

尿路性器癌培養細胞の細胞増殖におよぼす Rhodamine 123 の影響

奈良県立医科大学泌尿器科学教室 (主任: 岡島英五郎教授)

平尾 佳彦, 北川 恒代, 吉江 貫, 二見 孝
百瀬 均, 大園誠一郎, 岡島英五郎

THE EFFECTS OF RHODAMINE 123 ON THE CELL GROWTH OF THE CULTURED CELLS DERIVED FROM UROGENITAL CARCINOMA

Yoshihiko Hirao, Hisayo Kitagawa, Thoru Yoshie,
Takashi Futami, Hitoshi Momose, Seiichiro Ozono
and Eigorō Okajima

From the Department of Urology, Nara Medical University

Rhodamine 123 (Rh123) is a red fluorescence dye, which is accumulated more and retained longer in the mitochondria of malignant transformed cells. In this study, the suppressive effects on the growth of cultured urogenital carcinoma cells (PC-3 and LNCaP from prostate carcinoma, T-24 from bladder cancer, and SV-HUC-1 human ureteral transitional cell transformed by SV virus in vitro, ACHN, YCR-1 and RCF213 from renal cell carcinoma) were examined. The cell growth of PC-3, LNCaP, T-24 and SV-HUC-1 was suppressed significantly in a dose dependent manner, but that of cells derived from renal cell carcinoma was not suppressed. The uptake and elimination of Rh123 in PC-3, ACHN and YCR-1 were not significantly different. When administered with verapamil and buthionine sulfoximine, which are reported to be chemical modulators of anticancer agents, Rh123 suppressed the growth of ACHN and YCR-1 significantly. Rh123 seems to have an anticancer effect against the urogenital carcinomas, and the role of Rh123 with hyperthermia, photodynamic therapy and chemotherapy requires further investigation.

(Acta Urol. Jpn. 39: 1233-1240, 1993)

Key words: Rhodamine 123, Culture cells, Cell growth inhibition, Urogenital carcinoma

緒 言

従来の抗癌剤は核酸を標的とするものが大半を占めるが, mitochondria を標的とした抗癌剤についての検討は殆んど報告されていないのが現状である。Rhodamine 123 (Rh123) は赤色蛍光色素で, mitochondria に選択的に集積する特性があり¹⁾, 癌細胞では正常細胞に比較してより多くより長時間蓄積し²⁾, mitochondria 毒性を示し, 癌細胞の増殖を抑制することが報告されている³⁾。今回, Rh123 の尿路性器癌細胞に対する増殖抑制効果並びにその修飾因子について検討したので報告する。

実験材料と方法

Rh123 (Sigma Chemical Co. 2-[6-amino-3-imino 3H-xanthen-9-yl] benzoic acid methyl ester, 分子量380.83) は, Fig. 1 に示す化学構造式をもつ赤色蛍光色素で, あらかじめ DMSO にて 10 mg/ml に溶解し, 遮光下に冷所保存し, 使用にあたって生理食塩液で適宜希釈し培養液に添加した。

泌尿器科癌由来細胞株として, 前立腺癌として PC-3 と LNCaP, 移行上皮癌として T-24, また in vitro で SV 感染したヒト尿管由来移行上皮 SV-HUC-1, 腎細胞癌として ACHN, YCR-1 および RCF 213 (教室樹立) を用いた。PC-3, LNCaP および ACH-

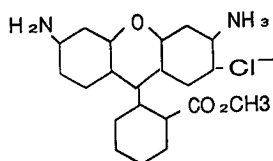


Fig. 1. Chemical structure of Rhodamine123.

N は大日本製薬 cell bank から購入し、T-24, SV-HUC-1 と YCR-1 は横浜市立大学医学部泌尿器科学教室から提供を受けた。

培養液は 7% FCS を添加した F12K を用いたが、LNCaP には 10% FCS 添加 RPMI 1640 を用いた。細胞は原則として 35 mm petridish に 5×10^4 細胞を播種し、5% CO_2 , 37°C の incubator で培養した。

Rh123 の添加濃度、添加時間を変えた予備実験で、Rh123 は 6 時間以内の短時間の添加では細胞増殖を抑制しないことが明らかになり、今回は細胞播種 24 時間後に 1, 2.5, 5 および $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で培養液に Rh123 を 24 時間添加し、以後、Rh123 無添加培養液で培養し、添加後 7~10 日目に細胞数を測定し細胞増殖について検討した。

Rh123 の細胞内濃度の経時変化について、PC-3 と ACHN, YCR-1 を用いてフローサイトメトリー (FCM: FACSCAN, Benton-Dixton, Inc.) で細胞内の取り込みと排泄について検討した。PC-3, ACHN および、YCR-1 の培養液に Rh123 を 1.25 および

$5 \mu\text{g}/\text{ml}$ を添加し、経時的に 30, 60, 90, 180 分後に、FCM で細胞蛍光強度を測定した。また、Rh123 を 150 分添加後に Rh123 無添加培養液で、30, 60, 120 および 180 分後に測定した。

腎細胞癌では抗癌剤に対する内因性薬剤耐性が発現することが知られているが、 Ca^{2+} 拮抗剤である verapamil (エーザイ株式会社) や glutathione redox cycle に関与する buthionine sulfoximine (BSO: Sigma Chemical Co.) による Rh123 の細胞増殖抑制の修飾について、ACHN, YCR-1 を用いて検討した。

結 果

1) Rh123 による尿路性器癌培養細胞の増殖抑制について

PC-3, LNCaP および T-24, SV-HUC-1 は Fig. 2, 3 に示すように、添加した Rh123 の用量に相関して増殖が抑制されたが、しかし ACHN, YCR-1, RCF213 は、Fig. 4 に示すごとく、高濃度の Rh123 で ACHN に軽度の増殖抑制が見られた以外、移行上皮や前立腺癌由来細胞と同じ用量の Rh123 では細胞の増殖抑制は見られなかった。

2) FCM による Rh123 の蛍光強度について

腎細胞癌由来細胞株の Rh123 による細胞増殖抑制に抵抗する特性について、FCM を用いて Rh123 の細胞内の取り込みと排泄を検討した。細胞は Rh123 による抑制のみられた PC-3 と細胞増殖の抑制がみ

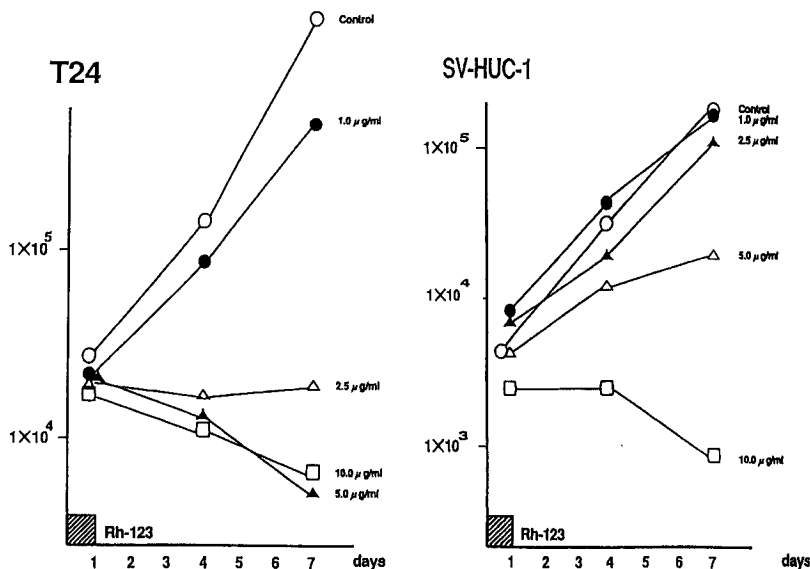


Fig. 2. The effects of Rhodamine123 on the cell growth of transitional cell carcinomas cells.

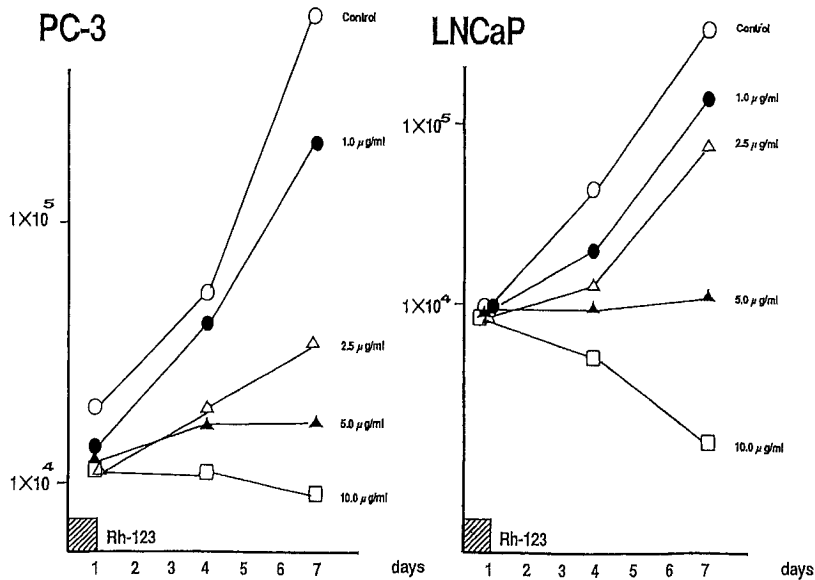


Fig. 3. The effects of Rhodamine123 on the cell growth of prostate carcinoma cells.

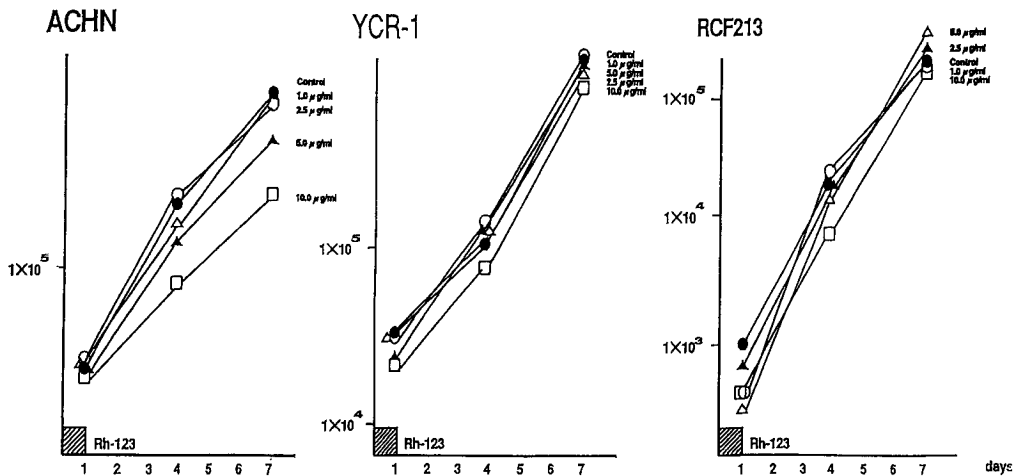


Fig. 4. The effects of Rhodamine123 on the cell growth of renal cell carcinoma cells.

られなかった YCR-1 では、経時的に測定した細胞蛍光強度は両者においてまったく差異がなかった (Fig. 5)。Rh123 による軽度の増殖抑制の見られた ACHN とまったく抑制の見られなかった YCR-1 の蛍光強度の比較では、増殖抑制とは逆に、ACHN は Rh123 を 1.25 および 5 µg/ml 添加後の経時的な取り込み (Fig. 6) や Rh123 無添加培養液に変えた後の経時的な残留 (Fig. 7) においても、YCR-1 より蛍光強度が低い傾向が見られたが、有意の差は見られなかった。このことより腎細胞癌由来細胞が Rh123 によって増殖が抑制されなかった原因は、Rh123 の細

胞内濃度とは関係のない別の機構が存在することが推察された。また、Rh123 添加後の細胞の蛍光強度のピークは時間と共に右方にシフトし、Rh123 添加により G2/M ブロックが起これ、細胞分裂が抑制されることが推察された (Fig. 8)⁴⁾。

3) Rh123 による腎細胞癌培養細胞の増殖抑制効果の修飾について

Rh123 が腎細胞癌由来細胞の増殖を抑制しない機序を解明するために、種々の濃度の BSO および verapamil と、ACHN および YCR-1 で増殖抑制効果のほとんどない 5 µg/ml の濃度の Rh123 との併

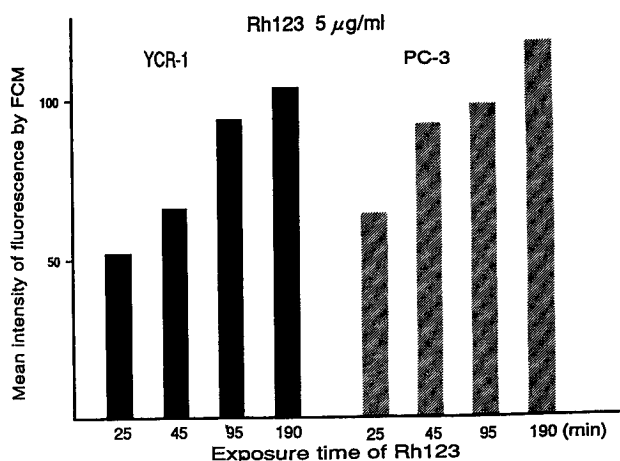


Fig. 5. The uptake changes of fluorescence intensity of Rh123 in PC-3 and YCR-1 by FCM.

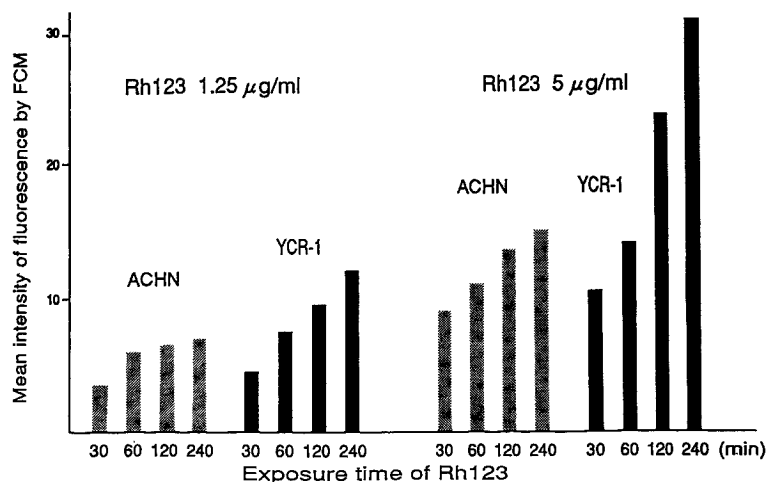


Fig. 6. The uptake changes of fluorescence intensity of Rh123 in ACHN and YCR-1 by FCM.

用について検討した。

予備実験の結果から、BSO は 5, 10 および 25 μM の濃度で Rh123 添加の 48 時間前から培養液に添加し、ACHN と YCR-1 を用いて Rh123 5 $\mu\text{g/ml}$ との併用による細胞増殖について検討した。BSO は ACHN および YCR-1 細胞に対して 10 μM 以上の濃度では細胞毒性が強く発現し、その併用効果は明らかではないが、毒性の発現しない 5 μM では明らかに強い増殖抑制効果がみられた。ACHN は YCR-1 に比較して BSO の毒性の発現が軽度で、Rh123 単独では増殖抑制の軽度な Rh123 の 5 $\mu\text{g/ml}$ の添加で、BSO の用量に相関して強い増殖抑制が見られた。YCR-1

は BSO の細胞毒性が強く発現し、併用効果は明らかではないが、毒性の発現しない 5 μM では併用により強い増殖抑制効果が見られた (Fig. 9)。

予備実験の結果から、ACHN と YCR-1 を用いて verapamil は 2.5, 5, 10 および 20 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で Rh123 添加の 1 時間前に培養液に添加し、Rh123 5 $\mu\text{g/ml}$ との併用による細胞増殖について検討した。ACHN に対する verapamil による細胞毒性は比較的少なく、verapamil の用量に相関して Rh123 の細胞増殖抑制効果が発現した。一方 YCR-1 は verapamil の用量に相関して ACHN より強い細胞増殖抑制の発現が見られた (Fig. 10)。

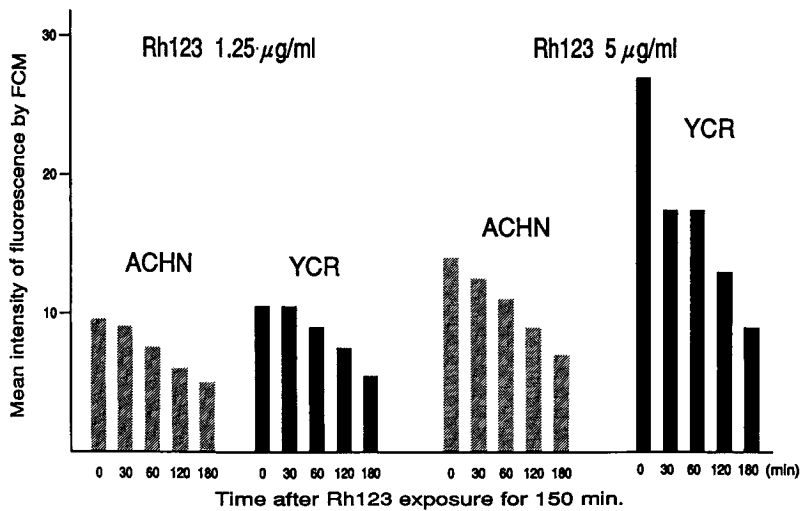


Fig. 7. The elimination changes of fluorescence intensity of Rh123 in ACHN and YCR-1 by FCM.

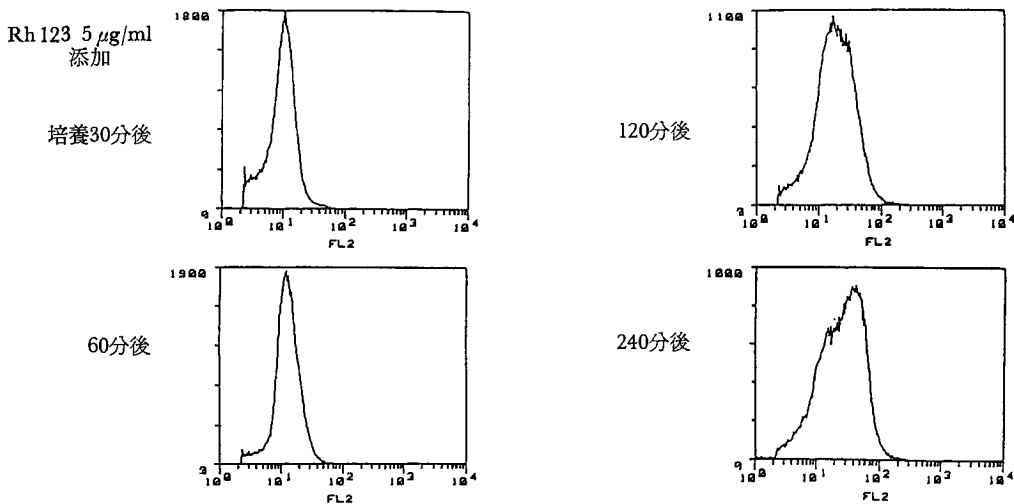


Fig. 8. The changes of fluorescence in YCR-1 by FCM.

考 察

尿路性器癌の治療は化学療法を中心とした補助療法の進歩により、その成績は向上したが、抗男性ホルモン不応前立腺癌に対しては有効な治療はなく、化学療法でも自覚症状の軽減などの近接効果は見られるものの生存率の改善には寄与していないのが現状で、また進行腎細胞癌においても免疫療法に期待が寄せられているが、化学療法はほとんど奏効せず、有効な治療がないのが現状といっても過言ではない。進行癌に対する治療として、全身療法である化学療法は今後ますます

重要な位置を占め、抗癌剤の感受性の増強や副作用の軽減を図るとともに、これらの治療の困難な癌腫に対する新しい展開による抗癌剤の開発が望まれる。

従来の抗癌剤の多くは核酸代謝関連物質であり、糖代謝に関連した抗癌剤はいまだ開発されていない。とくに細胞内エネルギー代謝に深く関与する mitochondria を標的にした抗癌剤についてはほとんど検討されていないのが現状である。

Rh123 は比較的新しく開発された赤色素で、脂溶性で陽性に荷電しており、511 nm の励起で蛍光を

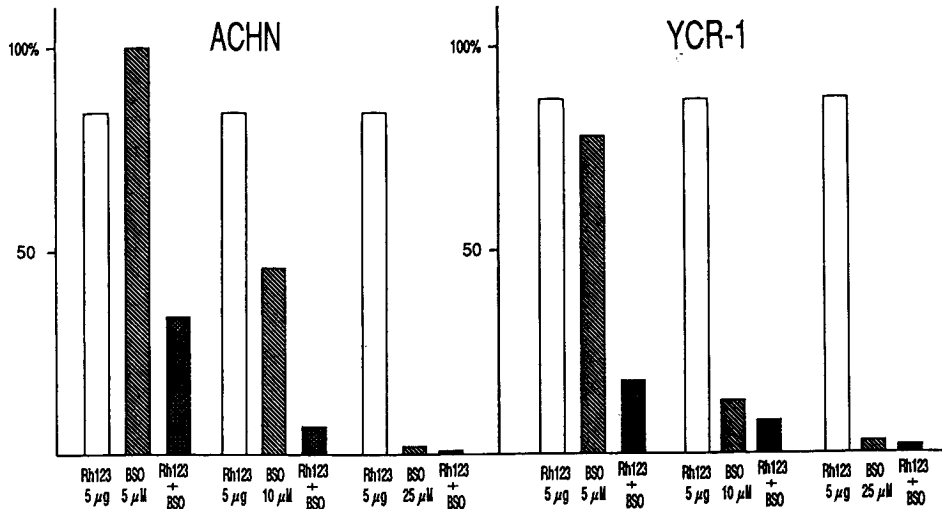


Fig. 9. The effects of BSO and Rh123 on the cell growth of ACHN and YCR-1.

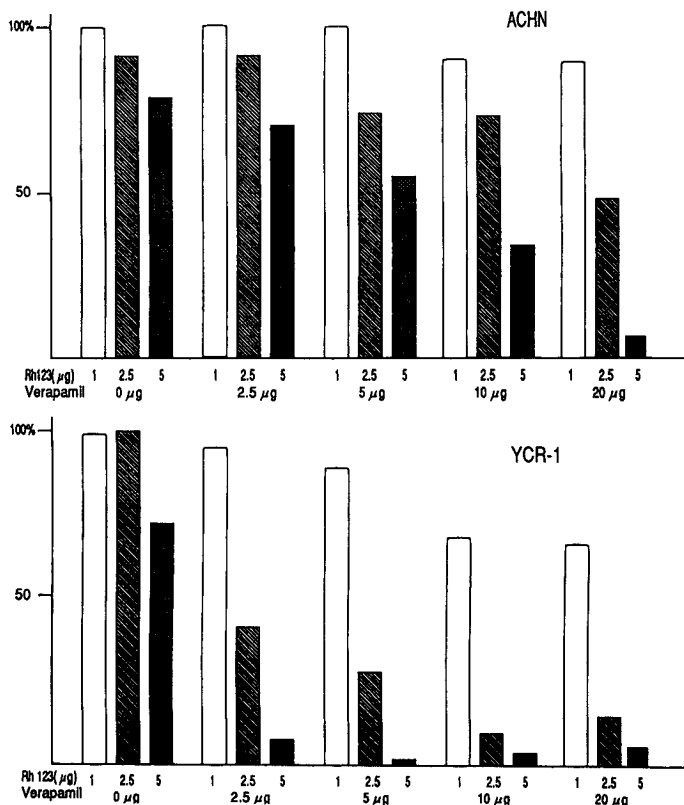


Fig. 10. The effects of verapamil and Rh123 on the cell growth of ACHN and YCR-1.

発する。1980年に Johnson ら¹⁾によって mitochondria に選択的に集積される性質が明らかになり、mitochondria の選択的な生体染色を中心とした研究に

用いられてきた。1982年に Summerhayes ら²⁾によって malignant transformed cells の mitochondria に、より多く、より長時間集積する性質が見い

だされ、1982年には Barnal ら³⁾により *in vitro* で癌細胞に対する選択的な毒性とマウス移植腫瘍に対する抗腫瘍活性が報告された。

Rh123 による癌細胞増殖抑制のメカニズムは、正常細胞に比して悪性腫瘍細胞の mitochondria には Rh123 がより多く集積し、長時間蓄積することにより、mitochondria 依存性のエネルギー代謝、oxidoreductase の阻害ならびに酸化リン酸化障害が生じ、細胞内の合成障害が惹起され、細胞毒性を示すことが明らかになっている⁵⁾。Rh123 の効果増強に関しては、温熱により Rh123 の毒性が増強されることや、photochemosensitizing effects のあることが報告されている^{6,7)}。これらの報告は頭頸部腫瘍が中心で、泌尿器科領域の悪性腫瘍についての報告は少ない。泌尿器科領域においては1986年に Arcadi⁸⁾ がマウス可移植前立腺腫瘍細胞 (R3327-H) の増殖抑制について報告したのが最初で、その後1988年に Herr ら⁹⁾ が murine renal adenocarcinoma を用いて Rh123 が抗腫瘍効果を有することを報告し、その作用は 2-deoxyglucose や MGBG などの糖代謝阻害剤で増感されるとしている。

今回、尿路性器癌由来培養細胞を用いて Rh123 の増殖抑制効果を検討した結果では、移行上皮由来の細胞や前立腺癌由来の細胞では Rh123 の用量に相関して細胞増殖抑制がみられたが、腎細胞癌ではその効果がみられないという興味ある結果がえられた。腎細胞癌由来の培養細胞株には MDR1 の発現に差があることはよく知られており¹⁰⁾。一方、Rh123 による腎細胞癌培養細胞に対する薬剤耐性には p-糖蛋白が関与していることも知られている¹¹⁾。今回用いた腎細胞癌由来の細胞のうち、ACHN は MDR1 の発現が低い細胞で、YCR-1 は MDR-1 の発現の高い細胞であり、内因性薬剤耐性に関与する薬剤である verapamil や BSO と Rh123 の併用により、細胞増殖が抑制されたことにより、ACHN, YCR-1 の Rh123 に対する薬剤耐性には P-糖蛋白以外に、glutathione redox cycle の関与する解毒機構の関与も示唆された。

Mitochondria に選択的に作用する他の抗癌剤としては Gossypol (phenolic cotton seed extract) や Lonidamine (indazole carboxylic acid) が開発されており、特に Lonidamine は前立腺癌に有用性がある報告がみられ¹²⁾、また本邦においてもすでに臨床第2相試験が開始され、今後の進展が期待されている。

Rh123 はすでに基礎医学分野において細胞形態、細胞生理・薬理学などにおいて生体染色剤として広く用いられているが、腫瘍学においては、その染色性が

ら抗癌剤、温熱、光力学などの抗癌治療の感受性試験に応用が可能で、治療としては Rh123 自身が抗癌効果を有するとともに、抗癌剤、温熱療法、光力学療法の増感剤としての応用も期待でき、今後さらに、他の抗癌剤との併用効果や他の内因性薬剤耐性克服剤との併用について検討を進める必要がある。

結 語

Rh123 は泌尿器科癌由来細胞の増殖を抑制し、その抑制効果は種々の biochemical modulation により修飾されることを明らかにしたが、今後、さらに温熱療法、光力学的治療および抗癌剤による修飾を検討する必要がある。

文 献

- 1) Johnson LV, Walsh ML and Chen LB: Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123. *Proc Natl Acad Sci USA* **77**: 990-994, 1980
- 2) Summerhayes IC, Lampidis TJ, Bernal SD, et al.: Unusual retention of rhodamine 123 by mitochondria in muscle and carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **79**: 5292-5296, 1982
- 3) Bernal SD, Lampidis TJ, Summerhayes IC, et al.: Rhodamine-123 selectively reduces clonal growth of carcinoma cells *in vitro*. *Science* **218**: 1117-1118, 1982
- 4) Shinomiya N, Tsuru S, Katsura Y, et al.: Increased mitochondrial uptake of rhodamine 123 by CDDP treatment. *Exp Cell Res* **198**: 159-163, 1992
- 5) Modica-Napolitano JS and Aprile JR: Basis for the selective cytotoxicity of rhodamine 123. *Cancer Res* **47**: 4361-4365, 1987
- 6) Krag DN, Theon AP, Gan L, et al.: Reversal of thermochemotherapeutic resistance to rhodamine 123 by verapamil. *Int J Hyperthermia* **6**: 933-941, 1990
- 7) Costero DJ, Saxton RE, Feterman HR, et al.: Rhodamine-123 as a new photosensitising agents with the argon laser: "non thermal and thermal effects on human squamous carcinoma cells *in vitro*". *Laryngoscope* **97**: 554-561, 1989
- 8) Arcadi JA: Rhodamine-123 as effective agent in rat prostate tumor R3327-H*: preliminary report. *Urology* **18**: 501-503, 1986
- 9) Herr HW, Huffman JL, Huryk R, et al.: Anticarcinoma activity of rhodamine 123 against a murine renal adenocarcinoma. *Cancer Res* **48**: 2061-2063, 1988
- 10) 寛 善行, 清川岳彦, 橋村孝幸, ほか: 腎細胞癌

- における内因性多剤耐性とその克服. 泌尿紀要
38: 1319-1324, 1992
- 11) Efferth T, Lohrke H and Volm M: Reciprocal correlation between expression of P-glycoprotein and accumulation of rhodamine 123 in human tumors. *Anticancer Res* **9**: 1633-1638, 1989
- 12) Stewart DJ, Aitken SE, Irvine AH, et al.: Phase II study of lonidamine in metastatic prostatic carcinoma. *Invest New Drugs* **9**: 343-344, 1991

(Received on October 19, 1993)
(Accepted on October 22, 1993)