

癌細胞の増殖・膜透過性に及ぼす外因性 ATP の影響

— *in vitro* における検討 —

川崎医科大学 消化器外科

(指導: 佐野開三教授)

牟 礼 勉

(昭和61年2月25日受付)

Influence of External ATP on Proliferation and Membrane Permeability in Mice Tumor Cells

— *In Vitro* Study —

Tsutomu Mure

Division of Gastroenterology, Department of Surgery
Kawasaki Medical School

(Accepted on February 25, 1986)

癌細胞の増殖, 膜透過性に及ぼす外因性 ATP の影響, さらに本物質の癌化学療法への応用の可能性について, マウス培養細胞を用いて検討し以下の知見を得た.

1) ATP の添加により, Clone-M3 細胞 (マウス黒色腫) と Ehrlich 腹水癌細胞では, 著明な細胞膜透過性の亢進, viability の低下がみられたのに対し, 非癌化細胞である NIH 3T3 細胞, 正常細胞である胎児線維芽細胞における変化は軽微で, この作用は癌細胞のみに特異的であった.

2) ATP による Clone-M3 細胞の膜透過性変化は, 物質の流入, 流出両機構に同時に起こった.

3) Clone-M3 細胞にみられた膜透過性変化は ATP に特異的で, その代謝産物では起こらなかった.

4) ATP により, Clone-M3 細胞の形態, 接着性に変化が認められた.

5) ATP 処理後の癌細胞における各種抗癌剤の細胞増殖抑制効果は, 5-fluorouracil (5-FU), adriamycin (ADM), mitomycin-C (MMC), nymustine hydrochloride (ACNU) では相加的, vincristine (VCR) では相対的に増強した.

これらの結果から, ATP を用いることにより, 選択的癌化学療法が期待できるものと考えられた.

External ATP caused remarkable changes in the membrane permeability and the viability of mice tumor cells in culture. When Clone-M3 cells (mouse melanoma) were exposed to ATP in Tris-buffered saline, a great increase in the rate

of efflux of radioactive acid-soluble materials was observed within several minutes.

The increase in permeability was highly specific for ATP, and was not obtained with its metabolites. The ATP-treatment of the tumor cells also induced a morphological change, detachment of cells and a decrease in cell viability associated with the permeability change. Similar results were also observed with Ehrlich ascites cells, but none of these ATP-effects were noted in untransformed NIH 3T3 cells or Balb/c mouse embryo fibroblasts.

The effects of external ATP on the cytotoxicity of several antitumor drugs against Clone-M3 cells were studied. The cytotoxic effects of 5-fluorouracil (5-FU), adriamycin (ADM), mitomycin-C (MMC) and nymastine hydrochloride (ACNU) were potentiated additively by the ATP-treatment. Furthermore, it enhanced synergistically the effect of vincristine (VCR).

These results suggest that it is possible to achieve selective toxicity for tumor cells by means of ATP-treatment.

Key Words ① ATP ② Membrane permeability ③ Cancer chemotherapy

はじめに

1928年, Lohman が筋肉内組織浸出物に ATP (Adenosine triphosphate) を発見して以来,¹⁾ 生体におけるその多くの役割が明らかになってきた。ATP は血管拡張, 代謝活性増加などの作用を有することから, 治療薬としても臨床に用いられ, 諸種の疾患でその効果が確認されている。^{2), 3)}

一方, 細胞外に加えられた ATP (外因性 ATP) は, 動物細胞の細胞膜透過性を変化させるといいういくつかの報告もみられる。^{4)~9)} 近年, Rozengurt らは, 癌化細胞を細胞外から ATP (adenosine 5'-triphosphate) で処理すると細胞膜の透過性に变化をきたし, ヌクレオチド, リン酸化合物, イオンなどに透過性となるが, 非癌化細胞ではこの様な作用は起こらないことを報告している。^{10), 11)} その後の報告で, 3T12, SV3T3, PY3T3, HeLa, B16 メラノーマ, L929, CHO-K1 など種々の癌化細胞にこの ATP 作用が確認されている。^{12)~16)}

今回, 著者はマウス培養細胞を用い, 外因性 ATP の癌細胞および正常細胞の増殖, 膜透過性に及ぼす影響, さらに本物質の癌化学療法への応用の可能性について実験的に検討した。

実験材料

1. 細胞と培養

マウスの黒色腫である Clone-M3 細胞¹⁷⁾ と, Ehrlich 腹水癌細胞, 非癌化細胞である NIH 3T3 細胞,¹⁸⁾ 正常細胞として Balb/c マウス胎児線維芽細胞を実験に用いた。Ehrlich 腹水癌細胞, Balb/c マウス胎児線維芽細胞は, primary culture を行い, 2-10代継代のものを使用した。

Clone-M3 細胞は, Ham F10 (日水製薬 K. K.) に 15% 馬血清 (GIBCO, Grand Island Biological Co., USA), 2.5% 胎児牛血清 (Flow lab., Australia) を加えた培養液で, Ehrlich 細胞および胎児線維芽細胞は, Eagle MEM (日水製薬 K. K.) に 10% 胎児牛血清を加えた培養液で, NIH 3T3 細胞は, Eagle MEM に 10% 成牛血清 (GIBCO) を加えた培養液で 37°C, 5% CO₂ 下で培養継代しているものを使用した。

2. 薬剤

ヌクレオチド, およびヌクレオシドは Sigma Chemical Co. St. Louis, MO より購入した adenosine 5'-triphosphate (ATP, disodium salt, vanadium-free), adenosine 5'-diphosphate (ADP, sodium salt, vanadium free),

adenosine 5'-monophosphate (AMP, sodium salt), adenosine (sulfate salt) を 1N NaOH で pH を 7.4 に補正し、使用時まで -20°C で凍結保存した。

抗癌剤は、代謝拮抗剤である 5-fluorouracil (5-FU, Kyowa Hakko Co., Tokyo), 抗癌抗生物質である adriamycin (ADM, Kyowa Hakko Co., Tokyo), mitomycin-C (MMC, Kyowa Hakko Co., Tokyo), アルキル化剤である nimustine hydrochloride (ACNU, Sankyo Co., Tokyo), vinca alkaloid である vincristine (VCR, Shionogi Co., Tokyo) の 5 剤を使用した。その他、細胞膜透過性変化の実験には、p-nitrophenyl phosphate (pNPP, Sigma Chemical Co.), [^3H]uridine (22.3Ci/mmol, New England Nuclear, Boston, MA) を使用した。

実験方法

1. 細胞膜透過性の検討

細胞膜の透過性に関する実験は、Rozengurt, Kitagawa らの方法に従い、[^3H]uridine でラベルした酸可溶性物質の細胞外への流出と、本来非透過性物質である pNPP の細胞内への流入、加水分解を指標として行った。^{11), 15)}

細胞は、 $1.5-2.0 \times 10^5$ 個、35mm シャーレ (Falcon, Oxnard, Calif.) にまき込み、2-3日後の約 1×10^6 個/シャーレの状態のものを以下の実験に用いた。

1) 酸可溶性物質の流出を指標とした実験

対数期の細胞の酸可溶性物質を 1.0 ml の前述の培養液中、[^3H]uridine ($0.5 \mu\text{Ci/ml}$, $1.0 \mu\text{M}$) で 37°C , 95% air, 5% CO_2 下 3 時間ラベルした。アイソトープを含む培養液を排除し、細胞を 2.0 ml の 0.15M NaCl で 2 回洗浄後、1.0 ml の pH 7.5 または 8.2 の Buffer (0.1 M Tris/HCl, $50 \mu\text{M}$ CaCl_2 , 50 mM NaCl, Dextran 500, 5 mg/ml) 中、ATP を各濃度加え 37°C で incubate した。各時間 incubation 後、反応液を GF/C glass microfiber filter (Whatman Ltd., England) を用いて吸引濾過

し、細胞を除去した。濾液 (efflux fluid) を 0.5 ml 採取し、Aquasol-2 シンチレーター (New England Nuclear) を 8.0 ml, 50% trichloroacetic acid (TCA) を $50 \mu\text{l}$ 加え、液体シンチレーションカウンター (Aloka LSC-900) で放射活性を測定した。

細胞内全酸可溶性物質は、ラベル後、0.15M NaCl で 2 回洗浄し、1.0 ml の 5% TCA で処理後 (4°C , 30分) 同様に測定した。

ADP, AMP, adenosine, NaH_2PO_4 についても同様に行った。

2) pNPP の加水分解を指標とした実験

pNPP は、細胞膜に対して本来非透過性であるが、万一膜を通過し細胞内に入ると、細胞内の alkaline phosphatase により加水分解されて p-nitrophenol となり黄色に呈色し、再び膜を通過して細胞外に流出する。この反応を利用し、細胞を洗浄後、前述の Buffer 1.0 ml 中、各濃度の ATP と 5 mM pNPP を加え、15 分間、 37°C で incubate した。遠心分離 (1000 rpm, 3 分) により上清を採取し、1N NaOH 0.1 ml で反応を止め、呈色を分光光度計 (410 nm, 日立ダブルビーム 100-60 形) で測定した。

2. ATP 処理による cell viability の変化

細胞を洗浄後、pH 7.5 または 8.2 の Buffer 中、ATP を各濃度加えて処理することにより膜透過性が亢進した状態にした。処理細胞の viability を trypan blue を用いた viable cell count および、regrowth assay により検討した。細胞の形態は光学顕微鏡にて観察した。

1) Trypan blue による検討

Clone-M3 細胞を 1.0 ml の pH 8.2 または 7.5 の Buffer 中、ATP を加え各時間 incubate した後、ピペッティングにて採取した。直ちに 0.5% trypan blue を加え、血球計算盤を用いて細胞数を count し、全細胞数に対する trypan blue 陽性細胞数 (死細胞数) の比を % で示した。

2) Regrowth assay による検討

1) と同様に Clone-M3 細胞を pH 8.2 また

は7.5の Buffer 中, ATP で10または20分間処理しピペティングにより採取した後, 遠心分離 (1000 rpm, 3分), 洗浄を2回繰り返し, Ham F10 に15%馬血清, 2.5%胎児牛血清を含む培養液中, 72時間 incubate した. NIH 3T3 細胞, 胎児線維芽細胞は, ATP 処理を行っても細胞の接着性は保たれるため, ATP 処理後洗浄を行い, 各々前述の培養液中にて48時間, incubate した. 生細胞数を count し, ATP 未処理の細胞数 (control) に対する比 (surviving fraction) で示した.

3. ATP と抗癌剤の併用効果の検討

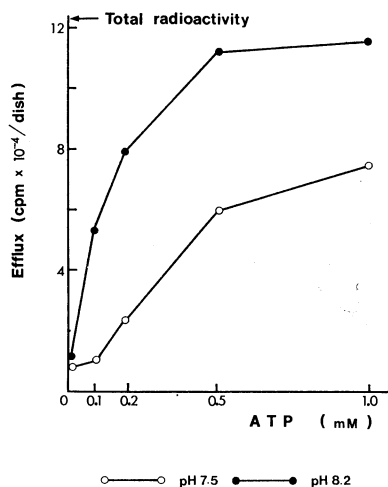
2-2)と同様に1.0 ml の pH 8.2 の Buffer 中, 0.5 mM ATP で10分間処理した細胞を採取し, 2回洗浄後, 抗癌剤を含む2.0 ml の Ham F10+15%馬血清+2.5%胎児牛血清の培養液に約 1×10^5 個まきこみ, 72時間 incubate した. 生細胞数を count し, ATP 未処理-抗癌剤無添加の細胞数 (control) に対する比を%で示した.

結 果

1. ATP による癌細胞の膜透過性変化

1) 酸可溶性物質の流出を指標とした実験

a) Concentration of ATP and pH dependency



$[^3\text{H}]$ uridine で標識した Clone-M3 細胞を pH 8.2 または 7.5 の Buffer 中で ATP 処理を行うと, 細胞膜透過性変化が ATP 添加後数分以内に起こり, pH 8.2 では, 細胞内の酸可溶性標識物質はほぼ細胞外に流出した. 至適 ATP 濃度は, 0.5—1.0 mM で, またそれは Buffer の pH に依存し, 0.5mM ATP で15分処理時, pH 8.2 では98%, pH 7.5 では51%の流出が確認された (Fig. 1-a). なお, 反応時間と酸可溶性物質の流出量との間には正の相関を認めた (Fig. 1-b).

2) pNPP の加水分解を指標とした実験

ATP による Clone-M3 細胞の透過性変化は, 細胞外より加えた pNPP の流入, 加水分解の増加によっても確認された (Fig. 2-a). Clone-M3 細胞におけるこの pNPP の加水分解の増加は, 酸可溶性物質の流出を指標とした先の実験結果 (Fig. 1-a) とよく相関し, 至適 ATP 濃度はやはり 0.5—1.0 mM で, pH 8.2 の Buffer 中において高い反応がみられた (Fig. 2-a). さらに同様の ATP 依存の細胞膜透過性変化が Ehrlich 細胞でも確認された (Fig. 2-b). これらの結果から, ATP による癌細胞の膜透過性変化は, 物質の流出機構のみ

b) Time course

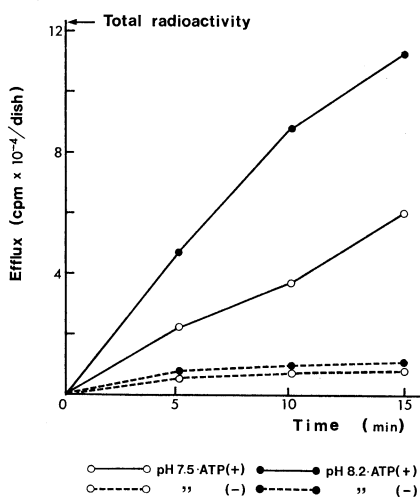


Fig. 1. Effect of ATP on the efflux of $[^3\text{H}]$ uridine labeled acid-soluble pools of Clone-M3 cells: a) Concentration of ATP and pH dependency: Cells were incubated at 37°C for 15min in Buffer (pH 7.5 or 8.2) with or without ATP. b) Time course: Cells were incubated at 37°C in Buffer (pH 7.5 or 8.2) containing 0.5 mM ATP.

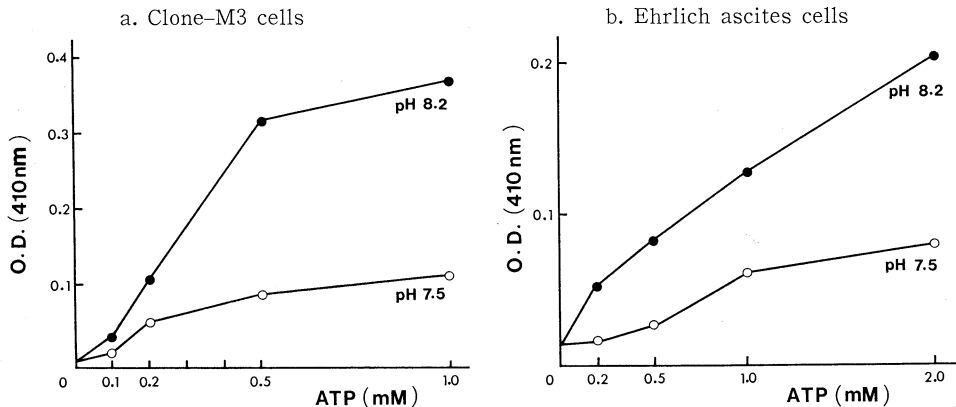


Fig. 2. Effect of ATP on the influx and the hydrolysis of pNPP in a) Clone-M3 cells and b) Ehrlich ascites cells: Cells were incubated at 37°C for 15 min with or without ATP in Buffer (pH 7.5 or 8.2) containing 5 mM pNPP.

でなく、流入機構にも同時に起こることが明らかとなった。

2. ATP による非癌化細胞の膜透過性変化

非癌化細胞として NIH 3T3 細胞、正常細胞として胎児線維芽細胞を用いて、1.と同様の実験を pH 8.2 の Buffer と 0.5 mM ATP を用いて行った。15分反応時、Clone-M3 細胞では ATP 無添加の 10.6 倍、細胞内全酸可溶性物質の 98% の流出がみられたのに対し、NIH 3T3 では 1.8 倍、36%、胎児線維芽細胞では 1.6 倍、19% といずれも低値で、透過性変化は癌細胞に基だ特異的であった (Fig. 3)。

3. ATP の代謝産物の膜透過性に及ぼす影響

膜透過性変化に対する ATP の代謝産物の影響を検討するため、同モル濃度の ADP, AMP, adenosine, 3 倍モル濃度の NaH_2PO_4 を用い、1-1)と同様に実験を行い、細胞内全酸可溶性物質に対する細胞外に流出した酸可溶性物質の割合を%で示した。その結果、反応は ATP に特異的で、他のいずれの薬剤においても乏しかった (Table 1)。したがって、この透過性変化は ATP の直接作用であることが示唆された。

4. ATP による cell viability の変化

ATP 処理を行った細胞の viability の変化を、trypan blue を用いて調べたが、膜透過

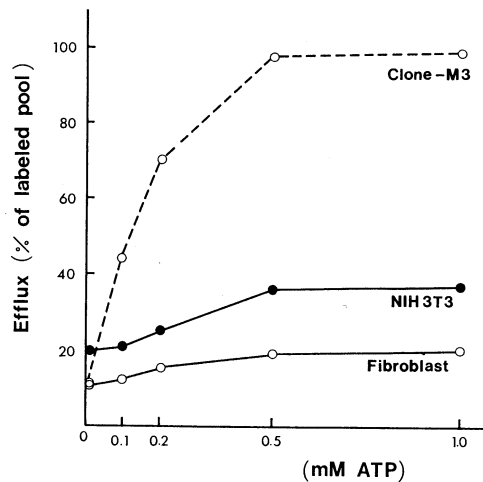


Fig. 3. Effect of ATP on the efflux of [^3H] uridine-labeled pools of Clone-M3 cells, NIH 3T3 cells and Balb/c mouse embryo fibroblasts. The total radioactivity of labeled pools was 121,000, 102,900 and 151,900 cpm/dish, respectively. Cells were incubated at 37°C for 15 min in Buffer (pH 8.2) with or without ATP.

性の亢進した細胞では、trypan blue を生存状態で取り込むことも十分考慮されるため、regrowth assay をも行って検討した。

Trypan blue 陽性細胞は膜透過性と同様に ATP が高濃度、反応時間が長くなるに従い増加した。また、pH 8.2 の条件下の方が陽性細胞は多くみられた。ATP 無添加のものの陽性

Table 1. Effect of ATP and its metabolites on the efflux of [^3H]uridine-labeled pools of Clone-M3 cells. The total radioactivity of labeled pools was 112,100 cpm/dish. Cells were incubated at 37°C for 15 min in Buffer (pH 8.2) containing the indicated addition.

Additions	Efflux (cpm/dish)	Percent of labeled pool
(-)	10,500	9.4
ATP	109,600	97.8
ADP	14,200	12.7
AMP	15,400	13.7
adenosine	12,100	10.8
NaH_2PO_4	17,200	15.3

率は、60分時、いずれの pH においても 5% 以下であった (Fig. 4).

Regrowth assay による結果も、trypan blue を用いた場合と同様で、ATP で処理した細胞は、その濃度が高く、また処理時間が長くなるに従い、再増殖が抑制された (Fig. 5)。この結果は、酸可溶性物質の流出を指標とした膜透過性変化の実験結果ともよく相関した。

一方、NIH 3T3 細胞、胎児線維芽細胞では、膜透過性変化と同様、ATP 処理による増殖抑制はきわめて少なかった (Fig. 6)。

5. ATP による細胞の形態学的変化

37°C の条件下、pH 8.2 の Buffer 中、0.5 mM ATP 添加後の Clone-M3 細胞の形態を光学顕微鏡で観察すると、添加後 1 分以内に細胞の形態的变化が起こりはじめ、樹枝状にのびた細胞突起が短縮し、時間の経過に伴いだいに球状、浮遊状となった。10分時に trypan blue を加えると、浮遊した細胞の一部に陽性細胞が観察された (Fig. 7-a, b, c, d)。また、NIH 3T3、胎児線維芽細胞では、上記の変化は軽微で細胞の接着性にも大きな変化は認められなかった。

6. 抗癌剤の抗腫瘍効果に及ぼす ATP の影響

ATP による膜透過性の亢進ならびに殺細胞効果が、抗癌剤の抗腫瘍効果に及ぼす影響を検討した。5-FU, ADM, MMC, ACNU では各抗癌剤の抗腫瘍効果はいずれの抗癌剤濃度においても、ATP で処理することにより相加的に増強された。また、VCR では相剰効果が認められ、VCR が低濃度になるに従い、その効果は増強した。すなわち、0.1 ng/ml の VCR 単独では 96.2%、ATP 処理のみでは 45.7% の生存率であったが、両者の併用により、生存率は 33.4% と低下した (Table 2)。

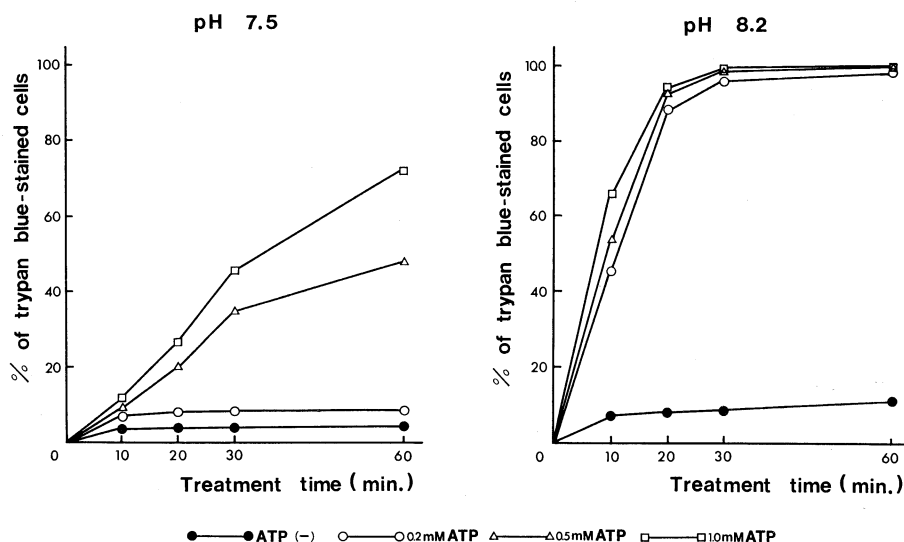


Fig. 4. Viability of Clone-M3 cells treated with ATP using trypan blue. Cells were treated with ATP in Buffer (pH 7.5 or 8.2) at 37°C.

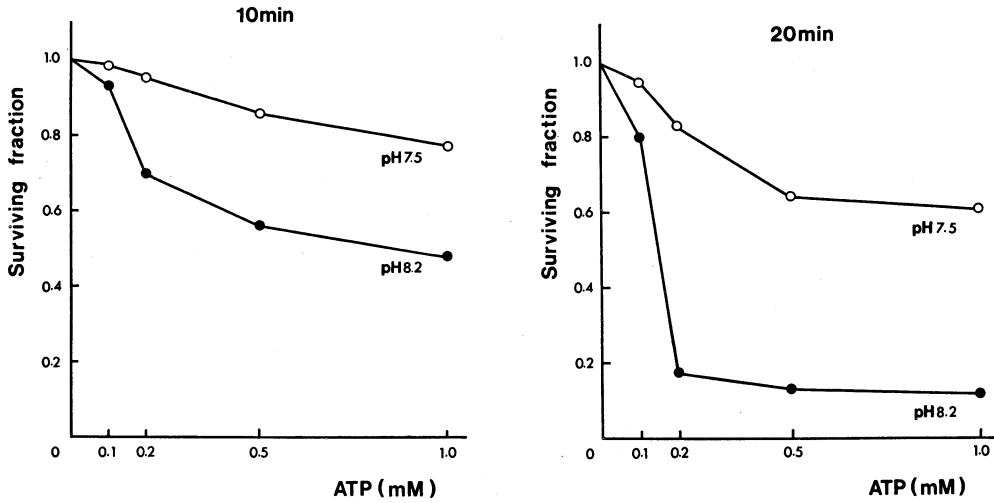


Fig. 5. Regrowth of Clone-M3 cells treated with ATP. Cells were treated for 10 or 20 min with ATP in Buffer (pH 7.5 or 8.2) at 37°C.

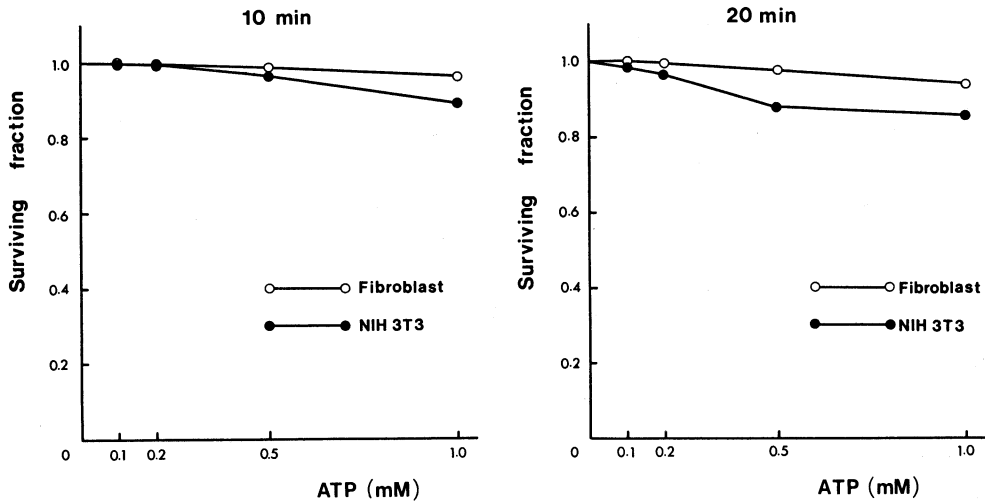


Fig. 6. Regrowth of NIH 3T3 cells and mouse embryo fibroblasts treated with ATP. Cells were treated for 10 or 20 min with ATP in Buffer (pH 8.2) at 37°C.

考 察

細胞外 ATP が、動物細胞の膜透過性を变化させることはこれまでもいくつかの報告がある。^{4)~9)} また、末梢血中にも ATP が存在することも近年、明らかにされている。¹⁰⁾ しかし、反応条件や、必要な ATP 濃度などもそれぞれ異なり、反応機構の共通性や生理的意義など未だ解明されていない。

著者は、癌細胞に対する ATP の作用についてその反応機構、癌細胞に対する特異性、癌化学療法への応用について実験的に検討した。

1. ATP による細胞の膜透過性と viability の変化

ATP による Clone-M3 細胞の透過性変化は、ATP 添加後数分以内に起こり、10-15分間で、ヌクレオチド、イオンなどの酸可溶性物質をほぼ完全に細胞外に放出した (Fig. 1).

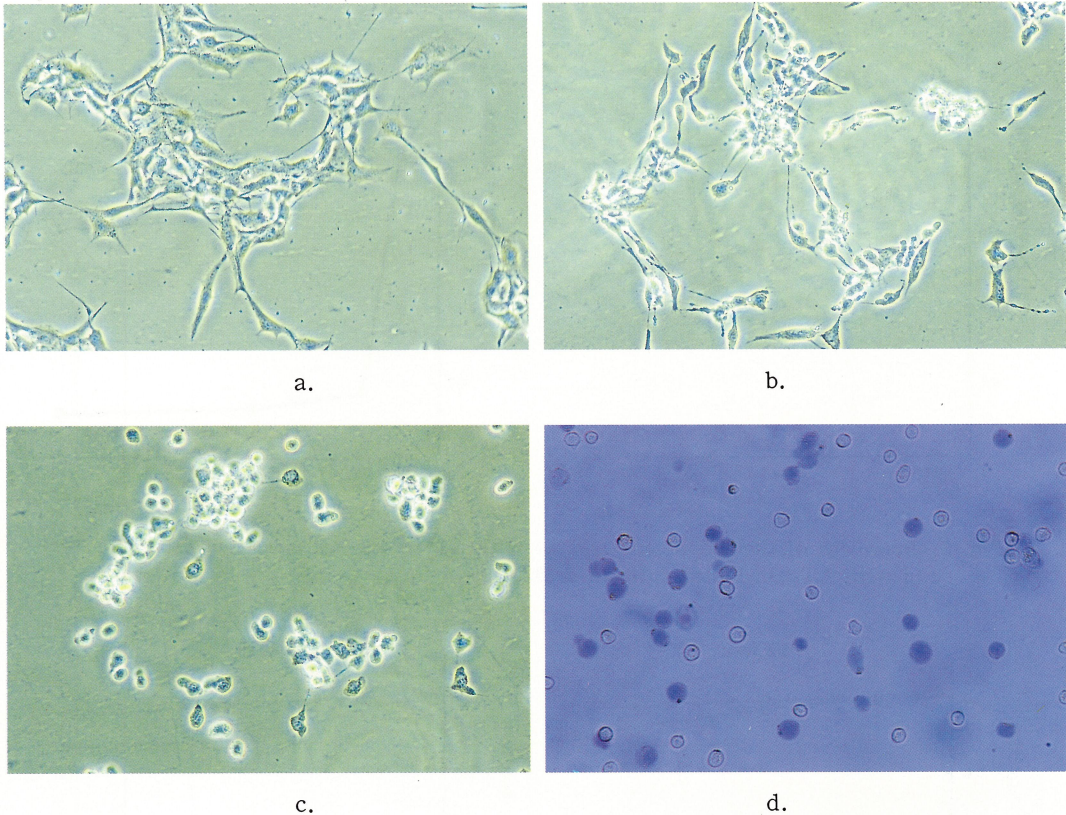


Fig. 7. Change in the morphology of Clone-M3 cells treated with ATP. $\times 200$
 a) untreated, b) treated for 1 min, c) treated for 5 min, d) treated for 10 min (staining with trypan blue).

また、細胞外から加えた本来非透過性の物質 (pNPP) も同時に細胞内に入り得た (Fig. 2). 反応は、0.1 mM 以上の ATP で誘発され、0.5—1.0 mM が至適濃度であった。また、この透過性変化は、ATP に特異性が高くその代謝産物では起こらなかったが (Table 1), 類似体では唯一 ATP γ S が透過性変化を誘導することが確認されている。¹²⁾ このことは、ATP の γ 位リン酸基の加水分解が、本反応に必要なことを示唆している。

この ATP 作用は反応系の pH と温度にも依存した。Clone-M3 細胞では、生理的な pH においても反応はみられたが、アルカリ側により感受性が高かった。これらの諸性質はいずれも、他の癌細胞で認められた ATP 作用と同様であり、今回、Clone-M3 および Ehrlich 癌細胞も ATP 感受性を示すことが明らかにされ

た。

Rozengurt らは、ATP による細胞膜透過性変化の性質のひとつとしてその可逆性をあげている。¹¹⁾ すなわち、ATP により 3T6 (癌化 3T3) 細胞の透過性を亢進させた後、ATP を除去し処理細胞を通常培養液中で incubate (37°C) すると、すみやかに膜の修復が起こり、細胞は正常に増殖すると報告している。

著者は、Clone-M3 細胞を用いて膜透過性の亢進と cell viability の関係を、trypan blue を用いた方法ならびに regrowth assay により検討した。pH 8.2 または 7.5 の Buffer 中、0.5 mM ATP で処理した場合の酸可溶性物質の流出率、処理細胞の trypan blue 陽性率、再増殖抑制率の結果を Table 3 にまとめた。trypan blue を用いた方法と regrowth assay による cell viability 検索の結果は、定量的に

Table 2. Effect of ATP-treatment on anti-tumor activity of various antitumor drugs in Clone-M3 cells. Cells were treated for 10 min with 0.5 mM ATP in Buffer (pH 8.2) at 37°C. Then they were washed and incubated for 72 hr in medium (Ham F 10+15% HS+2.5% FBS) containing the indicated concentrations of antitumor drugs.

Drugs	Dose (ng/ml)	Survival rate (%)	
		ATP(-)	ATP(+)
5-FU	(-)	100.0	51.0
	100	93.4	50.4
	1,000	69.7	34.7
	10,000	25.1	13.7
	100,000	24.9	12.1
ADM	(-)	100.0	48.1
	1	70.9	35.9
	10	32.6	16.0
	100	27.0	11.6
	500	2.5	0.5
MMC	(-)	100.0	52.1
	10	66.4	35.8
	100	24.7	13.5
	1,000	19.7	10.6
ACNU	(-)	100.0	47.5
	10	94.6	46.3
	100	89.0	40.8
	1,000	20.7	10.2
	10,000	16.9	8.8
VCR	(-)	100.0	45.7
	0.1	96.2	33.4*
	1	77.2	26.9*
	5	25.6	9.8
	10	18.0	7.8

* Synergistic effect

もよく相関し、trypan blue 陽性は、細胞が生存状態で膜透過性亢進により trypan blue を取り込んだ結果ではなく、細胞の死を表すものと考えられた。

Figs. 1, 6 に示したように、ヌクレオチドなどの膜透過性の亢進と cell viability の低下はよく相関したが、**Table 3** のごとく、いずれの条件下でも酸可溶性物質の流出率は、他のふたつの実験結果よりも高い数値を示し、処理時間が長い程その差は僅少となった。このことから、Rozengurt らが報告した ATP による膜透過性変化の可逆性という現象は、Clone-M3 細胞を用いた本反応系においても、短時間処理の場合ある程度の細胞で認められるが、処理時間が長くなるに従って、膜透過性の亢進は viability の低下を引き起こしているものと思われた。また、処理時間がより短ければ、完全な膜修復が起こる可能性も示唆された。事実、短時間処理による ATP 作用の可逆性は、CHO 細胞でも確認されている。²⁰⁾

このような viability の低下の直接的な原因は、今回明らかにはできなかったが、Chahwala らは、最近、Friend 赤白血病細胞において、ATP が細胞膜透過性を亢進し、細胞増殖を抑制することを認めており、その原因を、細胞内 K⁺ の細胞外への急激な流出によるものと推測している。¹⁶⁾

Table 3. Correlation between permeability and viability induced by ATP in Clone-M3 cells.

Experimental conditions		Efflux of acid soluble pool (%)	Trypan blue -stained cells (%)	Regrowth inhibition (%)
ATP (+)	pH 8.2 10 min	70.9	54.4	45.3
	pH 8.2 20 min	98.4	92.1	84.1
	pH 7.5 10 min	29.6	10.3	12.8
	pH 7.5 20 min	55.5	20.4	34.0
ATP (-)	pH 8.2 10 min	9.2	8.6	—
	pH 8.2 20 min	9.8	9.7	—
	pH 7.5 10 min	8.1	4.8	—
	pH 7.5 20 min	8.3	5.1	—

2. ATP作用と細胞の形態、および接着性の変化

ATP処理を塩溶液中で行うと、細胞の膜透過性の亢進、および viability の低下が起きることを述べたが、これらに加え、さらに細胞の形態的变化も観察された (Fig. 7). この変化は当初、前述の cell viability の低下により起こるものと推測したが、この変化が膜透過性の亢進、viability の低下の発現よりも早期に起こっている事実から、これはATPによる、より直接的な作用であると考えられた。

最近、Weisman らは前述した3T6細胞を用い、ATPによりヌクレオチドなどに対し透過性となる条件下で、 Na^+ - K^+ 透過性変化を調べたところ、ヌクレオチドの細胞外流出に先立ち、著しい Na^+ の流入と K^+ の流出の増加、および膜電位の低下が起こることを認めている。²¹⁾ また、Kitagawa らは、細胞形態を基本的に調節している細胞骨格の阻害剤により、ATPによる透過性変化が増強されることを報告している。²⁰⁾ その他、ATPによる膜透過性の亢進に伴い細胞内ATPが低下し、その結果、細胞骨格に障害を与えることを示唆した報告もある。^{22), 23)} これらの事実からも、むしろこの形態的变化が、ヌクレオチドなどの透過性変化、ひいては cell viability の低下を誘導していると考えたほうがよさそうである。

また、培養細胞がシャーレに接着するにあたり、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} が必要であることはよく知られている。このATP作用は、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} により阻害されること^{11), 24)}などもこの細胞の形

態的变化、および接着性と何らかの関連があるのかもしれない。

3. ATPの作用機序

ATPによる癌細胞の変化は、どのような反応機構により調節されているのか、現在のところ明らかではないが、前述のごとくそれを示唆する現象がいくつか報告されている。それらの関連を著者の知見も含め Figure 8にまとめた。

4. ATP作用の癌細胞特異性

ATP作用の興味ある特徴のひとつに、癌細胞に対する特異性があげられる。今回の実験に用いた癌細胞、Clone-M3細胞では、ATPにより著明な膜透過性の亢進と viability の低下が認められたが (Figs. 1, 4, 5)、非癌化細胞である NIH 3T3細胞、正常細胞であるマウス胎児線維芽細胞ではその変化は軽微であった (Figs. 3, 6)。

NIH 3T3細胞は、1969年 Jainchill らにより、NIH スイスマウス胎児線維芽細胞から樹立された株で、¹⁸⁾ 正常細胞の性質である contact inhibition は保たれているが、agingにより枯渇することなく、永久継代が可能な細胞である。それゆえに、ここではあえて正常細胞とはせず非癌化細胞と称し、Balb/c マウス胎児線維芽細胞と区別した。

NIH 3T3細胞と胎児線維芽細胞の、膜透過性変化および viability を比較すると、NIH 3T3の方が、軽度ではあるがATPに対し高い感受性を示したが、この差が癌化の傾向によるものか否かは明らかではない (Figs. 3, 6)。

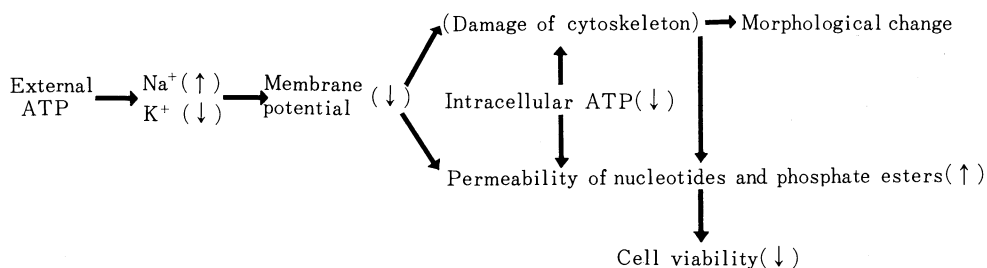


Fig. 8. Possible relationship among various phenomena induced by external ATP in tumor cells.

現在, 3T6(3T3の spontaneous transformation), SV3T3 (3T3の simian virus 40による transformation), PV3T3 (3T3の polyoma virusによる transformation), L929, B16 melanoma, Friend erythroleukemia, などのマウス由来の癌細胞をはじめ, CHO-K1 や HeLa 細胞など, 癌化の要因, 動物種などの異なる種々の癌細胞に ATP の作用が認められている.^{12)~16)} さらに今回の実験で, Clone-M3, Ehrlich 細胞においても ATP 作用が確認された.²⁵⁾ したがって, ATP による細胞膜透過性変化が, 癌化と関連した新しい膜透過性変化である可能性を示唆している。

癌細胞の最も大きな特徴は, 外部からの情報を受けて細胞機能や増殖を調節する機構に欠陥があることで, そのために無秩序に運動や増殖を行い, 他の組織中へ侵襲するなどの異常な挙動を示す。外部よりの刺激の受容と伝達は, 主として細胞膜を介して行われるので, 癌細胞における異常は最も著明に細胞膜に現れていると考えられる。癌化に伴う細胞膜の変化として, 細胞表面の正常な抗原の消失, 癌細胞特有の抗原構造の出現, ある種の栄養素に対する輸送能の亢進, 蛋白質, 糖脂質の異常など多数報告されている。^{26)~28)} 特に注目すべきは, 細胞膜外表面の糖蛋白であるフィブロネクチンの合成が, 癌細胞において低下していることである。フィブロネクチンは細胞の増殖, また細胞内部の細胞骨格系と相互作用し, これの消失した癌細胞では細胞骨格系の配列が不規則となることがわかっている。²⁹⁾ これらの異常が, 前述したような細胞骨格系にも影響を及ぼすと考えられている, ATP 作用の癌細胞特異性と関連しているのかもしれない。また, 癌細胞特有の ATP-ase, プロテインキナーゼなどの関与も推測されているが,³⁰⁾ ATP 作用と癌化との直接的なつながりについては, 現在明らかにはされていない。

5. ATP を用いた癌化学療法の検討

癌化学療法においては, 抗癌剤の癌細胞に対する選択的毒性をうる事が, 副作用の点からも一つの重要な課題である。癌細胞に対しより

選択的な治療効果を得るために, 抗癌剤の剤形の工夫, スマンクスーリピオドール, アンギオテンシン II, モノクローナル抗体を用いた化学療法, 温熱療法などの新しい試みがなされている。^{31)~36)}

著者は, ATP が癌細胞に選択的に作用する点に着目し, 癌化学療法への応用の可能性を検討した。今回, Clone-M3 細胞を用いて行った *in vitro* の実験で, ATP は癌細胞に対し特異的に膜透過性を亢進させ, さらに殺細胞効果を示した。しかし, 既製の抗癌剤と併用した場合には, 殺細胞効果の相対的な増強は, 一部の抗癌剤で認められたに過ぎなかった (**Table 2**)。その原因として, 1) 膜透過性の変化により, 薬剤の流入のみならず, 流出も亢進するために, 細胞内の抗癌剤の濃度は上昇しない。2) Buffer から培養液に移した段階, すなわち, ATP の除去によりその作用が消失したことなどが考えられる。しかし, ATP とこれらの抗癌剤の併用効果は, 相対的にならないまでも相加的ではあり, ATP が正常細胞に対し殺細胞効果を持たないとすれば, 少量の抗癌剤で癌の増殖が抑えられることになり, したがって本法は制癌という点で有用と考えられた。特に, VCR では相対的な効果が認められ, その効果は VCR が低濃度になるに従い増強した (**Table 2**)。VCR の作用機序はいまだ明らかではないが, 低濃度の VCR は, 細胞骨格のチューブリンに結合してその重合を阻害することが知られている。³⁷⁾ 前述したように ATP 作用には細胞骨格系の障害が示唆されており, 著者はこの相対的効果を, ATP による細胞骨格の障害をさらに VCR が強めた結果と考えている。

最近, ATP とカルモジュリン阻害剤である trifluoperazine とを併用すると, 膜透過性変化が相対的に増強されることも報告されており,^{24), 38)} これを応用すれば, さらに強い殺細胞効果が得られるものと期待される。また, Kitagawa らは, ATP による膜透過性の変化を利用し, 本来非透過性の薬剤 (ara-CTP; 1-β-D-arabinofuranosylcytosine 5'-triphosphate) を選択的に癌細胞に取り込ませること

を試み、癌細胞の DNA 合成の選択的阻害に成功している³⁹⁾ ことなども興味深い。

これまで記述した ATP による膜透過性の変化は、細胞が正常に増殖することができない非生理的な Buffer 中で観察されているが、細胞が正常に増殖することが可能な培養条件下でも、より高濃度の ATP が必要となるが、十分な透過性の変化が得られ、同時に細胞増殖の著明な抑制も認めている。現在なお、この ATP の作用がすべての癌細胞にみられるか否かは不明であるが、感受性を示す細胞においては、選

択的癌化学療法が期待できるものと考え実験をすすめている。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜った佐野開三教授、また御教示戴いた国立予防衛生研究所、北川隆之先生に深甚なる謝意を捧げるとともに、研究に協力して頂いた当教室員各位に心よりお礼申し上げます。細胞を御提供戴き御助言賜った本学実験病理学教室、木本哲夫教授、難波正義助教授をはじめ同教室員各位、培養センターの皆様の御厚情に深謝致します。

なお、本論文の要旨は第34回日本化学療法学会総会(昭和61年6月)において発表した。

文 献

- 1) Lohmann, K.: Über das Vorkommen und den Umsatz von Pyrophosphat in Zellen. III. Mitteilung das physiologische Verhalten des Pyrophosphats. *Biochem. Ztschr.* 203: 172—207, 1928
- 2) 木村 登, 戸嶋裕徳, 高山一成, 田代寛美, 南部征喜, 草場 正, 池田秀夫, 高橋長海, 小川暢也: ATP-2Na (アデホス) の心疾患に対する臨床的效果. *臨と研* 54: 4053—4062, 1977
- 3) Sato, F., Ito, T., Akiyoshi, H. and Fujii, S.: Metabolism of adenine nucleotides in the rat. *J. Biochem.* 83: 1—7, 1978
- 4) Hempling, H. G., Stewart, C. C. and Gasic, G.: The effect of exogenous ATP on the electrolyte content of TA₃ tumor cells. *J. Cell Physiol.* 73: 133—140, 1969
- 5) Cockcroft, S. and Gomperts, B. D.: ATP induces nucleotide permeability in rat mast cells. *Nature* 279: 541—542, 1979
- 6) Burgess, G. M., Claft, M. and Jenkinson, D. H.: Effect of catecholamines, ATP and ionophore A23187 on potassium and calcium movement in isolated hepatocytes. *Nature* 279: 544—546, 1979
- 7) Okada, Y., Yada, T., Shosaku, T., Oiki, S., Ueda, S. and Machida, K.: Exogenous ATP induces electrical membrane response in fibroblasts. *Exp. Cell Res.* 152: 552—557, 1984
- 8) Perdue, J. F.: The isolation and characterization of plasma membranes from cultured cells. *J. Biol. Chem.* 246: 6750—6759, 1971
- 9) Landry, Y. and Lehninger, L. A.: Transport of calcium ions by Ehrlich ascites-tumor cells. *Biochem. J.* 158: 427—438, 1976
- 10) Rozengurt, E. and Heppel, L. A.: A specific effect of external ATP on the permeability of transformed 3T3 cells. *Biochem. biophys. Res. Commun.* 67: 1581—1588, 1975
- 11) Rozengurt, E., Heppel, L. A. and Friedberg, I.: Effect of exogenous ATP on the permeability properties of transformed cultures of mouse cell lines. *J. Biol. Chem.* 252: 4584—4590, 1977
- 12) Makan, N. R.: Induction of permeability change and restoration of membrane permeability barrier in transformed cell cultures. *Exp. Cell Res.* 114: 417—427, 1978
- 13) Makan, N. R.: Role of cytoplasmic ATP in the restruction and maintain of a membrane permeability barrier in transformed mammalian cells. *J. Cell Physiol.* 10: 481—492, 1979
- 14) Kitagawa, T. and Akamatsu, Y.: Control of passive permeability of Chinese hamster ovary cells by external and intracellular ATP. *Biochim. biophys. Acta* 649: 76—82, 1981

- 15) Kitagawa, T. and Akamatsu, Y.: Different sensitivities to external ATP in passive permeability of transformed mouse cell lines. *Japan J. Med. Sci. Biol.* 35 : 213—219, 1982
- 16) Chahwala, S. B. and Cantley, L. C.: Extracellular ATP induces ion fluxes and inhibits growth of Friend erythroleukemia cells. *J. biol. Chem.* 259 : 13717—13722, 1985
- 17) Yasumura, Y., Tashjian, A. H. and Sato, G. H.: Establishment of four functional, clonal strains of animal cells in culture. *Science* 154 : 1186—1189, 1966
- 18) Jainchill, J. L., Aaronson, S. A. and Todaro, G. J.: Murine sarcoma and leukemia viruses: Assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells. *J. Virol.* 4 : 549—553, 1969
- 19) Harkness, R. A., Coade, S. B. and Webster, A. D. B.: ATP, ADP and AMP in plasma from peripheral venous blood. *Clin. Chim. Acta* 143 : 91—98, 1984
- 20) Kitagawa, T. and Akamatsu, Y.: Modulation of passive permeability by external ATP and cytoskeleton-attacking agents in cultured mammalian cells. *Biochim. biophys. Acta* 734 : 25—32, 1983
- 21) Weisman, G. A., De, B. K., Friedberg, I., Pritchard, R. S. and Heppel, L. A.: Cellular response to external ATP which precede an increase in nucleotide permeability in transformed cells. *J. Cell Physiol.* 119 : 211—219, 1984
- 22) Rozengurt, E. and Heppel, L. A.: Reciprocal control of membrane permeability of transformed cultures of mouse cell lines by external and internal ATP. *J. biol. Chem.* 254 : 708—714, 1979
- 23) Heppel, L. A., Weisman, G. A. and Friedberg, I.: Permeabilization of transformed cells in culture by external ATP. *J. Membr. Biol.* 86 : 189—196, 1985
- 24) De, B. K. and Weisman, G. A.: The role of calcium ions in the permeability changes produced by external ATP in transformed cells. *Biochim. biophys. Acta* 775 : 381—388, 1984
- 25) 佐野開三, 牟礼 勉: 腫瘍細胞に及ぼす外因性 ATP の影響. *外治* 153 : 578—579, 1985
- 26) Hakomori, S.: Structures and organization of cell surface glycolipid dependency on cell growth and malignant transformation. *Biochim. biophys. Acta* 47 : 55—89, 1975
- 27) 関口清俊: がん細胞の膜生化学. *化学増刊* 101 : 199—222, 1983
- 28) 森山宏編: がんの細胞膜. 東京, 南江堂. 1969
- 29) Yamada, K. M. and Olden, K.: Fibronectines-adhesive glycoproteins of cell surface and blood. *Nature* 275 : 179—184, 1978
- 30) 北川隆之: ATP による動物細胞表面膜の透過性調節. *蛋, 核, 酵* 29 : 511—522, 1984
- 31) Takahashi, T., Mizuno, M., Fujita, Y., Ueda, S., Nishioka, B. and Majima, S.: Increased concentration of anticancer agent in regional lymph nodes by fat emulsion, with special reference to chemotherapy of metastasis. *Gann* 64 : 345—350, 1973
- 32) Kato, T., Nemoto, R., Mori, H. and Kumagai, I.: Sustained-release properties of micro-encapsulated mitomycin C with ethylcellulose infused into the renal artery of the dog. *Cancer* 46 : 14—21, 1980
- 33) 今野俊光, 前田 浩, 横山育三, 岩井 顕, 緒方賢治, 田代征記, 上村邦記, 持永瑞恵, 渡辺栄二, 中熊健一朗, 森永哲夫, 宮内好正: 原発性肝癌の新治療法: 油性リンパ管造影剤リビオドールと親油性高分子制癌剤スマンクスの肝動脈内投与とその臨床成績. *癌と化学療法* 9 : 2005—2015, 1982
- 34) Suzuki, M., Hori, K., Abe, I., Saito, S. and Sato, H.: A new approach to cancer chemotherapy. Selective enhancement of tumor blood flow with angiotensin II. *J. nat. Cancer Inst.* 67 : 663—669, 1981
- 35) Miller, R. A., Maloney, D. G., Warnke, R. and Levy, R.: Treatment of B-cell lymphoma with monoclonal anti-idiotypic antibody. *New Engl. J. Med.* 306 : 517, 1982

- 36) Parks, L. C., Mineberry, D., Smith, D. P. and Neely, W. A.: Treatment of far-advanced bronchogenic carcinoma by extracorporeally induced systemic hyperthermia. *J. thrac. cardiovasc. Surg.* 78 : 883—892, 1979
- 37) Owellen, R. J., Hartke, C. A., Dickerson, R. M. and Hains, F. O.: Inhibition of tubulinmicrotubule polymerization by drugs of the vinca alkaloid class. *Cancer Res.* 36 : 1449—1502, 1976
- 38) Kitagawa, T. and Akamatsu, Y.: Reciprocal effects of phenothiazines and naphthalene sulfonamides on the external ATP-dependent permeability change in Chinese hamster ovary cells. *Biochim. biophys. Acta* 815 : 25—32, 1985
- 39) Kitagawa, T.: Selective inhibition of macromolecular synthesis in transformed mouse cells by means of ATP-treatment. *Biochem. biophys. Res. Commun.* 94 : 167—173, 1980