<table>
<thead>
<tr>
<th>項目</th>
<th>内容</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>タイトル</td>
<td>前立腺癌に対する化学療法効果増強の試み：Growth factor interactionのInhibitorとの併用</td>
</tr>
<tr>
<td>著者</td>
<td>鈴木 裕志、三輪 吉司、秋野 裕信、藤田 知洋、齋川 茂樹、蟹本 雄右、岡田 謙一郎</td>
</tr>
<tr>
<td>マガジン名</td>
<td>泌尿器科紀要</td>
</tr>
<tr>
<td>ダイレクトリンク</td>
<td>[URL]<a href="http://hdl.handle.net/2433/117998">KURENAI</a></td>
</tr>
<tr>
<td>公開日</td>
<td>1993年12月</td>
</tr>
<tr>
<td>テキストバージョン</td>
<td>[publisher][Kyoto University]</td>
</tr>
</tbody>
</table>
THE ENHANCEMENT OF THE CHEMOTHERAPEUTIC EFFECTS ON HUMAN PROSTATE CANCER CELL —THE COMBINATION WITH THE GROWTH FACTOR INTERACTION INHIBITOR (SURAMIN)—

Yuji Suzuki, Yoshiji Miwa, Hironobu Akino, Tomohiro Fujita, Shigeki Saikawa, Yusuke Kanimoto and Kenichiro Okada

From the Department of Urology, Fukui Medical School

The present study was designed to evaluate the antiproliferative effects of suramin and the combination of suramin plus cisplatin (CDDP) on the hormone-independent human prostate carcinoma cell line (PC-93). In vitro, suramin induced a dose-dependent reduction of PC-93 proliferation, and at the clinically achievable concentration (300 µg/ml), suramin induced a 19.7% decrease in proliferation on the 3rd day compared to suramin-free control (P<0.01). However, from the 4th day on the inhibitory action of suramin was reversed following exposure. The suramin-cisplatin combination showed an additive effect (inhibition ratio 32.4% on the 3rd day), and prolongation of the inhibition activity on the 4th day on, but it did not show any synergistic effect. Suramin inhibited dose-dependently the growth stimulatory effect of exogenous epidermal growth factor (EGF). In vivo study, suramin and suramin-cisplatin combination showed antitumor effects continuously in nude mouse implanted PC-93. These findings suggest that the inhibitory effects of suramin on PC-93 are mediated by inhibition of the EGF-mediated growth mechanism, but by a cytostatic rather than cytotoxic manner in vitro. In addition, other mechanisms such as inhibition of angiogenesis factor might exist in vivo.


Key words: Suramin, Cisplatin, Prostate cancer, MTT assay, Nude mouse
topoisomerase II などさまざまな酵素活性の抑制が判明している。

しかしながら、suramin の臨床使用での問題点は、神経毒性、血液毒性、腎・肝毒性などの副作用が重篤であることである3)。これが dose limiting factor となっていることである。NCI の Myers ら3) は suramin の血中濃度が 350 μg/ml 以上では重篤な副作用を呈することからこれ以下に抑えるような投与方法を推奨している3)。このため、suramin の臨床応用にあたっては、より少ない投与量で効果増強をはかるために其他抗腫瘍剤との併用は検討課題の一つと考えられる。

今後、われわれはヒト前立腺癌 PC-93 を用いた suramin の抗腫瘍効果と、CDDP との併用に依る効果増強が認められるかを in vitro および in vivo で検討した。

実験材料と方法

1) ヒト前立腺癌細胞株：京都大学泌尿器科教室の大石先生より提供いただいた未分化前立腺癌 PC-93 を用いた。Ab-4 を用いた EGF receptor 組織染色では良好な染色性を示し、細胞の成長に EGF が関与することが期待された。無血清培地では十分な発育がえられず、培養条件は 10% FCS を添加した DME を用い、5% CO2 下で培養した。

2) PC-93 の発育における EGF の影響：各濃度のマウス腎下腺由来上皮成長因子（和光）を培養液内に添加し、細胞数の変化を MTT assay を用いて評価した。

3) suramin はドイツパイエル社より末梢の提供を受け、使用直前に PBS に溶解し各培地に添加した。

4) cell culture：1 x 10^5/ml に調整した細胞懸液を 96 孔マイクロプレートの各 well に 100 μl ずつ注入し、5% CO2 下で 1 時間培養後、薬剤を溶解した培養液を 100 μl 追加し最終濃度を調整した。薬剤との接触時間は CDDP については 4 時間とし、その後 CDDP を含まない培養液に置換した。suramin は持続接触とし、suramin と CDDP の併用群では 4 時間の同時接触後培地交換し、以後 suramin のみの接触とした。各群との 6-9 well で検討した。併用効果の評価は、Chou and Talalay らの方法13) に準じ、combination index を求めた。この際の併用における suramin と CDDP の fixed ratio は 63:1 とした。

5) MTT assay：Romijn らの方法14) に準じ、MTT 溶液（4 mg/ml）を各 well に 90 μl ずつ加え 4 時間培養し、上清を捨てた後 DMSO を 100 μl 加え formazan を溶出させた。これを Titatek Multiskan を用い、540 nm で吸光度を測定した。薬剤投与群における効果は、無投与群に対する吸光度の比で検討した。

6) ヌードマウス in vivo 実験：BALB/C 雄ヌードマウス（日本クレア）6 過齢の背部皮下に PC-93 を移植し、各群 3～6 匹とした。薬剤投与開始の腫瘍重量が 0.5～1 g になった時点とした。suramin は Morton らの方法15) に準じ、第 1 日目に 300 mg/kg を尾静脈より静注し、さらに第 5 日日に 100 mg/kg を追加投与した。CDDP は第 1 日日に 7 mg/kg の腹腔内一回投与とした。5 日毎に腫瘍径を計測し、腫瘍重量を算出した。

結果

1) EGF 濃度変化による細胞増殖の変化：無添加群に比べて細胞増殖が促進されるが、10 ng/ml 添加時で培養 2 日目に最大の効果が認められた (Fig. 1)。

2) suramin 単独添加群 (Fig. 2) では、濃度依存性に持続抑制効果が認められ、持続接触では 3 日目に最大抑制効果が認められた。しかし、4, 5 日目には再び細胞増殖は回復する傾向が認められ、suramin の
増殖抑制効果は cytostatic なものであることが示された。また、臨床使用可能な suramin の血中濃度である 300 μg/ml では、増殖抑制率は 19.7% (P < 0.01) と有意差は認めるもののに十分な効果はいえず、IC50 は 1,087 μg/ml であった。
3）EGF 10ng/ml 添加による suramin の増殖抑制効果の検討では、EGF 添加により suramin の増殖抑制効果は有意に減少（P < 0.005）したが (Fig. 3), suramin の濃度依存的な抑制効果を示した。
4）CDDP 単独で 4 時間接触させた群では、濃度依存性に細胞増殖抑制効果を示すとともに持続効果を認めた (Fig. 4).
5）suramin 300 μg/ml と CDDP 1 μg/ml 併用群では、suramin 単独で認められた 4 日目以降の増殖回復はみられず、増殖抑制効果の延長を認めめた (Fig. 5). また、suramin 単独で最大増殖抑制効果を認める 3 日目における抑制率を比較では suramin 単独群 19.7%, CDDP 単独群 13.5%, 併用群では 32.4% (P < 0.01) とやや相加効果を示した (Fig. 6).
6）suramin と CDDP の併用モル比を 63：1 に固定し、combination index を求めたが、各 fraction においても index は 1 以上であり、相乗効果は認め

Fig. 3. Dose-response curves of suramin added EGF 10 ng/ml.

Fig. 4. Relative growth Curves of PC-93 at different CDDP concentration.

Fig. 5. Relative growth curves of CDDP and suramin.

Fig. 6. Relative growth ratio after 3 days (Suramin, CDDP).

Fig. 7. Combination index of CDDP-suramin.

Fig. 8. Relative growth curves of PC-93 (nude mouse).
されなかった（Fig. 7）。
7) シードマウスを用いた検討では suramin 単独投与群において良好な抗腫瘍効果を認め、しかも in vitro とは異なり持続効果も認められた。CDDP との併用群では in vitro と同様に相加的効果が認められた（Fig. 8）。しかし、suramin を投与したマウスの中、3 倍が10日以内に死亡した。

考 察

suramin は in vitro において EGF, FGF, PDGF などの growth factor 作用をその receptor レベルで抑制する8-10 ことが判明し、抗腫瘍効果をもつことが報告されている。Stein 11 らはこれらの基礎実験の結果を基に転移病巣を有する進行癌15例（副腎10例、腫瘍 4 例、Adult T-cell leukemia-lymphoma 1 例）に対して臨床治験を行い、partial response（PR）4例、minor response（MR）2 例の成績をえた。しかしながら、その副作用は白血球14例、腎機能障害 9 例、肝機能障害 8 例、血液能障害 11 例、多発性神経炎 1 例など高い頻度で出現している。これらの副作用は suramin の血中濃度が高いほど高率に出現する一方、抗腫瘍効果についても同様のがいえ、安全性的低い薬剤といえる。このことから suramin 濃度を最小限に抑え、抗腫瘍効果を高める方法として、他剤との併用療法による効果増強の試みは意味のあることと考えられる。

今回、suramin の前立腺癌株 PC-93 に対する抗腫瘍効果を、広く用いられている CDDP との併用効果を検討した。in vitro において suramin 単独群では、感染使用可能な濃度である 300 μg/ml では期待されたほどの抗腫瘍効果は認められなかった。Rocca 15 らは、PC-3, DU 145, LNCaP, FGC の 3 つの細胞株について in vitro での suramin の効果を検討し、PC-3, LNCaP, FGC については IC50 が 300 μg/ml 前後と有効であったが、DU 145 では 600 μg/ml 以上と細胞株による感受性の差があり、DU 145 は他の 2 株に比べ細胞内 suramin 濃度が低いことを報告している。また、LNCaP や DU 145 は EGF または bFGF などの添加により、増殖が促進され bFGF の効果を suramin が阻害すること16, PC-3, DU 145 は suramin 添加により TGFα の binding が抑制されること17 が報告されている。われわれが用いた PC-93 には EGF receptor が存在し、外因性の EGF 添加により増殖が促進した。そして、suramin は EGF 添加の効果を容量依存的に抑制した。このことから、PC-93 においても suramin は EGF の作用を receptor レベルで阻害している可能性が示唆された。suramin の PC-93 に対する感受性が PC-3 などと比べて低い原因は不明であるが、growth factor の細胞増殖に関与する程度の違いや細胞の suramin の取り込み、排泄の違い、他の酵素系障害の関与などが考えられる。また、suramin は蛋白結合率が高く、in vitro においては培地内蛋白濃度により suramin の細胞増殖抑制効果が異なることが示されており18, 10% FCS の存在下で検討した今回の結果に影響をおよぼしている可能性があるが、同様の 10% FCS 存在下における PC-3 の感受性15,18 と比べて明らかに感受性は低い。

in vitro においては suramin の細胞増殖抑制効果が cytostatic であることについては、Kim ら19 が suramin を含む培地から suramin を含まない培地に交換することにより細胞増殖が回復したことを報告している。PC-93 では姦接接線にもかかわらず、細胞増殖回復の回復を認め、suramin の活性が低下したが、PC-93 が早期に suramin に対して耐性を獲得した可能性が考えられる。今回は suramin の濃度測定や耐性の有無については検討しておらず今後の検討が必要と思われた。

suramin と他剤との併用に関しては、Osswald ら20 が in vivo で hyperdiploid Ehrlich carcinoma において cyclophosphamide ならびに doxorubicin との併用効果を検討し、効果増強と副作用軽減を認め、この際の二剤を投与する順番は順番によりって効果がすることを報告している。また、Freuhauf ら21 が、in vitro で PC-3, LNCaP を用いて tumor necrosis factor (TNF-α) ならびに doxorubicin との併用により相乗的な細胞増殖抑制効果がえられるの報告した。しかしながら、効果増強の機序については明らかにしていない。われわれは suramin の多彩な作用のうち growth factor の作用阻害や DNA 阻害をきたす効果に注目し、CDDP との併用を試みたが相加効果以上の結果はえられなかった。これには、PC-93 自身が suramin に対する感受性が低いこともあるが、細胞との接触時間、順番なども今後の検討課題であろう。

in vivo における suramin の作用として、lysoosomal enzyme の阻害によりヘパリンなどの glycosaminoglycan が蓄積し31、腫瘍の血管増生を抑制する可能性22 が報告されている。今回のマウスを用いた検討では in vitro と異なり suramin の持続効果を認めたことは、in vivo における抗腫瘍作用は単に直接作用のみならず血管増生障害などの間接作用も
鈴木，ほか：Suramin・前立腺癌

関与している可能性を支持するものと考えられる。一方、suraminの投与法は血中濃度を300μg/mlに保つためMortonらの方法に準じたが、suramin投与の約3割のマウスが死亡した。Mortonらは投与直後には一過性に600μg/ml前後の血中濃度に達することを報告しており、急性毒性のため死亡したものと考えられる。今後はsuraminの血中濃度をモニタリングし、より安全な投与法を検討する必要があると考えている。

今回のわれわれの結果ではsuraminの抗腫瘍効果は十分とはいえない。また、CDDPとの併用では相乗効果は認められなかった。しかし、多彩な作用をもつつユニークな薬剤として今後とも興味がもたれる。そして、suraminの抗腫瘍作用の本質的機序や副作用の機序の解明により、適切な投与方法の決定や副作用の少ないアナログ薬剤の開発が可能になり、安全な臨床使用への道が開かれるものと考えられる。

結語

1) ヒト前立腺癌株PC-93を用いてin vitroならびにin vivoでsuraminの抗腫瘍効果とCDDPとの併用効果を検討した。

2) in vitroではsuramin単独は臨床使用可能な濃度では十分な増殖抑制効果は得られなかった。また、その効果はcytostaticであった。

3) CDDPとの併用では増殖抑制効果の延長と相加効果を認めた。

4) suraminはEGFによるPC-93の細胞増殖促進効果を抑制した。

5) マウスマウスを用いた検討ではsuraminは持続的抗腫瘍効果を示し、CDDP併用により効果増強を認めた。

6) 今後も検討を進めることによりsuraminの安全な臨床使用が可能となると考えられる。

なお本研究の一部は文部省科学研究費（一般研究C:04670566）の援助によって行われたものである。

文献


14) Romijn JC, Verkoejen CF and Shroeder FH: Application of the MTT assay to human prostate cancer cell lines in vitro: Establishment of test conditions and assessment of hormone-stimulated growth and drug-in-
duced cytostatic and cytotoxic effects. Prostate 12: 99-110, 1988
(Received on October 19, 1993)
(Accepted on October 22, 1993)