

腎細胞癌における内因性多剤耐性とその克服

国立姫路病院泌尿器科 (医長: 笥 善行)

笥 善行, 清川 岳彦

京都大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 吉田 修教授)

橋村 孝幸, 吉田 修

CIRCUMVENTION OF THE INTRINSIC MULTIDRUG-RESISTANCE IN RENAL CELL CARCINOMA

Yoshiyuki Kakehi and Takehiko Segawa

From the Department of Urology, National Himeji Hospital

Takayuki Hashimura and Osamu Yoshida

From the Department of Urology, Kyoto University Faculty of Medicine

Most of renal cell carcinomas (RCCs) are refractory at the start of chemotherapy. We have demonstrated that the frequently elevated expression of the multidrug resistance gene (MDR) in RCCs is associated with the intrinsic vinca alkaloids and anthracyclines resistance. The preliminary clinical trials using verapamil or amiodarone in combination with vinblastine or doxorubicin to overcome multidrug-resistant (MDR) tumors could not achieve satisfactory results owing to severe cardiovascular toxicities of such reversing agents. In the present study, we studied the sensitizing ability of bisbenzylisoquinoline (cepharanthine) and SDB-ethylenediamine (N-1379) in natural MDR kidney cancer cells. Cepharanthine remarkably sensitized vinblastine and doxorubicin sensitivities in those cells with high MDR RNA levels. From a clinical point of view, cepharanthine seems to be a potent and less toxic agent to treat natural MDR kidney cancers.

(Acta Urol. Jpn. 38: 1319-1324, 1992)

Key words: Renal cancer, Multidrug resistance, MDR-overcoming agents

緒 言

腎癌細胞の種々の化学療法剤に対するおしなべて低い感受性は、進行症例の治療上大きな障害となっている。化学療法剤投与前から見られる腎癌の内因性多剤耐性現象（自然耐性）にはいくつかの機序が複合的に関与していると思われる。われわれは、抗癌剤の能動的排出ポンプであるP糖蛋白質が腎癌で高率に発現しており、vinca alkaloid系やanthracycline系薬剤などに対する内因性耐性に関与している可能性が高いことを報告してきた^{1,2)}。in vitroでP糖蛋白質からの抗癌剤の排出を阻害し、細胞内の抗癌剤濃度を高める作用を有する薬剤（耐性克服薬剤）のうち verapamil や amiodarone, quinidine などは、米国では白血病や悪性リンパ腫のみならず卵巣癌、腎癌、大腸癌などの固形癌に対してもすでに臨床治験が行われている。しかし、不整脈や低血圧・心不全などの重篤な

副作用などのため、十分な感受性増強効果がえられていない現状である³⁻⁵⁾。従って、副作用が軽微で十分な感受性増強効果がえられる薬剤が期待されている。今回、biscoclairine型alkaloidであるcepharanthineと、verapamilと類似した構造を有し耐性克服薬として合成されたisoplenoid系化合物であるSDB-ethylenediamine (N 1379)について腎癌細胞における耐性克服効果を検討した。

P糖蛋白質の構造と多剤耐性克服薬剤

米国 NIH の I. Pastan やイリノイ大学の I. Roninson らによって単離されたP糖蛋白質のヒト遺伝子 (MDR1) の cDNA より全塩基配列が決定され、この物質が1,280ケのアミノ酸よりなり細胞膜貫通性に存在する膜蛋白であることがほぼ明らかとなった⁶⁾。すなわちP糖蛋白質は膜貫通部分と考えられる6つの疎水性配列が2回反復した構造を有し、おのおのATP結合部位を有する。doxorubicin や vin-

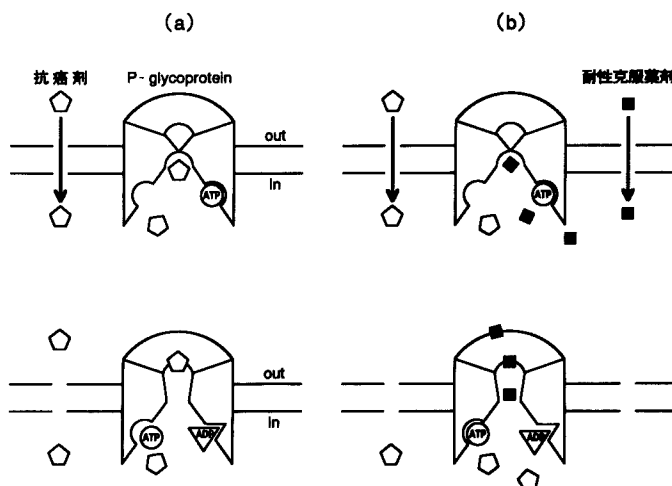


Fig. 1. Schematic model of P-glycoprotein, an drug-efflux pump (a), and the MDR-overcoming agents competitively inhibit drug-efflux (b).

blastine などの疎水性抗癌剤は拡散によって細胞内に入り P 糖蛋白質の細胞質側にある抗癌剤結合部位と結合する。そして ATP の水解エネルギーにより P 糖蛋白質の立体構造が変化し抗癌剤は細胞外へ排出される (Fig. 1-a)。いわゆる多剤耐性克服薬剤と呼ばれる azidopine や verapamil などは P 糖蛋白質の抗癌剤結合部位に結合し、抗癌剤が P 糖蛋白質に結合するのを妨げることにより抗癌剤の細胞内蓄積を増加させると考えられる⁷⁾ (Fig. 1-b)。P 糖蛋白質の薬剤結合部位が単一なのか複数なのかはまだ不明だが、多くの抗癌剤や多剤耐性克服薬剤と結合できることが明らかとなっている。光アフィニティーラベリングにより P 糖蛋白質と直接結合することが確認され、多剤耐性を克服することが細胞レベルで確認されている azidopine⁸⁾, verapamil⁹⁾ および今回の解析対象である cepharanthine (以下 Cep), N1379 の構造を Fig. 2 に示す。これら多剤耐性を克服する薬剤に共通の性質として、多環構造を有し両親媒性 (または脂溶性) で窒素原子を有し、陽性荷電であることが挙げられる。

対象および方法

ヒト腎癌細胞として A704, CAKI-1, CAKI-2, ACHN, NC65, CCF-RC-1 の 6 種を用いた。おのおの MDR1 RNA レベルを Fig. 3 に示す。A704 と CAKI-1 細胞は多剤耐性細胞 KB-8-5 と同等かやや高い発現レベルの細胞であり、CAKI-2 はわずかだが明らかに発現を認めた。これら 6 種の腎癌細胞の指数増殖期に vinblastine (VBL) または adriamycin-

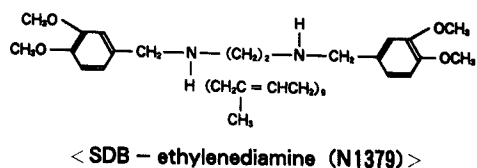
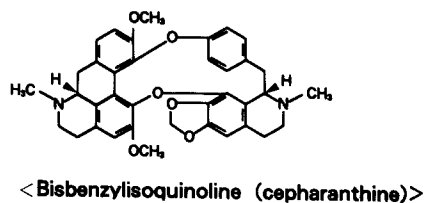
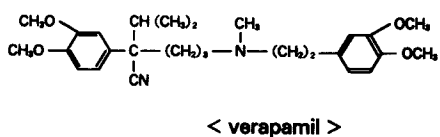
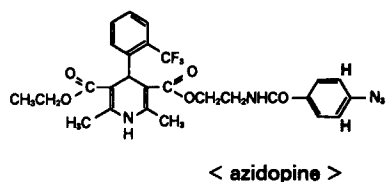


Fig. 2. Structure of azidopine, verapamil, cepharanthine and SDB-ethylene diamine (N-1379).

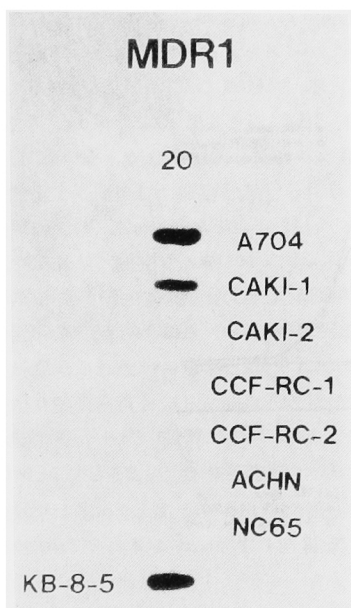


Fig. 3. RNA slot blots which represent the MDR RNA levels of 6 kidney cancer cells and multidrug-resistant KB-8-5 cells. The human MDR cDNA probe (5A) was kindly provided by Dr. Ira Pastan (N.C.I., N.I.H.)

Table 1. IC50 for VBL and the sensitizing index (S.I.) by Cep or N-1379.

cell line	IC ₅₀ values for VBL (ng/ml)		
	control	Cep (S.I.)	N-1379 (S.I.)
A 704	47	3.2 (14.7)	45 (1.04)
CAKI-1	3.2	1 (3.2)	3.8 (0.84)
CAKI-2	0.55	0.063 (8.7)	0.36 (1.53)
CCF-RC-1	0.26	0.33 (0.79)	0.35 (0.76)
ACHN	0.076	0.063 (1.21)	0.076 (1.0)
NC 65	7.2	7.5 (0.96)	7.5 (0.96)

Cep : incubated with 2 μM cepharanthine for A 704, CAKI-1, NC65 or 1.6 μM for CCF-RC-1, ACHN, 1 μM for CAKI-2, respectively.
 N-1379 : incubated with 10 μg/ml of N-1379 (SDB-ethylenediamine)
 S.I. : the sensitizing index
 Each value represents the mean of 4 experiments.

cin (ADM) を単独, もしくは Cep または N1379 を同時添加し, 5~10日後に生細胞数を crystal violet 法¹⁰⁾にて算定した。Cep および N1379 の濃度は単独では殺細胞効果のほとんど見られない濃度とした。これら2剤のおのおのの抗癌剤に対する感受性増強効果は以下の感受性増強指数 (S.I.) として表した。
 S.I.=IC50 (単独)/IC50 (Cep or N1379 併用)

Table 2. IC50 for ADM and S.I. by Cep or N-1379.

cell line	IC ₅₀ values for ADM (ng/ml)		
	control	Cep (S.I.)	N-1379 (S.I.)
A 704	120	13 (9.2)	100 (1.2)
CAKI-1	7.5	5.8 (1.3)	6.3 (1.2)
CAKI-2	61	44 (1.4)	23 (2.7)
CCF-RC-1	6.3	6.4 (0.98)	6.6 (0.95)
ACHN	4.9	4.1 (1.2)	3.7 (1.3)
NC 65	2.8	2.3 (1.2)	2.5 (1.1)

Cep : incubated with 2 μM cepharanthine for A 704, CAKI-1, NC 65 or 1.6 μM for CCF-RC-1, ACHN, 1 μM for CAKI-2, respectively.
 N-1379 : incubated with 10 μg/ml of N-1379 (SDB-ethylenediamine)
 S.I. : the sensitizing index
 Each value represents the mean of 4 experiments.

結 果

6種の腎癌細胞に対する VBL の単独投与もしくは Cep または N1379 同時添加時の IC50 および S.I. を Table 1 に示す。また, ADM 単独, Cep または N1379 併用時の IC50 および S.I. を Table 2 に示す。ただし, Cep の濃度は CAKI-2, CCF-RC-1, ACHN, NC65 ではそれぞれ Cep 単独では殺細胞効果を示さない濃度まで減じている。VBL に対しては Cep が A704, CAKI-1, CAKI-2 の3細胞において明らかな感受性増強効果を示したが, N1379 は明らかな増強効果を示さなかった。ADM に対しては Cep が A704 細胞において, N1379 が CAKI-2 において明らかな感受性増強効果を示した。Cep により VBL に対する明らかな感受性増強効果がみられた A704, CAKI-1, CAKI-2 細胞, およびほとんど見られなかった ACHN 細胞における増殖阻止曲線を Fig. 4 に提示する。

考察および臨床応用への展望について

腎癌に対する抗癌剤の効果は, 単独では VBL や pyrimidine 拮抗剤などごく少数の薬剤で10%前後の奏功率を示すのみでおしなべてきわめて低い¹¹⁾。われわれはこれまでに, 腎癌では MDR1 遺伝子の発現が多剤耐性細胞 KB-8-5 と同等かそれ以上のものが50%以上であること²⁾, さらにこの高い発現が VBL や ADM に対する腎癌細胞の内因性耐性に関与する可能性が高い¹²⁾ ことを報告してきた。KB-8-5 細胞はコルヒチンを選択薬剤としてえられた多剤耐性細胞で, MDR1 RNA の上昇はあるが遺伝子増幅は伴わない。親株の KB-3-1 に比し VBL, ADM に対し3~6倍程度の耐性度を示し臨床レベルの多剤耐性に近

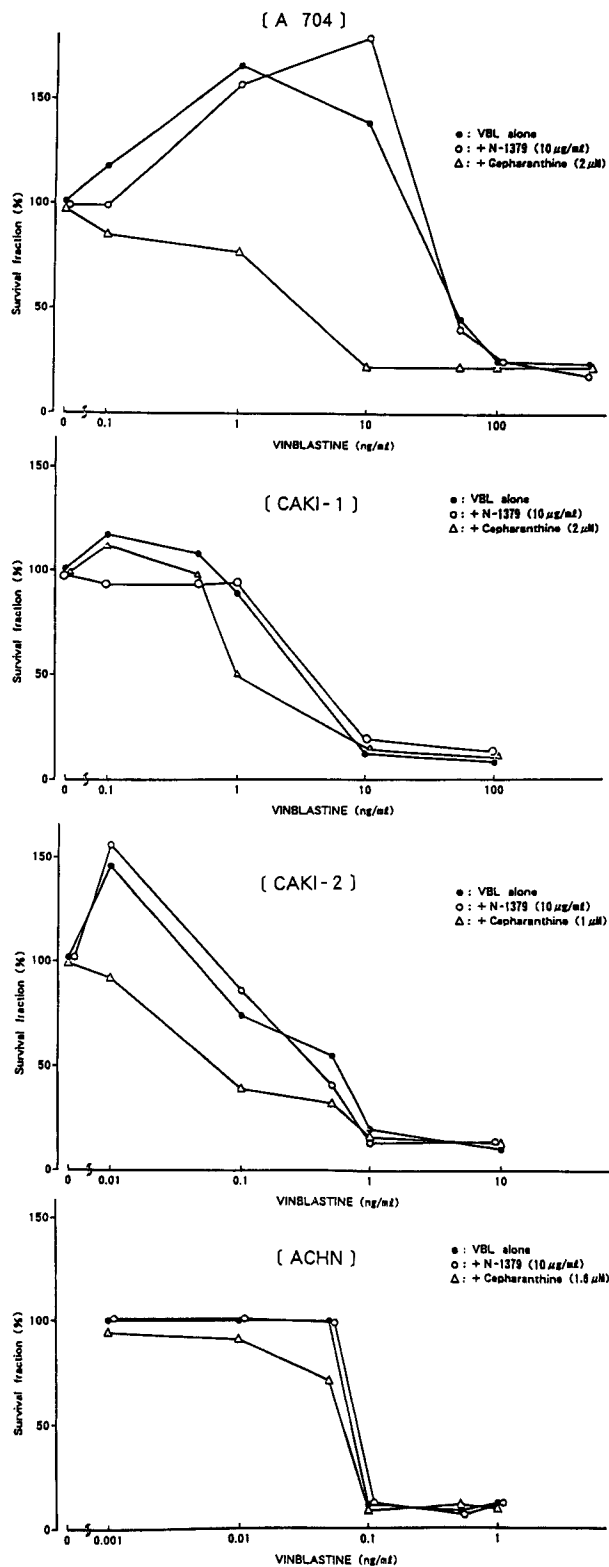


Fig. 4. Growth inhibition curves of A704, CAKI-1, CAKI-2, ACHN cells by VBL with or without Cep and N-1379.

い細胞である¹²⁾. Fig. 3 に示すように今回実験対象とした腎癌細胞のうち A704 と CAKI-1 はそれぞれ KB-8-5 よりやや高いか同等の MDR1 RNA レベルを有し¹³⁾. Table 1 に示すように VBL や ADM に対する IC50 ともかなり相関しており, 臨床腎癌の自然耐性をよく反映した細胞と考えられる.

今回の解析では, Cep が VBL に対しては A704, CAKI-1, CAKI-2 細胞で, ADM に対しては A704 で明らかな感受性増強効果を示した. MDR1 RNA レベルの低い NC65, ACHN や CCF-RC-1 細胞では増強効果が認められなかったことは, Cep の感受性増強効果が P 糖蛋白質を介した競合的阻害作用であることを示唆する. 一方, N1379 は CAKI-2 細胞において ADM に対して 2.7 倍の増強効果を示した以外は明らかな効果は認められなかった. 日清精粉(株)にて合成された N1379 は Ca チャンネル拮抗剤 verapamil と類似した部分構造を有し, チャイニーズハムスター V79/ADM (多剤耐性細胞) などで強力な抗癌作用増強効果が確認され¹⁴⁾, かつ動物(イヌ)試験では verapamil のような血圧低下作用が観察されていない. 今回の解析では自然耐性の腎癌細胞に対して, とりわけ VBL に対して目立った増強効果が見られなかったが, 他の腎癌細胞(CRL1611)では今回と同程度の濃度で増強効果を認めたとの報告もあり(第2回 N-1379 基礎研究会発表資料, 1987年9月21日), 今後さらに検討する必要があると思われる.

さて, Cep はタマサキツジラフジから抽出された植物アルカロイドで, 古く結核薬として開発され, 最近では白血球減少症, 円形脱毛症, マムン咬傷などに使用されている. 1987年, 大分医大の桑野らのグループが多剤耐性細胞 KB-Ch-24 で強力な耐性克服作用を報告し¹⁵⁾, 多剤耐性克服薬として新たに注目されている薬剤である. 以後, 小児の再燃白血病症例などで vincristine との併用療法などが試みられつつある¹⁶⁾. 今回のわれわれの解析結果は腎癌の自然耐性の克服にも効果が期待できることを示唆するものであった. すでに, われわれは骨や腎などの動脈内注入可能な病巣に対し抗癌剤と Cep の併用療法を開始している. 最後に, 腎癌の大腿骨への孤立性転移に対し, VBL および ADM の動脈内注入に Cep を併用し良好な結果のえられた1例を紹介する.

症 例

症例: 52歳, 女

主訴: 右大腿部痛

現病歴: 1989年3月, 右腎腫瘍のため右腎摘除術施

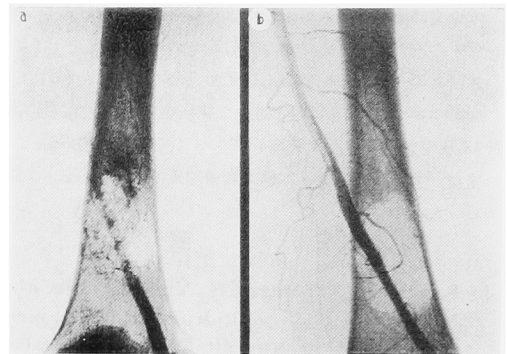


Fig. 5. The right femoral arteriography before chemotherapy (a) and after 3 courses of VBL, ADM and Cep injection (b).

行. 腎細胞癌 (clear cell type), pT2bV0N0M0 であった. 1991年2月頃より右大腿部痛出現, X-p 上右大腿骨に孤立性溶骨性病変を認めた. 血管造影にて hypervascular であり腎癌よりの転移と診断, 他に転移を認めなかったため, 4月よりリニアック 50Gy 照射, γ -インターフェロン (イムノマックス 2×10^6 JU, 5/週 \times 1月), α -インターフェロン投与 (HLBI 3×10^6 U, 2/週 \times 2月) などを行ったが病変の縮小が見られなかった. そのため右大腿動脈内に注入用カテーテルを留置し, Cep 10 mg を注入後, VBL 10 mg を注入した. 2週後に Cep 10 mg + VBL 5 mg を, さらに2週後に Cep 10 mg + VBL 2 mg + ADM 20 mg を注入投与した. その結果, Fig. 5-a.b に示すように溶骨性病変は残存するものの腫瘍血管の完全な消失を認めた. その後, 2~4週毎に Cep 10 mg + VBL 2 mg + ADM 10 mg の注入と HLBI (3×10^6 U, 2/週) の併用療法を続けている. この間, 動脈内注入時に Cep によると思われる大腿部の灼熱感, および 5~10日後に VBL によると思われる大腿後面の痛みを訴えたが, それら以外に特に副作用を認めていない. その後, 他に遠隔転移を認めないため, 現在, 右大腿骨の部分切除を検討中である.

結 語

腎癌細胞の抗癌剤に対する自然耐性現象を克服する可能性のある薬剤の中から, 副作用が少なく臨床応用の期待が持てる Cep, および SDB-ethylenediamine (N1379) の2剤について検討した. Cep は P 糖蛋白質の発現の高い腎癌細胞で VBL や ADM に対して明らかな感受性増強効果を示した. Cep は臨床応用可能な多剤耐性克服薬として期待できると思われる.

本論文は第41回日本泌尿器科学会中部総会におけるシンポジウムの内容をまとめたものである。

本研究の一部は厚生省がん研究助成金によって行われた。

cepharanthine を供与下さった化研生薬(株)ならびに N-1379 を供与下さった日本レダリー(株)に深謝する。

また、実験を介助賜った橋本真由美氏に深謝する。

文 献

- 1) Kakehi Y, Kanamaru H, Yoshida O, et al.: Measurement of multidrug-resistance messenger RNA in urogenital cancers; elevated expression in renal cell carcinoma is associated with intrinsic drug resistance. *J Urol* **139**: 862-865, 1988
- 2) Kanamaru H, Kakehi Y, Yoshida O, et al.: MDRI RNA levels in human renal cell carcinomas: correlation with grade and prediction of reversal of doxorubicin resistance by quinidine in tumor explants. *J Natl Cancer Inst* **81**: 844-849, 1989
- 3) Ozols RF, Cunnion RE, Klecker RW Jr, et al.: Verapamil and adriamycin in the treatment of drug-resistant ovarian cancer patients. *J Clin Oncol* **5**: 641-647, 1987
- 4) Van Der Graaf WTA, De Vris EGE, Uges DRA, et al.: In vitro and in vivo modulation of multi-drug resistance with amiodarone. *Int J Cancer* **48**: 616-622, 1991
- 5) Chabner BA and Wilson W: Reversal of multidrug resistance (editorial). *J Clin Oncol* **19**: 4-6, 1991
- 6) Chen C, Chin JE, Ueda K, et al.: Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the mdrl (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell* **47**: 381-389, 1986
- 7) Gottesman MM and Pastan I: The multidrug transporter, a double-edged sword (minireview). *J Biol Chem* **263**: 12163-12166, 1988
- 8) Kamiwatari M, Nagata Y, Kikuchi H, et al.: Correlation between reversing of multidrug resistance and inhibiting of [³H] azidopine photolabeling of P-glycoprotein by newly synthesized dihydropyridine analogues in a human cell line. *Cancer Res* **49**: 3190-3195, 1989
- 9) Safa AR: Photoaffinity labeling of the multidrug-resistance-related P-glycoprotein with photoactive analogues of verapamil. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 7187-7191, 1988
- 10) Lee SH, Aggarwal BB, Rinderknecht E, et al.: The synergistic anti-proliferative effect of γ -interferon and human lymphotoxin. *J Immunol* **133**: 1083-1086, 1984
- 11) Yagoda A: Chemotherapy of renal cell carcinoma: 1983-1989. *Semin Urol* **7**: 199-206, 1989
- 12) Shen DW, Fojo A, Chin JE, et al.: Human multidrug-resistant cell lines: increased mdrl expression can precede gene amplification. *Science* **232**: 643-645, 1986
- 13) Fojo AT, Ding-Wu S, Mickley LA, et al.: Intrinsic drug resistance in human kidney cancer is associated with expression of a human multidrug resistance gene. *J Clin Oncol* **5**: 1922-1927, 1987
- 14) Nakagawa M, Akiyama S, Yamaguchi T, et al.: Reversal of multidrug resistance by synthetic isoprenoids in the KB human cancer cell line. *Cancer Res* **46**: 4453-4457, 1986
- 15) Shiraishi N, Akiyama S, Nakagawa M, et al.: Effect of bisbenzylisoquinoline (biscoclaurine) alkaloids on multidrug resistance in KB human cancer cells. *Cancer Res* **47**: 2413-2416, 1987
- 16) 山本 茂, 表 作輝, 辰巳和人, ほか: 臨床的ビンクリスチン耐性小児急性リンパ性白血病再発例に対するビンクリスチンとセフアレランチンの併用療法の検討. *日小児会誌* **93**: 1119-1125, 1989
(Received on August 19, 1992)
(Accepted on August 24, 1992)
(迅速掲載)