

Bisbenzylisoquinoline による腎癌の多剤耐性の克服

京都大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 吉田 修教授)

寛 善行, 橋村 孝幸, 吉田 修

国立姫路病院泌尿器科 (医長: 日裏 勝)

清川 岳彦, 兼松 明弘

CIRCUMVENTION OF THE MULTIDRUG-RESISTANCE IN RENAL CANCER BY BISBENZYLISOQUINOLINE

Yoshiyuki Kakehi, Takayuki Hashimura and Osamu Yoshida

From the Department of Urology, Kyoto University Faculty of Medicine

Takehiko Segawa and Akihiro Kanematsu

From the Department of Urology, National Himeji Hospital

A bisbenzylisoquinoline alkaloid, cepharanthine, significantly enhanced vinblastine, adriamycin and etoposide sensitivities in P-glycoprotein positive renal cancer cells. However, it did not show any enhancing effect on cisplatin sensitivity. Four patients with metastatic renal cell carcinomas were treated with intraarterial chemotherapy using vinblastine and/or adriamycin in combination with cepharanthine for their metastatic lesions (3 bone and 1 contralateral kidney metastases). A partial response was observed in 1 patient with femoral bone metastasis and a minor response in 1 patient with lumbar bone metastasis, although they were also treated with interferons. No adverse effects associated with cepharanthine were seen except in one patient complaining of redness and burning sense of the skin probably due to its vaso-dilatation effect.

(Acta Urol. Jpn. 39: 1227-1232, 1993)

Key words: MDR, Renal cell carcinoma, Bisbenzylisoquinoline

緒 言

われわれは腎癌の抗癌剤に対する内因性多剤耐性 (MDR) に, P-glycoprotein (以下 P170) や glutathione redox cycle などの関与の可能性を報告してきた^{1,2)}。特に, P170 は腎癌では高頻度で高い発現を示し, 内因性 MDR に深く関与すると考えられている。現在, 進行腎癌の治療の中心は interferon (I-FN) を主体とした BRM 療法であるが, その治療効果もいまだ満足すべきものではない。われわれは腎癌における P170 の高い発現を逆に利用した化学療法の可能性を基礎的に検討してきた。具体的には, P170 に親和性を有し, 抗癌剤の腎癌細胞よりの排出を競合的に阻害する薬剤 (MDR 克服薬) の併用投与による膜レベルでの modulation である。われわれはこれまでに, quinidine や, verapamil と構造一部類似の合成イソプレノイドである N1379, nifedipine の部分アナログである AHC52, 植物アルカロイドで

ある bisbenzylisoquinoline を主成分とする cepharanthine (以下 cep) などの MDR 克服効果について報告してきた^{3,4)} が, 今回は, それらの中から cep についての基礎的検討を紹介し, 若干の臨床応用を試みたので報告する。

ヒト腎癌細胞における cep の MDR 克服効果

対象および方法

高い MDR1 RNA レベルを示し, 内因性 MDR の良いモデル細胞と考えられる A704 細胞^{2,5)} と, ACHN 細胞より vinblastine (VBL) を選択薬剤としてえた MDR 細胞 ACVB3.5 を用いた。ACVB 3.5 は ACHN に比べ VBL に対し 32倍, adriamycin (ADR) に対し 14倍耐性で, P170 を発現している (Fig. 1)。細胞を24穴プレートに 5,000/ml ずつ散布し, 抗癌剤単独もしくは cep の同時添加を行い, 5日ないし10日間培養後, 生細胞数を crystal violet に

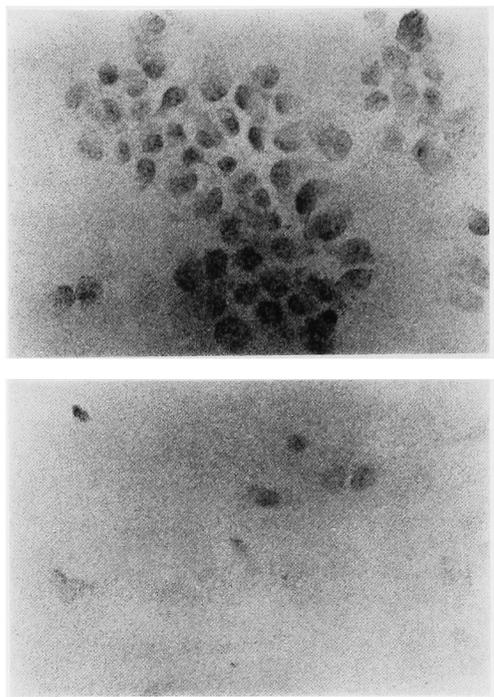


Fig. 1. Immunohistochemical staining of P170 using MRK-16 (a kind gift from Dr. T. Tsuruo). ACVB 3.5 cells were positive for P170 (upper) and ACHN cells were negative (lower).

て染色し Sorenson's buffer で色素を溶解後、590 nm の吸光度を測定した。cep は単独では殺細胞効果のほとんど見られない濃度 (A704 では $2 \mu\text{M}$, ACV-B 3.5 では $0.4 \mu\text{M}$) で添加した。

結果

A704 細胞における VBL, ADR, etoposide (vp-16), cisplatin (CDDP) による増殖阻止曲線を示す (Fig. 2-A)。cep は VBL, ADR に対しては IC50 でおおの15倍、9倍の明らかな感受性増強効果を示したが、VP-16, CDDP に対しては感受性の増強は見られなかった。ACVB 3.5 細胞において cep は、V-

BL に対し18倍、ADR に対し10倍、VP-16 に対しても5倍の感受性増強効果を示したが、CDDP に対しては増強効果は見られなかった (Fig. 2-B)。

cep を併用した腎癌転移巣に対する動注化学療法

遠隔転移を有する4例の腎細胞癌症例 (国立姫路病院) に対し、VBL, ADR に cep を併用した動脈内注入化学療法を施行した。4症例の病像、治療内容の概要を Table 1 にまとめた。症例1は原発巣摘除2年後に出現した右大腿骨の孤立性転移で、治療経過の一部はすでに報告したが、腫瘍血管の完全消失を見たため (Fig. 3)、転移巣を含め大腿骨の部分切除を行った。切除標本では腫瘍の大部分は壊死に陥っていたが、一部に腫瘍細胞の残存を認めた (Fig. 4)。1年を経過した現在、再発を認めていない。症例2は対側腎に出現した多発転移に対し動注を行った。動注終了直後の CT 像では NC と判定し、その後、脳転移の出現増大などのため動注終了3カ月後死亡した。しかし、剖検にて、右腎の転移巣は残存するも明らかな縮小を認め、また、右下肺に見られた転移巣も著明に縮小しており、主たる転移巣は脳のみであった。この症例では、HLBI 600万単位の週5日間投与を併用していたため、腎や肺の転移巣の縮小に動注化学療法がどの程度寄与したかは不明であるが、興味ある剖検結果であった。症例3は右腎癌の腰椎骨転移による歩行障害で初診。第1, 2, 3 腰動脈より2回動注療法を行った。(ただし第1回目注入時には栓塞術を併用した)。CT 上、腰椎骨転移巣はやや縮小するとともに内部に低吸収域が出現し、神経学的に明らかな除圧効果がえられ、歩行障害が改善した (Fig. 5)。症例4は右腎癌の直径8cm に達する恥骨転移に対し、腸骨動脈より動注療法を行ったが、CT 上縮小効果は見られなかった。なお、これら4症例ともに、動注療法に先立って開始していた IFN 療法を継続して併用した。

Table 1. Clinical cases of "cep"-combined intra-arterial chemotherapy.

Case	病理組織	対象病巣	投与薬剤 (mg) * 回数	効果 [†]	cep による副作用
1	clear cell gr. 1	右大腿骨	ADR 20+cep 10*1 VBL 10+cep 10*1 ADR 10+VBL 2+cep 10*7	PR	右大腿部灼熱感 皮膚の発赤
2	clear cell gr. 2	対側腎	VBL 5+cep 10*4 VBL 2+cep 10*1	NC	なし
3	granular cell gr. 2	腰椎骨	ADR 15+VBL 9+cep 30*2	MR ^{††}	なし
4	clear cell gr. 2	恥骨	ADR 10+VBL 2+cep 10*4	NC	なし

[†]: 腎細胞癌非観血的治療効果判定基準 (日泌尿会誌, 1992) に準じた。

^{††}: 第1回目注入療法時に栓塞術を併用した。

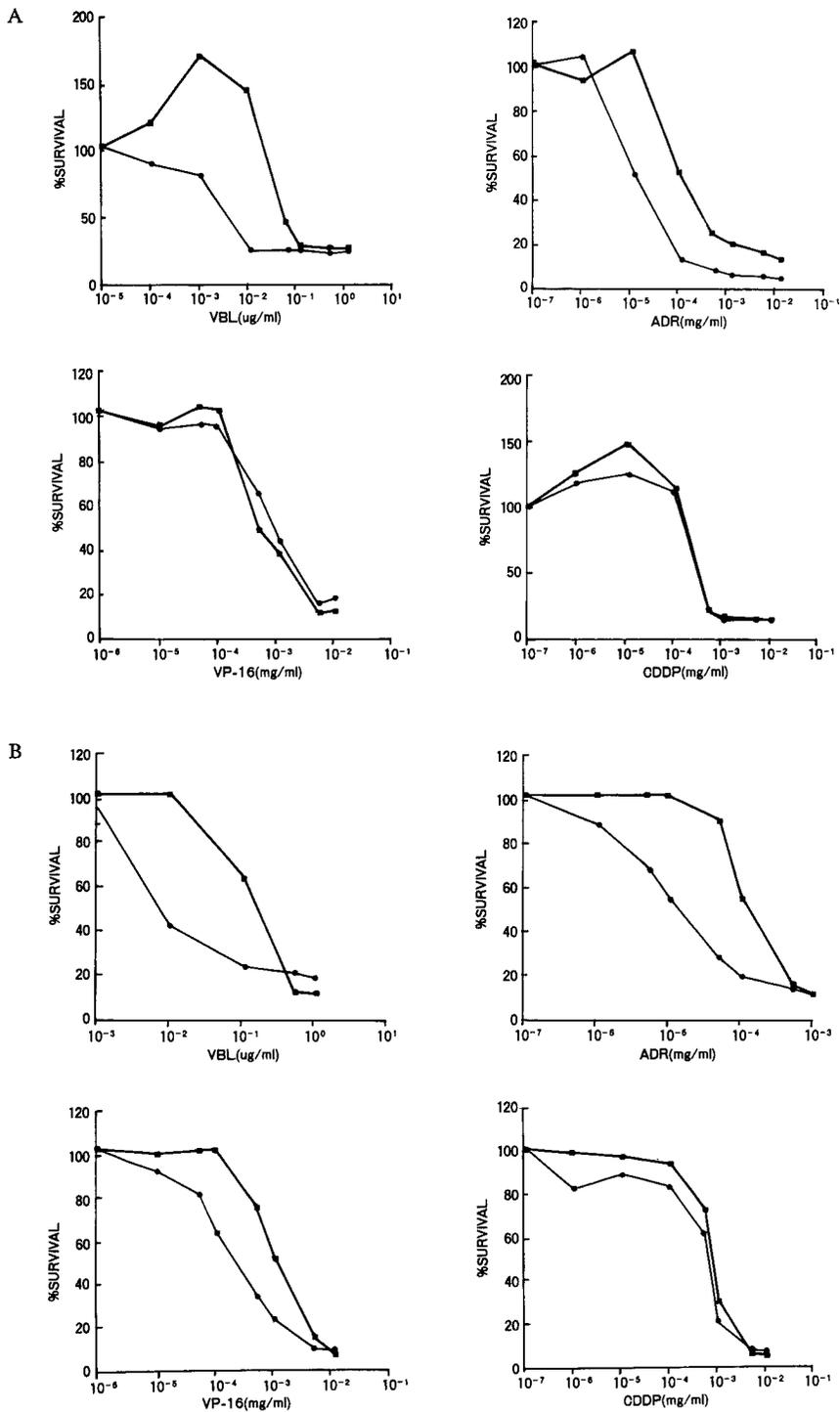


Fig. 2. Sensitizing effects of "cep" on VBL, ADR, VP-16 and CDDP sensitivities in A704 cells (A) and ACVB 3.5 cells (B). The cells were exposed to each chemotherapeutic agent with (circle) or without (square) cep. Each value was the mean of quadruplicate experiments.

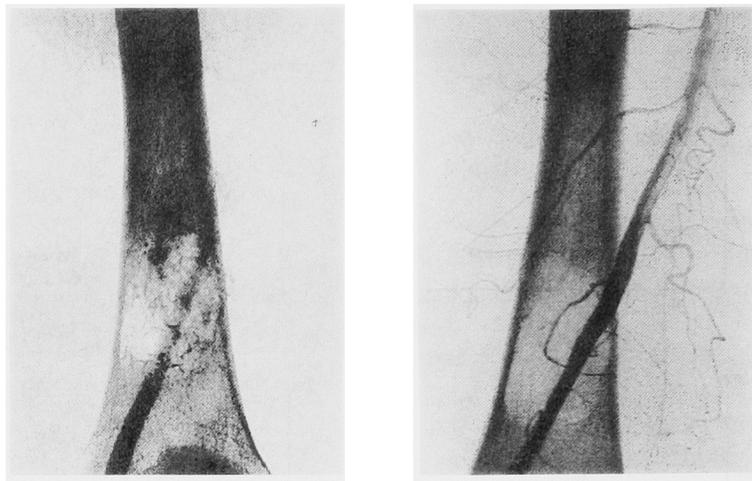


Fig. 3. Right femoral arteriography of case 1 before (left) and after (right) 3 courses of intraarterial chemotherapy.

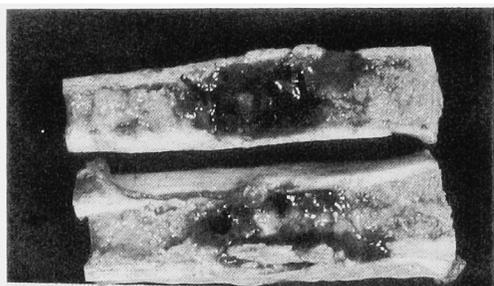


Fig. 4. The surgical specimen of the right femoral bone of case 1 (upper). Microscopically, most of the metastatic lesion was replaced with necrotic tissues (lower).

考 察

理想的な MDR 克服剤は、P170 に対し投与する抗癌剤よりも高い親和性を有し、かつそれ自身が高濃

度で投与されても生体に障害となる生理活性を有しないことである。cep は bisbenzylisoquinoline alkaloids を主成分とする製剤で、古く抗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、マムシ咬傷などに使用されている。verapamil など他の MDR 克服剤と同様に、多環構造で窒素原子を有し陽性荷電であり疎水性であるなどの構造上の共通点を有している。また、colchicine で選択された MDR 細胞 KB-ChR-24 において強い MDR 克服効果がすでに証明されている⁹⁾。

今回の *in vitro* の解析では、cep 自身が細胞増殖抑制効果をほとんど示さない濃度で、P170 を発現するヒト腎癌の 2 細胞において VBL や ADR に対し明らかな感受性増強効果を示した。cep の感受性増強効果はヒト腎癌細胞を用いたわれわれの解析では、P170 を発現する細胞でのみ認められているため、その機序として P170 を介したものと考えている。しかし、この点に関して Nishiyama ら⁷⁾は、cep の細胞膜安定化作用の関与の方が大きいとしている。今後の研究課題と考えられる。

今回、cep の MDR 克服効果を利用した化学療法による進行腎癌治療への応用としてまず動注療法を選んだのは、cep の濃度が標的病巣に対して十分にえられること、遠隔転移全体を治療する方法としては BRM 療法が現在の第一選択であり、このような MDR 克服薬剤を併用した全身化学療法の機がまだ熟していないと判断したことによる。実際、全例ですべて IFN による BRM 療法が施行されており、症例 2, 3, 4 で動注治療時点で他にも遠隔転移病巣を有していたため、IFN 療法は動注治療期間中も継続した。

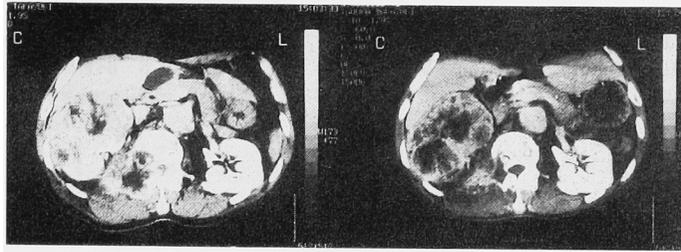


Fig. 5. Enhanced CT scans of case 3 before (left) and after (right) chemotherapy through the 1st-3rd lumbar arteries. Transarterial embolization was performed for the right renal tumor.

そのため、厳密には動注療法の治療効果は判定しえない。また、症例1と3では明らかに動注療法の効果があったと思われるが、cepによる作用増強があったかどうかは不明である。

P170に親和性をもつ薬剤の併用によるMDR克服において懸念される問題は、P170を発現する正常細胞における抗癌剤の副作用の増強である。具体的には、肝、腎、副腎、消化管などへの影響⁶⁾である。この点に関して特に症例2では、腎機能の低下が心配されたが、血清クレアチニン、CCrで見るとかぎりほとんど変化が見られなかった。今後、さらに尿細管機能への影響など詳細に検討する必要がある。一方、克服剤自身の副作用としては、verapamilを併用した化学療法における低血圧、不整脈⁶⁾が有名である。今回の4症例では、症例1において注入直後に右下肢の灼熱感と皮膚の発赤が見られ、これらはcepの末梢血管拡張作用によると考えられた。

今後さらに、臨床的に投与しやすいと考えられる他のMDR克服薬剤(具体的にはtamoxifenやcyclosporin Aなど)とcepとの基礎的比較検討を進め、より理想的な克服薬剤を模索するとともに、cepの投与量と血中動態、併用する抗癌剤の種類、腎癌以外の泌尿器癌での応用の可能性、P170以外の耐性克服機序をcepが有するかなどの検討を進めていく必要があると思われる。

結 語

腎細胞癌における内因性MDRの、cepによる克服の可能性を、P170を発現するヒト腎癌細胞を用いて検討した。さらに、腎癌転移巣に対して、cepを併用した動注化学療法を4症例に対し試み、臨床効果、副作用などについて検討した。その結果、cepはP170を発現する腎癌細胞においてのみ、VBLやADRに対して、強いMDR克服効果を示した。cepをVBLやADRに併用した動注化学療法では、4例

中2例で明らかな治療効果が見られた。一方、1例でcepによると思われる皮膚の強い発赤、腫脹を注入直後に認めた。

本論文の要旨は、第42回日本泌尿器科学会中部総会シンポジウムにて発表した。

本研究に助力を願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.: MDR1 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) 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
- 4) 寛 善行: 腎細胞癌の薬剤耐性の克服(P糖蛋白とglutathione redox cycle). *腎と透析*(印刷中)
- 5) Fojo A, Shen D-W, 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
- 6) Shiraishi N, Akiyama S, Nakagawa M, et al.: Effect of bisbenzylisoquinoline (biscoclairine) alkaloids on multidrug resistance in KB human cancer cells. *Cancer Res* **47**: 2413-2416, 1987
- 7) Nishiyama M, Aogi K, Saeki S, et al.: A role for plasma membrane potential in doxorubicin-induced cytotoxicity. *Anticancer Res* **12**: 849-852, 1992

- 8) Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, et al.: Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 7735-7738, 1987
- 9) Ozols RF, Cunnion RE, Klecker RW, et al.: Verapamil and adriamycin in the treatment of drug-resistant ovarian cancer patients. *J Clin Oncol* **5**: 641-647, 1987
(Received on October 19, 1993)
(Accepted on October 22, 1993)
(迅速掲載)