

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—

福井医科大学泌尿器科学教室 (主任: 岡田謙一郎教授)

鈴木 裕志, 三輪 吉司, 秋野 裕信, 藤田 知洋

斉川 茂樹, 蟹本 雄右, 岡田謙一郎

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 $\mu\text{g/ml}$), 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.

(Acta Urol. Jpn. 39: 1215-1220, 1993)

Key words: Suramin, Cisplatin, Prostate cancer, MTT assay, Nude mouse

緒 言

進行期前立腺癌に対しては抗男性ホルモン療法が有効であり, 第一選択として用いられるが, 経過中にその多くはホルモン抵抗性を示し再燃・再発に至る. こうしたホルモン抵抗癌に対しては, 現在のところ抗癌化学療法以外には治療法がなく, 多くの施設で単剤もしくは多剤併用化学療法が行われている. しかし, その有効率は判定基準が異なるものの10~30%程度¹⁾であり, 予後はきわめて不良である. このため, 新しい制癌剤の開発や効果増強をめざす試みが必要とされている.

最近, National Cancer Institute (NCI) を中心としたホルモン抵抗性前立腺癌に対する suramin の有効性が報告されてきている^{2,3)}. suramin は1920年代にトリパノソーマ症やオンコセルカ症に対する抗寄生虫薬として開発され, trypan blue に類似の構造をもつ薬剤である. その後, RNA 逆転写酵素阻害活性を示すことが判明し⁴⁾, 一時は AIDS に対する治療薬としても研究され, この間, 抗腫瘍効果をもつことが明らかにされた²⁾. その作用機序としては in vitro において EGF, FGF, PDGF など各種の growth factor 作用の阻害⁵⁻⁸⁾ や G-binding protein⁹⁾, protein kinase C¹⁰⁾ DNA polymerase¹¹⁾, DNA

topoisomerase II¹²⁾ などさまざまな酵素活性の抑制が判明してきている。

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り²⁾, 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 $\mu\text{g/ml}$ 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他剤との併用は検討課題の一つと考えられる。今回, われわれはヒト前立腺癌株 PC-93 を用いて suramin の抗腫瘍効果と, CDDP との併用により効果増強がえられるかを *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: 京都大学泌尿器科学教室の大石先生より提供いただいた未分化前立腺癌株 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% CO_2 下で培養した。

2) PC-93 の発育におよぼす EGF の影響: 各濃度のマウス顎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 はドイツバイエル社より原末の提供を受け, 使用直前に PBS に溶解し各培地に添加した。

4) cell culture: $1 \times 10^5/\text{ml}$ に調整した細胞浮遊液を 96 孔マイクロプレートの各 well に 100 μl ずつ注入し, 5% CO_2 下で 1 時間培養した後, 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 30 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 Titattek 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) ノードマウス *in vivo* 実験: BALB/C 雄ノードマウス (日本クレア) 6 週齢の背部皮下に PC-93 を移植し, 各群 3~6 匹とした。薬剤投与開始は腫瘍重量が 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 日目に 100 mg/kg を追加投与した。CDDP は第 1 日目に 7 mg/kg の腹腔内一回投与とし, 5 日毎に腫瘍径を計測し, 腫瘍重量を算出した。

結 果

1) EGF 添加濃度の違いによる経時的な細胞増殖変化では, 無添加群に比べて細胞増殖促進効果を認め, また, 10 ng/ml 添加時で培養 2 日目に最大の効果がえられた (Fig. 1)。

2) suramin 単独添加群 (Fig. 2) では, 濃度依存性に増殖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えられた。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

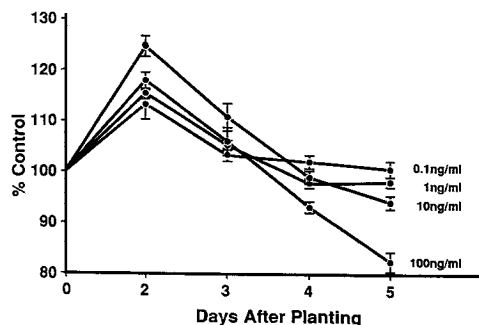


Fig. 1. Relative growth curves at different EGF concentration.

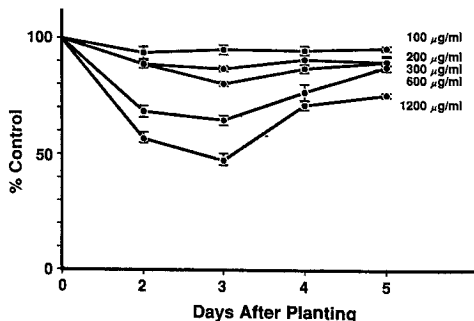


Fig. 2. Relative growth curves of PC-93 at different suramin concentration.

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 $300 \mu\text{g/ml}$ では、増殖抑制率は 19.7% ($P < 0.01$) と有意差は認めるものの十分な効果はいえず、 IC_{50} は $1,087 \mu\text{g/ml}$ であった。

3) EGF 10 ng/ml 添加における suramin の細胞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も認めた (Fig. 4)。

5) suramin $300 \mu\text{g/ml}$ と CDDP $1 \mu\text{g/ml}$ 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% ($P < 0.01$) とほぼ相加効果を示した (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

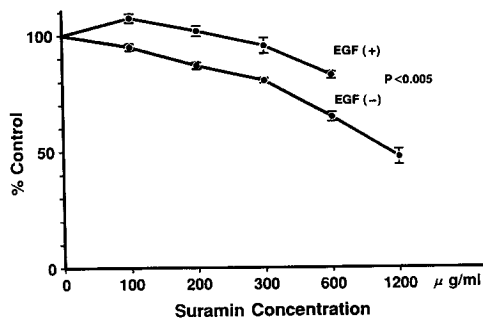


Fig. 3. Dose-response curves of suramin added EGF 10 ng/ml .

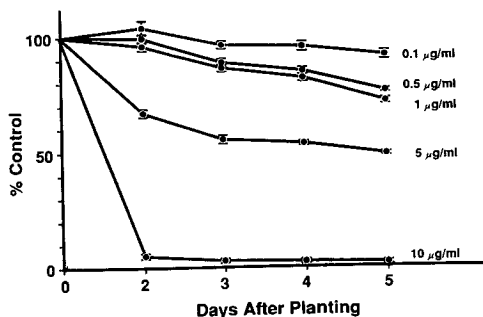


Fig. 4. Relative growth Curves of PC-93 at different CDDP concentration.

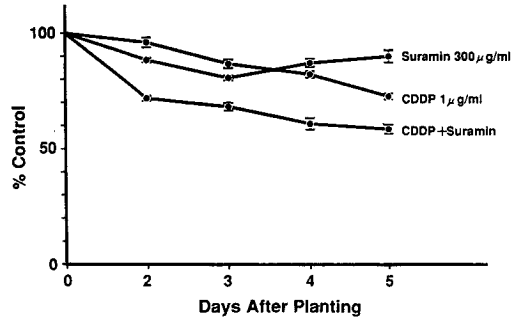


Fig. 5. Relative growth curves of CDDP and suramin.

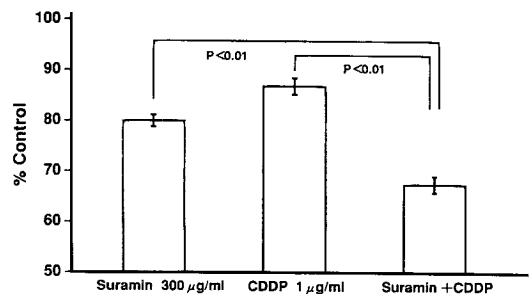


Fig. 6. Relative growth ratio after 3 days (Suramin, CDDP).

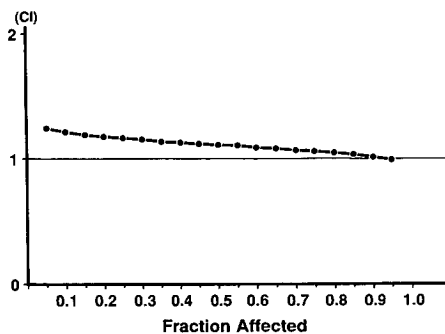


Fig. 7. Combination index of CDDP-suramin.

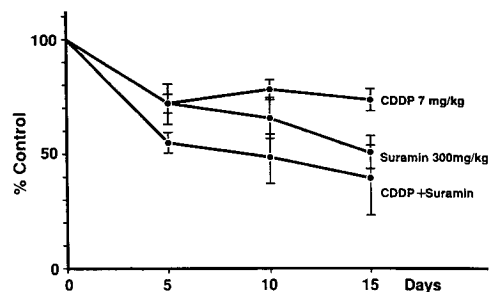


Fig. 8. Relative growth curves of PC-93 (nude mouse).

られなかった (Fig. 7).

7) ノ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えられた (Fig. 8)。しかし、suramin を投与したマウスの中、3割が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⁵⁻⁸⁾ことが判明し、抗腫瘍効果をもつことが報告されている。Stein²⁾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 (副腎癌10例、腎癌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、その副作用は蛋白尿14例、腎機能障害9例、肝機能障害8例、血液凝固障害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ことがいえ、安全域の狭い薬剤といえる。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と、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 単独群では臨床使用可能な濃度である 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では期待されたほどの抗腫瘍効果は認められなかった。Rocca¹⁶⁾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 IC_{50} が 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 前後と有効であったが、DU 145 では 600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 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 や 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 $\text{TGF}\alpha$ 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、他の酵素系阻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* においては培地内の蛋白濃度により 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^{16,18)}と比べても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¹⁷⁾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 では持続接触にもかかわらず細胞増殖の回復を認めており、suramin の活性が低下したか、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¹⁹⁾が *in vivo* で hyperdiploid Ehrlich carcinoma を用いて 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と間隔によって効果がことなることを報告している。また、Freuhauf ら²⁰⁾は、*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ことを報告した。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 の作用阻害と DNA 障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、lysosomal enzyme の阻害によりヘパリンなどの glycosaminoglycan が蓄積²¹⁾、腫瘍の血管増生を抑制する可能性²²⁾が報告されている。今回のノード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

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 300 $\mu\text{g/ml}$ 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 600 $\mu\text{g/ml}$ 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ず, また, CDDP との併用では相乗効果はえられなかった。しかし, 多彩な作用をもつユニークな薬剤として今後とも興味をもたれる。そして, suramin の抗腫瘍作用の本質的機序や副作用機序の解明により, 適切な投与方法の決定や副作用の少ないアナログ製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えられなかった。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) ノード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 : 04670956) の援助によって行われたものである。

文 献

- 1) Eisenberger MA: Chemotherapy for endocrine resistant cancer of the prostate. In: EORTC Genitourinary Group Monograph 8: Treatment of Prostatic Cancer-Facts and Controversies. Edited by Schröder FH., pp. 155-164, Wiley-Liss, Inc., 1990
- 2) Stein CA, LaRocca RV, Thomas R, et al.: Suramin: An anticancer drug with a unique mechanism of action. J Clin Oncol 7: 499-508, 1989
- 3) Myers C, Cooper M, Stein C, et al.: Suramin: A novel growth factor antagonist with activity in hormone-refractory metastatic prostate cancer. J Clin Oncol 10: 881-889, 1992
- 4) De Clercq E: Suramin: A potent inhibitor of the reverse transcriptase of RNA tumor viruses. Cancer Lett 8: 9-22, 1979
- 5) Betsholtz C, Johnsson A, Heldin CH, et al.: Efficient reversion of simian sarcoma virus-transformation and inhibition of growth factor-induced mitogenesis by suramin. Proc Natl Acad Sci USA 83: 6440-6444, 1986
- 6) Coffey R, Leof E, Shipley G, et al.: Suramin inhibition of growth factor receptor binding and Mitogenicity in AKR-2B cells. J Cell Physiol 132: 143-148, 1987
- 7) Sato Y and Rifkin D: Autocrine activities of basic fibroblast growth factor: Regulation of endothelial cell movement, plasminogen activator synthesis, and DNA synthesis. J Cell Biol 107: 1199-1205, 1988
- 8) Pienta K, Isaacs W, Vindivich D, et al.: The effects of basic fibroblast growth factor and suramin on cell motility and growth of rat prostate cancer cell. J Urol 145: 199-202, 1991
- 9) Butler SJ, Kelly ECH, McKenzie FR, et al.: Differential effects of suramin on the coupling of receptors to individual species of pertussis-toxin-sensitive guanine-nucleotide-binding proteins. Biochem J 251: 201-205, 1988
- 10) Hensley C, Boscoboinik D and Azzi A: Suramin, an anti-cancer drug, inhibits protein kinase C and induces differentiation in neuroblastoma cell clone NB2A. FEBS Lett 258: 156-158, 1989
- 11) Spigelman Z, Dowers A, Kennedy S, et al.: Antiproliferative effects of suramin on lymphoid cell. Cancer Res 47: 4694-4698, 1987
- 12) Larsen A, Lelievre S, Bojanowski K, et al.: Suramin is an inhibitor of DNA topoisomerase II. Proc Am Assoc Cancer Res 32: 338, 1991 (abstr)
- 13) Chou TC and Talalay P: Quantitative analysis of dose-effect relationships: The combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. In: Advances in enzyme regulation. Edited by Weber G, 22: pp. 27-55, Pergamon Press, New York, 1983
- 14) Romijn JC, Verkoelen 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
- 15) Morton RA, Isaacs JT and Isaacs WB: Differential effects of growth factor antagonists on neoplastic and normal prostatic cells. *Prostate* 17: 327-336, 1990
- 16) La Rocca RV, Danesi R, Cooper MR, et al.: Effect of suramin on human prostate cancer cells in vitro. *J Urol* 145: 393-398, 1991
- 17) Edward JHK, Sherwood ER, Sutkowski DM, et al.: Inhibition of prostatic tumor cell proliferation by suramin: Alterations in TGF alpha-mediated autocrine growth regulation and cell cycle distribution. *J Urol* 146: 171-176, 1991
- 18) Lopez RL, Peters G, van Loenen AC, et al.: The effect of schedule, protein binding and growth factors on the activity of suramin. *Int J Cancer* 51: 921-926, 1992
- 19) Ossward H and Youssef M: Suramin enhancement of the chemotherapeutic actions of cyclophosphamide or adriamycin of intramuscularly-implanted Ehrlich carcinoma. *Cancer Lett* 6: 337-343, 1979
- 20) Fruehauf JP, Myers CE and Sinha BK: Synergistic activity of suramin with tumor necrosis factor α and doxorubicin on human prostate cancer cell lines. *J Natl Cancer Inst* 82: 1206-1209, 1990
- 21) Horne M, Stein CA, LaRocca RV, et al.: Circulating glycosaminoglycan anticoagulants associated with suramin treatment. *Blood* 71: 273-279, 1988
- (Received on October 19, 1993)
(Accepted on October 22, 1993)
(迅速掲載)