.* 19:1-36, 1974
- 11) Krishan, A. and Ganapathi, R.: Laser flow cytometric studies on the intracellular fluorescence of anthra-cyclines. *Cancer Res.* 40: 3895-3900, 1980
- 12) Durand, R. E. and Olive P. L.: Flow cytometry studies of intracellular adriamycin in single cells *in vitro*. *Cancer Res.* 41:3489-3494, 1981
- 13) Muirhead, K. A. Schmitt, T. C. and Muirhead, A. R.: Determination of linear fluorescence intensities from flow cytometric data accumulated with logarithmic amplifiers. *Cytometry*, 3:251-256, 1983
- 14) Asaumi, J., Kawasaki, S., Nishikawa, K., Kuroda, M. and Hiraki, Y.: Effect of membrane potential on the amount of Adriamycin uptake. (unpublished)
- 15) Lampidis, T. J., Hassan, V., Weiss, M. J. and Chen, L. B.: Selective killing of carcinoma cells <in vitro> by lipophilic cationic compounds: A cellular basis. *Biochem. Pharmacol.* 39: 229-226, 1985
- 16) Tapiero, H., Boule, D., Trinca, G., Fourcade, A. and Lampidis, T. J.: Potentiation of adriamycin accumulation and effectiveness in adriamycin-resistant cells by aclinomycin A. *Leukemia Res.* 12: 411-418, 1988
- 17) Hasmann, M., Valat, G.K., Tapiero, H., Trevorrow, K. and Lampidis, T.: Membrane potential differences between adriamycin-sensitive and -resistant cells as measured by flow cytometry. *Biochem. Pharmacol.* 38:305-312, 1989
- 18) Nishiyama, M., Horichi, N., Mazouzi, Z., Bungo, M., Saijo, N. and Tapiero, H.: Can cytotoxic activity of anthracyclines be related to DNA damage? *Anticancer Drug Design* 5:135-139, 1990

- 19) Zhuang, V., Cragoe, Jr. E. J., Shaikewitz, T., Glaser, L. and Cassel, D.: Characterization of potent Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange inhibitors from the amiloride series in A431 cells. *Biochemistry* 23, 4481-4488, 1984
- 20) 森井浩世: 細胞膜のカルシウムポンプ. *Clinical Calcium* 2, 100-101, 1922
- 21) Asaumi, J., Kawasaki, S., Nishikawa, K., Kuroda, M. and Hiraki, Y.: Modulation of Adriamycin uptake and retention by metabolic inhibitors and ion regulation inhibitors. (unpublished)

(1992年10月30受理)