

In vitro Colony Formation Assay を用いた 膀胱移行上皮癌株に対するエトポシド (VP16) と 4種の制癌剤との併用効果

日本医科大学泌尿器科学教室 (主任: 秋元成太教授)

服部 智任, 佐藤 三洋, 寺島 保典
西村 泰司, 秋元 成太

THE ACTIVITY OF ETOPOSIDE (VP16) IN COMBINATION CHEMOTHERAPY AGAINST HUMAN BLADDER CANCER CELLS IN VITRO

Tomotaka Hattori, Mitsuhiro Satoh, Yasunori Terashima,
Taiji Nishimura and Masao Akimoto

From the Department of Urology, Nippon Medical School

The activity of Etoposide (VP16) in combination chemotherapy against four human transitional cell carcinoma cell lines of bladder (TCCaB) was determined by in vitro colony formation assay. Four anti-tumor agents (methotrexate: MTX, vinblastine: VBL, adriamycin: ADM, cisplatin: DDP) were used for combination chemotherapy with VP16.

The ADM+VP16 combination exhibited a strong synergistic antitumor effect against the human TCCaBs compared with other combinations in this study.

The combination chemotherapy of ADM+VP16 may be useful as a new chemotherapeutic regimen for advanced bladder cancer.

(Acta Urol. Jpn. 37: 995-998, 1991)

Key words: Bladder cancer, Etoposide (VP16), Chemosensitivity assay, Combination chemotherapy

緒 言

進行性膀胱移行上皮癌に対し、現在の所、メトトレキサート (MTX), ヴィンブラスチン (VBL), アドリアマイシン (ADM), シスプラチン (CDDP) を用いた M-VAC 療法を中心とした、制癌剤の併用療法が試みられている^{1,2)}。しかしながらその奏功率は約50%であり、決して満足すべきものとはいえない。加えるに奏功期間が比較的短いことからさらに効果的な化学療法が望まれる。

一方、エトポシド (VP16) は他の制癌剤と併用することによりある種の悪性腫瘍に対し、相乗効果のみられる事が知られている³⁻⁵⁾。

そこで今回われわれは膀胱移行上皮癌株を用い、VP16 と他の制癌剤との併用効果について in vitro Colony Formation Assay を用い検討した。

実験材料及び方法

1. 培養細胞及び培養方法

使用した培養細胞株は、T24, 5637, TCCSUP, NBT2 の膀胱移行上皮癌の4株である。5637と TCCSUP は、ATCC (American Type Culture Collection, 大日本製薬) より、NBT2 は免疫生物研究所より購入した。また、T24 は Japan Cancer Research Resources Bank より提供された。細胞はペニシリン (100u/ml), ストレプトマイシン (100 µg/ml), 1 mM L-グルタミンおよび 50 nM 2-メルカプトエタノールを含む RPMI 1640 (日水製薬, 東京) に10%牛胎児血清 (fetal calf serum, FCS, Filtron, Australia, Lot No. 8179) を加えたものを培地として用い、37°C, 5% CO₂ の条件下にて培養したものを実験に供した。

2. 制癌剤感受性試験

今回用いた制癌剤は、メトトレキサート (MTX), ヴィンブラスチン (VBL), アドリアマイシン (ADM), シスプラチン (DDP), エトポシド (VP16) の5剤であり、感受性試験の方法は、ほぼ Francis McGovern らの方法⁶⁾を用いた。すなわち、60 mm 径の dish に癌細胞、300~500個を10% FCS 加培地に浮遊させ、植え込み24時間後に、制癌剤添加10% FCS 加培地と培地交換を行なった。またコントロールとしては制癌剤無添加10% FCS 加培地を用いた。制癌剤と1時間接触させた後、dish より培地を取り除き Hanks' balanced salt solution (HBSS) にて dish を3回洗浄した。再び10% FCS 加培地を dish に加え、さらに6日間培養し、その後培地を捨て10% ホルマリンで10分間固定の後、0.25% クリスタルヴァイオレットにて dish 上のコロニーを染色した。30個以上の細胞よりなるコロニーを実体顕微鏡下にカウントし、コントロールに対する抑制率を求めた。

実験にて用いた制癌剤の濃度は、ヒト投与時に得られた血中濃度の 1/10 量を中心とし、その前後6濃度で行った。得られた結果は、Ting-Chao Chou and Paul Talalay による Median Effect Analysis⁷⁾を用いて、併用指数 (Combination Index; CI) を求めた。すなわち、約50%抑制率を示すところの制癌剤投与量と癌細胞抑制率との関係を基礎にして、以下の数式が導き出される。

$$(1-S)/S = (D/D_m)^m$$

ここでSは癌細胞の生存率を、Dは使用した制癌剤の投与量を示す。またD_mは癌細胞が50%生存を示す際の制癌剤の薬剤量であり、mは制癌剤の効果をみる際に認められる、量効果曲線のS字状曲線の程度を示すものである。さらに上記の数式は以下のように置き換えられる。

$$D = D_m [(1-S)/S]^{1/m}$$

次に制癌剤を2剤併用した際にみられる癌細胞に対する抑制効果についてであるが、制癌剤1によりみられる効果と制癌剤2によりみられる効果はそれぞれの濃度に起因すると考えられる。その関係を以下の式のように表す。

$$f1 = C1 / (C1 + C2)$$

ここでf1は制癌剤1と2を併用した際にみられた抑制効果の中で制癌剤1により効果があったと考えられる割合を示している。

CI と C2 はそれぞれの制癌剤の濃度を示す。

以上の数式を用い、CI は以下のごとく定義される。

$$CI = (D12)(f1)/D1 + (D12)(f2)/D2 + (D12)(f1)(D12)(f2)/(D1)(D2)$$

ただし以上の数式の中で (D12) (f1) (D12) (f2)/ (D1) (D2) は制癌剤を併用して用いたときのmの値が、単剤でみられるmの値より大きい値を示すときのみ、用いられる。

CI の意義を以下に示す。

CI < 1 相乗作用

CI = 1 相加作用

CI > 1 拮抗作用

なお実験は triplicate で、各2回ずつ行った結果の平均値を用いた。

成 績

膀胱腫瘍4株に対する各制癌剤による50%抑制を示す濃度であるD_mをTable 1に示す。Table 1で見られる通りVP16ではばらつきが少ないが、その他の制癌剤では株による差がみられる。

一方2剤を用いた際のCIの結果を、Fig. 1からFig. 4に示した。図は横軸に制癌剤を併用した際の抑制率 (Fa) を、縦軸にCIを表わす。

Fig. 1よりVP16+MTXでは、5637に対しては

Table 1. D_m (50% inhibition dosage) M of four TCCaB cell lines against MTX, VBL, ADM, DDP and VP16

	MTX	VBL	ADM	DDP	VP16
T24	12.3	0.10	0.07	16.8	2.12
5637	2.8	0.30	0.28	11.1	2.33
TCCSUP	6.8	0.08	0.33	1.5	2.87
NBT2	N.D.	0.05	0.67	3.8	2'33

N.D.: not determined

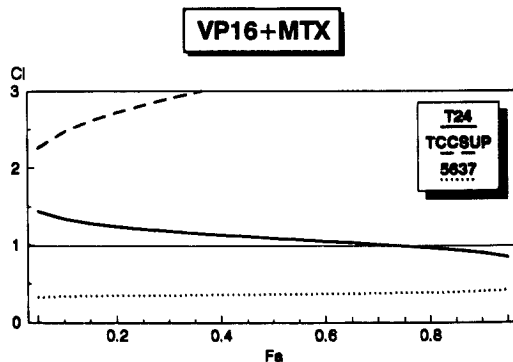


Fig. 1. Fraction affected (Fa) for the growth inhibition of bladder cancer cell lines by a mixture of methotrexate (MTX) and etoposide (VP16).

When CI < 1, antagonism is indicated.

CI = 1, summation is indicated.

CI > 1, synergism is indicated.

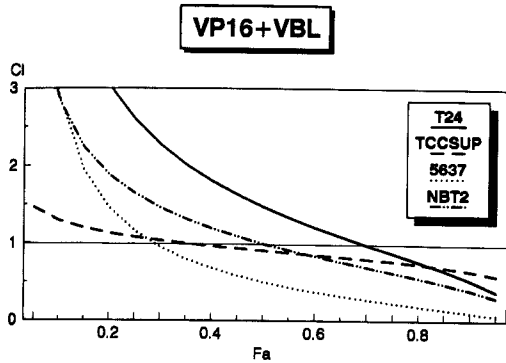


Fig. 2. Fraction affected (Fa) for the growth inhibition of bladder cancer cell lines by a mixture of vinblastine (VBL) and etoposide (VP16).

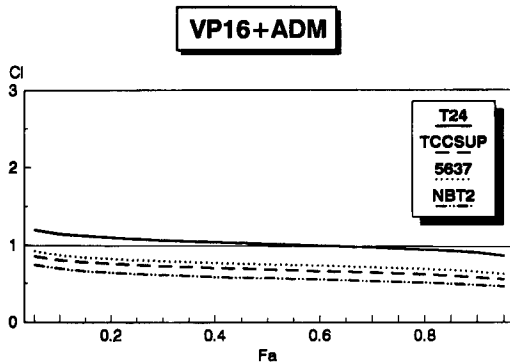


Fig. 3. Fraction affected (Fa) for the growth inhibition of bladder cancer cell lines by a mixture of adriamycin (ADM) and etoposide (VP16).

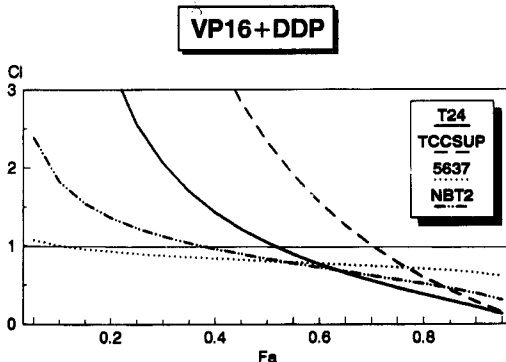


Fig. 4. Fraction affected (Fa) for the growth inhibition of bladder cancer cell lines by a mixture of cisplatin (CDDP) and etoposide (VP16).

いかなる時も、相乗作用がみられるのにもかかわらず、TCCSUP に対しては拮抗作用しか示さない。また T24 に対しては、Fa が 0.75 以上になり初めて相乗作用を示している。すなわち、かなり高濃度での併用でなければ相乗作用が得にくい事を示唆している。

一方、Fig. 3 より VP16+ADM では、4 株中 3 株までがいかなる Fa でも相乗作用を示し、残る 1 株も Fa が 0.45 以上で相乗作用を示している。これより VP16+ADM の組合せにより、膀胱移行上皮癌に対し、相乗作用が得やすい可能性が考えられる。

VP16+VBL, VP16+DDP の組合せによる制癌剤の併用効果は、それぞれの株によりかなりばらつきがみられた。

考 察

Schabel らは、実験的に P388 マウス白血病のモデルを用い、DDP と VP16 の併用効果について検討を加え、DDP 単剤では治療の効果はみられず、また、VP16 の効果もごく限られたものであったにもかかわらず、両者の併用では 30% の治療率であったと報告している⁸⁾。以後、実験的にも、臨床的にも VP16 と他の制癌剤との併用（主として DDP）について検討が加えられ、種々の癌で有用であるとの報告が、多数見られる。

また臨床的に肺小細胞癌や精巣腫瘍において、多剤不応症例に対しても、VP16 と他の制癌剤との併用により、効果がみられたとの報告もある^{3,5)}。

今回われわれの実験では、膀胱腫瘍に対し ADM と VP16 の組み合わせが効果的との結果を得た。Wassermann らや Tarr らは、ADM がトポイソメラーゼ II による DNA 鎖の切断(cleavage)を促進することを明らかにしており^{9,10)}、その一方で VP16 はトポイソメラーゼ II が DNA 鎖を切断した状態で固定化してしまうことにより細胞障害性を発現するとされている。以上より ADM と VP16 が制癌剤として相乗効果を示すことは十分に想像しうる。

進行性膀胱移行上皮癌に対する化学療法は、以前に比べ数段の進歩を遂げているものの、まだまだ完成されたものとはいえない。実際に臨床に携わる者として、薬剤耐性については避けて通れない重要な問題の一つであり、多剤不応症例に対する化学療法、すなわちサルヴェージ (salvage) 療法の確立も今後の課題の一つと考えられる。

そのような意味からも、今回の実験結果は、膀胱移行上皮癌に対して、VP16+ADM が、比較的相乗作用を得易く、制癌剤の併用療法を考える上で、有用で

はないかと考えられた。加えて、最近では制癌剤使用時において、スケジュール (schedule) 依存性が指摘されており¹¹⁾、VP16+ADM もスケジュールを工夫することによって、効果増強の可能性も期待できる。また、副作用に関しては、乳ガンや頭頸部腫瘍症例において VP16+ADM の併用療法で重篤な副作用をみなかったとの報告^{12,13)}もみられ、現状において進行性膀胱移行上皮癌で多剤不応症例となった場合、VP16+ADM の併用療法も考慮するのではないかと考えられた。

結 語

- 1) 膀胱移行上皮癌株 4 株を用い、VP16 と他の薬剤との併用効果を、in vitro colony formation assay にて検討した。
- 2) VP16+ADM の組合せによる併用が、比較的相乗作用を得易かった。
- 3) 多剤不応症例となった、進行性膀胱移行上皮癌患者に対し、VP16+ADM の併用療法の可能性が示唆された。

今回使用した T24 の供給を受けました Japan Cancer Research Resources Bank に謝意を表します。また、実験助手をつとめられた佐藤純子嬢に感謝致します。

文 献

- 1) Sternberg CN, Yagoda A, Scher HI, et al.: M-VAC (Methotrexate, Vinblastine, Doxorubicin and Cisplatin) for advanced transitional cell carcinoma of the urothelium. *J Urol* **139**: 461-469, 1988
- 2) Waxman J: Chemotherapy for metastatic bladder cancer. Is there new hope? *Br J Urol* **65**: 1-5, 1990
- 3) Comis RL, Tinsley RW, Newman N, et al.: The interaction between etoposide and cisplatin in small-cell lung cancer. in: Etoposide (VP16). Edited by Issell BF, Muggia FM and Cater SK, pp. 199-208, Academic Press, Orlando, 1984
- 4) Goldhirsch A, Joss R and Cavalli F: Etoposide in the treatment of non-small cell lung cancer. in: Etoposide (VP16). Edited by Issell BF, Muggia FM and Cater SK, pp. 209-214, Academic Press, Orlando, 1984
- 5) Williams SD, Loehrer PJ, Einhorn LH, et al.: Testicular cancer: Role of chemotherapy in: Etoposide (VP16). Edited by Brian F. Issell, Franco M, Muggia and Stephan K. Cater, pp. 225-232, Academic Press, Orlando, 1984
- 6) McGovern F, Kachel T, Vujan S, et al.: Establishment and characterization of a doxorubicin-resistant human bladder cancer cell line (MGH-U1R). *J Urol* **140**: 410-414, 1988
- 7) Ting-Chao Chou and Paul Talalay: Quantitative analysis of dose-effect relationships: The combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul* **22**: 27-55, 1984
- 8) Shabel FM, Jr., Trader MW, Laster WR, Jr. et al.: cis-Dihydrodiammine-platinum (II): Combination chemotherapy and crossresistance studies with tumors of mice. *Cancer Treat Rep* **63**: 1459-1473, 1979
- 9) Wassermann K, Markovits J, Jaxel C, et al.: Effects of morpholinyl doxorubicins, doxorubicin, and actinomycin D on mammalian DNA topoisomerase I and II. *Mol Pharmacology* **38**: 38-45, 1990
- 10) Tarr M and van Helden PD: Inhibition of transcription by adriamycin is a consequence of the loss of negative superhelicity in DNA mediated by topoisomerase II. *Mol Cell Biochem* **93**: 141-146, 1990
- 11) Slevin ML, Clark PI, Joel SP, et al.: A randomized trial to evaluate the effect of schedule on the activity of etoposide in small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* **7**: 1333-1340, 1989
- 12) Van Echo DA, Tchekmedyian NS, and Aisner J: The possible role of etoposide in combination. in: Etoposide (VP16). Edited by Issell BF, Muggia FM and Cater SK, pp. 199-208, Academic Press, Orlando, 1984
- 13) Gradishar WJ, Vokes EE and Kies MS: Phase II trial of etoposide and doxorubicin in advanced head and neck cancer. *Medical Pediatr Oncology* **18**: 487-490, 1990

(Received on October 17, 1990)
(Accepted on March 20, 1991)