

芳香族レチノイン酸誘導体の単独および マイトマイシンC併用投与によるラット 膀胱腫瘍 *in vitro* 増殖抑制

京都大学医学部泌尿器科学教室（主任：吉田 修教授）

藤田 潤・吉田 修

INHIBITORY EFFECTS OF AN AROMATIC RETINOIC ACID ANALOG, ADMINISTERED ALONE OR IN COMBINATION WITH MITOMYCIN C, ON THE *IN VITRO* GROWTH OF RAT BLADDER CARCINOMA CELLS

Jun FUJITA and Osamu YOSHIDA

From the Department of Urology, Faculty of Medicine, Kyoto University

(Director: Prof. O. Yoshida)

The effects of an aromatic retinoic acid analog (Ro 10-9359), its metabolite (Ro 10-1670) and mitomycin C (MMC) on the *in vitro* growth of rat bladder carcinoma cells, BC50-TC were examined. The growth of the cells treated with 10^{-4} M of either of the retinoids for 1 hour was not inhibited. The growth of the cells was inhibited by 37% and 93%, respectively, by the 3-day treatment with Ro 10-9359 and Ro 10-1670, at the concentration of 5×10^{-5} M. The retinoids given in combination with MMC produced additive effects. Slight synergism was suggested at high concentrations of the retinoid.

The fact that the retinoids exhibited anti-tumor activity *in vitro* might preclude indirect effects from being the only factor in the inhibition of the tumor growth *in vivo*, but the fact that antagonism with MMC did not occur *in vitro* whereas it did *in vivo* suggests that the indirect effects of the retinoid might be more important in mediating the anti-tumor effects. Regardless of the mechanism of action, care should be taken when prescribing retinoids with MMC or other cytotoxic agents.

Key words: Bladder cancer, Retinoid, Mitomycin C, *In vitro* chemosensitivity test, Combination chemotherapy

緒 言

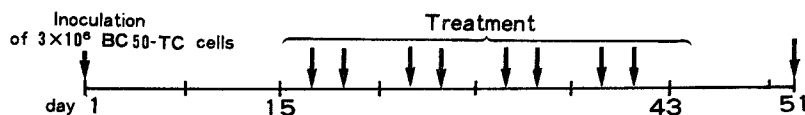
膀胱腫瘍も皮膚同様に、イニシエーションとプロモーションの2段階（あるいはさらに多段階）を経て発生しうることが実験的にあきらかにされている¹⁾。このプロモーションには、促進物質（プロモーター）の長期間持続的作用が必要であり、この過程の一部は可逆的である²⁾。そこで不可逆的で短期間に終了するイニシエーションよりも、プロモーションを抑制するほうが、発癌抑制に実際的であると考えられる。しかし

プロモーターは通常食物や^{3),4)}、内因性のホルモン中²⁾にも存在する可能性が強く、曝露を完全に避けることは困難である。ここに副作用の少ない抗プロモーション物質が重要となり、実験的にはビタミンA類縁物質（レチノイド）の投与、食餌カロリーや脂質の制限などがプロモーションの抑制作用をもつと報告されている²⁾。

膀胱腫瘍保存的手術後の再発率は非常に高く、一因として広汎な尿路上皮の異常が指摘されている⁵⁾。われわれはレチノイドの一種 ethyl all-trans-9-(4-me-

thoxy-2,3,6-trimethylphenyl)-3,7-dimethyl-2, 4-6, 8-nonatetraenoate (Ro 10-9359) を乳頭状非浸潤性膀胱腫瘍の治療および再発予防に用いたが、内服では副作用が強く、効果も十分ではなかった⁶⁾。13-シス-レチノイン酸を用いた場合にも同様の結果が報告されている⁷⁾。この点および実験的にも、レチノイドの単独投与では完全な腫瘍の抑制をおこすわけではないこと⁸⁾から、抗癌剤との併用の可能性を考え、マウス膀胱

膀胱腫瘍細胞株 BC50-TC⁹⁾ をラット皮下に移植し、マイトマイシンC (MMC) と Ro 10-9359 との効果を見たところ、それぞれ単独投与では腫瘍発育抑制効果を示したのに、併用投与では逆に効果が低下した(文献10および Fig. 1, 2)。そこで今回、BC50-TC に対し、*in vitro* でも両薬剤が *in vivo* と同様の効果を示すかどうか検討を加えた。



| Group | No. of rats | Dose schedule (mg/kg/wk) | |
|-------|-------------|--------------------------|--------------------|
| | | Ro 10-9359 (p.o.) | Mitomycin C (i.p.) |
| 1 | 10 | 0 | 0 |
| 2 | 10 | 100 | 0 |
| 3 | 10 | 0 | 0.1 × 2 |
| 4 | 10 | 100 | 0.1 × 2 |
| 5 | 10 | 0 | 0.3 × 2 |
| 6 | 10 | 100 | 0.3 × 2 |

Fig. 1. Protocol for *in vivo* experiment

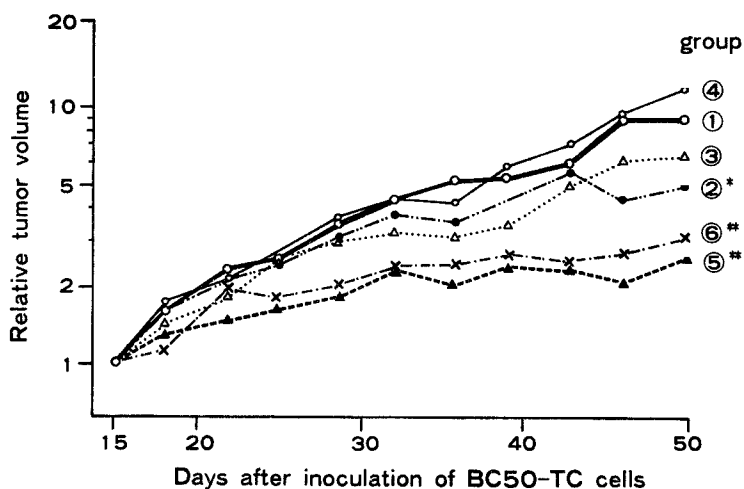


Fig. 2. Effect of Ro 10-9359 or MMC or both on volumes of the tumor¹⁰⁾. Relative tumor volume was calculated for each tumor from the equation: V_x/V_{16} , where V_x and V_{16} are the volumes of the tumor on the specified day and on day 16, respectively. Points represent the average of these values within each group. Group numbers are as in Fig. 1. * $p < 0.025$ and ** $p < 0.01$ significantly different from group 1.

材料および方法

1 化学物質

Ro 10-9359 およびその血清中代謝産物 Ro 10-1670¹¹⁾ は日本ロシュ株式会社（東京）より提供をうけた。MMC は協和発酵工業（東京）より購入した。レチノイドは dimethyl sulfoxide に、MMC は蒸留水に使用直前に溶解し、溶媒の最終濃度は 0.5% 以下とした。

2 細胞および *in vitro* 増殖抑制アッセイ法

BC50-TC (ACI/N ラットに N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine (BBN) で誘発した膀胱癌を、培養細胞株としたもの) は、山口大学 酒徳治 三郎教授より分与をうけ、既報のごとく¹⁰⁾ 10% 仔牛血清添加 Eagle's minimum essential medium (日本製薬, 東京) 中で、37°C, 5% CO₂ 下で培養した。

トリプシンにて単離した BC50-TC 細胞 (600 個/35 mm ディッシュ) を 24 時間培養し、細胞集塊がなく、十分に細胞が分散付着していることを位相差顕微鏡で確認したのち、薬剤を添加した。1 時間接触実験では、薬剤 (Ro 10-9359 または Ro 10-1670 単独および MMC との同時併用) を加えて 1 時間培養したのち、生理食塩水にて 2 回ディッシュを洗滌、新しい培養液を加え、さらに 3 日間培養後液を捨て、細胞を May-Grunwald 液で固定し、顕微鏡下に、5 個以上に増殖している細胞集塊 (クラスター) の数を数えた。3 時間接触実験では、薬剤を前記同様に加えたあと培養液をかえることなく 3 日間培養を続け、固定染色

後クラスター数を数えた。ひとつの薬剤濃度に 3 枚ずつのディッシュを使用し、その平均値をとった。溶媒のみを加えたコントロールのクラスター数に対する、薬剤添加時クラスター数の百分比をとって、効果をあらわした。

結 果

Ro 10-9359, Ro 10-1670, MMC をそれぞれ単独添加したときの用量-効果曲線を Fig. 3 に示した。いずれも増殖抑制は、薬剤濃度および接触時間に関連していた。両レチノイドとも 1 時間接触ではまったく効果がなく、3 日接触では 5×10^{-5} M 濃度で、Ro 10-9359 は 37%, Ro 10-1670 は 93% BC50-TC の増殖を抑制した。Ro 10-9359 と 10^{-9} M MMC との併用では 3 日接触で相加効果あるいは Ro 10-9359 高濃度で軽い相乗効果がみられた (Fig. 4)。Ro 10-1670 と MMC との併用でも同様の結果であった (データ省略)。

考 察

レチノイドは細胞の増殖分化、遺伝子の発現に影響を与えることが、癌遺伝子、細胞骨格、成長因子、蛋白リン酸化酵素などの酵素系についてあきらかにされている¹²⁾。さらに実験的にマウスやラットにおける発癌、なかでも膀胱発癌を予防するだけでなく⁸⁾、可移植性悪性腫瘍に対する有効性の報告も、膀胱癌、皮膚癌、軟骨肉腫、乳癌などでみられている^{10, 12, 13)}。しかし臨床的には皮膚基底腫、メラノーマ、肺癌、膀胱乳

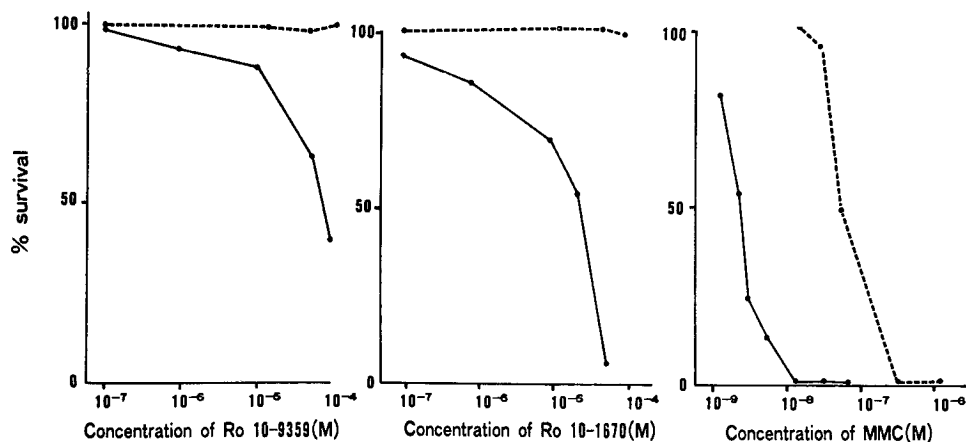


Fig. 3. Dose-response survival curves obtained by treatment of BC50-TC cells with increasing concentrations of drugs for 1 hour (●---●) or 3 days (●—●). Exposure to Ro 10-9359 (A), Ro 10-1670 (B) and MMC (C). Points represent the average of at least two experiments with each test triplicated.

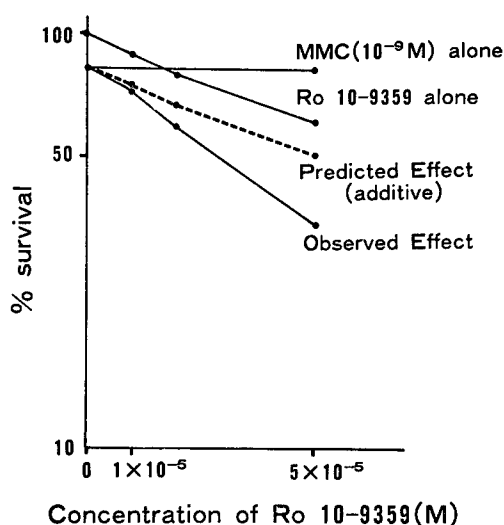


Fig. 4. Survival of BC50-TC cells incubated with both Ro 10-9359 and MMC for 3 days. Points represent the average of two experiments with each test triplicated.

頭腫で有効例があるものの¹⁴⁻¹⁷⁾, 副作用のため大量, 長期全身投与ができず^{6,7)}, 単独使用では現在のところあまり期待できない。In vitro の細胞増殖抑制効果は, 非特異的細胞毒性によるものではなく可逆的であり¹⁸⁾, in vitro 化学発癌実験でも持続的にレチノイドが存在しないと, 悪性細胞形質が発現してくる¹²⁾。今回 BC50-TC に対し, Ro 10-9359 は1時間接触では可逆性のためか, 効果がみられなかった。臨床的にも膀胱内注入は全く無効であり⁹⁾, 長期間持続的投与方法を検討する必要がある。レチノイドはおそらくその膜に対する作用により, tamoxifen, 5-fluorouracil などの抗癌剤の効果を増強することが, in vitro, in vivo で示されている^{8,9)}。しかしわれわれの経験では, Ro 10-9359 と MMC とは BC50-TC 細胞に対し, 単独投与では in vitro, in vivo ともに増殖抑制効果を示したのに, 併用では in vivo で効果減弱¹⁰⁾, in vitro では相加ないし相乗効果であった。また Ro 10-9359 のかわりにその代謝物 Ro 10-1670 を用いても MMC との拮抗作用は in vitro でみられなかった。つまり in vivo でのみ MMC による Ro 10-9359 の抗腫瘍効果抑制がみられたのである。このことから, in vivo では Ro 10-9359 は主として腫瘍細胞以外の系に作用することにより間接的に抗腫瘍効果を示すのではないかと考えられる。これはレチノイドが腫瘍細胞の免疫原性を増強するのみでなく生体の免疫反応性をも高めるといふ点^{13,19)}からも興味深く, Ro 10-9359

が皮下移植した BC50-TC に移して効果を示したのに, BBN 投与によりラットに膀胱癌を誘発した場合には治療効果を示さなかったという観察²⁰⁾を説明するが, in vivo 投与時には標的臓器での薬剤濃度や時間の問題もあり, さらに研究が必要である。そのほかレチノイドとの有効な併用療法として, セレニウム投与, 卵巣摘除術, 抗炎症剤の投与などがあげられている⁸⁾。しかし N-(4-hydroxyphenyl) retinamide と免疫増強剤 MVE-2 との併用で拮抗的に作用²¹⁾, Ro 10-9359 と BCG では相乗効果であるのに13-シス-レチノイン酸と BCG 併用では BCG 単独よりも効果が劣った²²⁾, Ro 10-9359 はラット膀胱発癌の予防効果はあるが, マウス膀胱発癌には無効⁸⁾ などという報告がある。つまりレチノイド投与のときには, 毒性, 他薬剤との相互作用, レチノイドの種類, 投与方法だけでなく, 動物による代謝変化の差, 組織分析, 排泄なども十分に配慮する必要がある。さらに発癌物質の頻回投与や紫外線による発癌などはむしろ促進することが知られているので²⁾, 迅速で注意深い臨床評価が必要である。

結 語

レチノイドと MMC 併用の, 培養ラット膀胱癌細胞 BC50-TC に対する in vitro 増殖抑制効果を検討した。

Ro 10-9359, その代謝物 Ro 10-1670 はともに単独1時間接触では効果がなかったが, 持続接触で増殖抑制効果を示した。MMC は単独1時間接触, 持続接触ともに有効であった。Ro 10-9359 または Ro 10-1670 と MMC との併用持続接触では, 相加的ないし高濃度レチノイドでは相乗の効果を示し, in vivo における効果¹⁰⁾と対照的であった。

以上より, レチノイドが BC50-TC 細胞に直接的増殖抑制効果をもつことがあきらかとなったが, レチノイドの in vivo 抗腫瘍効果は免疫系などを介した間接的なものである可能性, 膀胱内注入療法における持続投与の必要性, in vitro 感受性試験の限界などが示唆された。

なお, 本研究の要旨は, International Bladder Cancer Conference 1981 at Mt. Fuji にて発表した。

文 献

- 1) Hicks RM: Multistage carcinogenesis in the urinary bladder. Brit Med Bull 36: 39~46, 1980
- 2) Boutwell RK: Diet and anticarcinogenesis

- in the mouse skin two-stage model. *Cancer Res (Suppl)* **43**: 2465s~2468s, 1983
- 3) Sugimura T : Mutagens, carcinogens, and tumor promoters in our daily food. *Cancer* **49**: 1970~1984, 1982
 - 4) Kakizoe T, Komatsu H, Honma Y, Nijima T and Sugimura T : Detection of amino acids as possible promoters of bladder cancer in rats by measuring their enhancement of agglutination of bladder cells by concanavalin A. *Gann* **73**: 870~873, 1982
 - 5) Kakizoe T, Fujita J, Murase T, Matsumoto K and Kishi K : Transitional cell carcinoma of the bladder in patients with renal pelvic and ureteral cancer. *J Urol* **124**: 17~19, 1980
 - 6) Yoshida O : Retinoid therapy for bladder tumors, New concepts of bladder cancer, Prout GR Jr, Tazaki H, 1st ed, 217~220, Medical Res Center, Tokyo, 1983
 - 7) Prout GR Jr Chemoprevention of bladder carcinoma with 13-cis retinoic acid, New concepts of bladder cancer, Prout GR Jr, Tazaki H, 1st ed, 209~216, Medical Res Center, Tokyo, 1983
 - 8) Moon RC, McCormick DL and Mehta RG : Inhibition of carcinogenesis by retinoids. *Cancer Res (Suppl)* **43**: 2469s~2475s, 1983
 - 9) 野田 益弘・橋本 嘉幸 : N-butyl-N-butanol (4) nitrosamine およびそのアセチル体による近交系 ACI/N ラット膀胱腫瘍の発生と発生腫瘍の移植性について. *日泌尿会誌* **64** : 397~407, 1973
 - 10) Fujita J, Miyakawa M, Tokuda H and Yoshida O : Therapeutic effect of an aromatic retinoic acid analog on rats with bladder carcinoma upon administration alone or in combination with mitomycin C. *Gann* **73** : 285~288, 1982
 - 11) Hanni R, Herboutet D and Busslinger A : Determination of an aromatic retinoid and its main metabolite by high performance liquid chromatography. *J Chromatogra* **162** : 615~621, 1979
 - 12) Sporn MB and Roberts AB : Role of retinoids in differentiation and carcinogenesis. *Cancer Res* **43** : 3034~3040, 1983
 - 13) Lotan R: Effects of vitamin A and its analogs (retinoids) on normal and neoplastic cells. *Biochem Biophys Acta* **605** : 33~91, 1981
 - 14) Bollag W : Retinoids and cancer. *Cancer Chemother Pharma* **3**: 207~215, 1979
 - 15) Evard JP and Bollag W : Konservative Behandlung der rezidivierenden Harn-blasenpapillomatose mit Vitamin-A-Saure. *Schweiz Med Wochenschr* **102**: 1880~1883, 1972
 - 16) Levine N and Meyskens F Topical vitamin-A-acid therapy for cutaneous metastatic melanoma. *Lancet* **i**: 224~226, 1980
 - 17) Micksche M, Cerni C, Kokron O, Titscher R and Wrba H : Stimulation of immune response in lung cancer by vitamin A therapy. *Oncology* **34**: 234~238, 1977
 - 18) Wilkoff LJ, Dulmage EA and Chopra DP: Viability of cultured Lewis lung cell populations exposed to β -retinoic acid (40753). *Proc Soc Exp Biol Med* **163** : 233~236, 1980
 - 19) Tomita Y, Himeno K, Nomoto K, Endo H and Hirohata T: Combined treatments with vitamin A and 5-fluorouracil and the growth of allotransplantable and syngeneic tumors in mice. *J Natl Cancer Inst* **68**: 823~827, 1982
 - 20) Fujita J, Tokuda H, Ito Y and Yoshida O: Therapeutic effect of a retinoid (Ro 10-9359) on rats with bladder tumors induced by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) -nitrosamine upon administration alone or in combination with mitomycin C. *Urol Res* **11** : 227~230, 1983
 - 21) McCormick DL, Becci PJ and Moon RC : Inhibition of mammary and urinary bladder carcinogenesis by a retinoid and a malmeic anhydride-divinyl ether copolymer (M-VE-2). *Carcinogenesis* **3**: 1473~1477, 1982
 - 22) Pang ASD and Morales A: Chemoimmunoprophylaxis of an experimental bladder cancer with retinoids and Bacillus Calmette Guerin. *J Urol* **130**: 166~170, 1983

(1984年4月25日受付)