

ATP を用いた化学療法の抗腫瘍効果増強に関する実験的研究

川崎医科大学消化器外科

牟礼 勉 岩本 末治 木元 正利 瀬尾 泰雄
長野 秀樹 清水 裕英 山本 康久 佐野 開三

国立予防衛生研究所化学部

北 川 隆 之

EFFECT OF ATP ON ANTITUMOR ACTIVITY OF VARIOUS ANTITUMOR DRUGS IN MICE TUMOR CELLS *IN VITRO*

Tsutomu MURE, Sueharu IWAMOTO, Masatoshi KIMOTO,
Yasuo SEO, Hideki NAGANO, Hirohide SHIMIZU,
Yasuhisa YAMAMOTO and Kaizo SANO

Division of Gastroenterology, Department of Surgery, Kawasaki Medical School

Takayuki KITAGAWA

Department of Chemistry, National Institute of Health

マウス培養細胞を用い、ATP の癌細胞および正常細胞の増殖、膜透過性におよぼす影響を検討した。さらに本物質の癌化学療法への応用を目的として、各種抗癌剤との併用実験を行った。ATP により、癌細胞では著明な細胞膜透過性の亢進、cell viability の低下がみられたのに対し、非癌化細胞におけるこれらの変化は軽微で、ATP 作用は癌細胞に特異的であった。ATP 処理後の癌細胞における各種抗癌剤の抗腫瘍効果は、5-FU, ADM, MMC, ACNU では相加的、VCR では相乗的に増強した。また、正常細胞に対する抗癌剤の細胞毒性は ATP の併用により増強されなかった。これらの結果から ATP を用いることにより、選択的癌化学療法が期待できるものと思われた。

索引用語：ATP、細胞膜透過性、癌化学療法

I. はじめに

抗癌剤の癌細胞に対する選択性を高めることは、癌化学療法において重要な課題である。

われわれは、adenosine 5'-triphosphate (ATP) が癌細胞に対して特異的に作用し、膜透過性の亢進、さらに viability の低下を誘導する事実をもとに、各種抗癌剤との併用実験を *in vitro* で行い、癌化学療法への応用の可能性を検討した。

II. 実験方法

癌細胞はマウスの黒色腫である Clone-M3細胞と Ehrlich 腹水癌細胞を、非癌化細胞は NIH 3T3細胞と

Balb/c マウス胎児線維芽細胞を実験に用いた。Clone-M3細胞は Ham F10+15%馬血清+2.5%胎児牛血清で、Ehrlich および胎児線維芽細胞は Eagle MEM+10%胎児牛血清で、NIH 3T3細胞は Eagle MEM+10%成牛血清で、37℃、5%CO₂ 下で培養しているものを使用した。

1. 細胞膜透過性の検討

ATP による細胞膜透過性変化に関する実験は本来、細胞膜に非透過性であるリン酸化合物の細胞内への流入と、細胞外への流出を指標として行った²⁾⁴⁾。

1) p-nitrophenyl phosphate (pNPP) の細胞内への流入を指標とした実験

pNPP は細胞膜を通過しにくい性質を持つ物質であるが、膜を通過し細胞内に入ると、細胞内の alkaline phosphatase により加水分解され、p-nitrophenol とな

*第30回日消外会総会シンポ2：消化器実験外科の進歩と新しい展開

<1987年10月12日受理>別刷請求先：牟礼 勉

〒701-01 倉敷市松島577 川崎医科大学消化器外科

り黄色に呈色し,再び膜を通過して細胞外に流出する.

この反応を利用し,細胞を pH 7.5または8.2の Tris buffer 中, ATP と5mM pNPP を加え15分間, 37°C で incubate した. 細胞を除外し, buffer の呈色を分光光度計 (410nm) で測定した.

2) 酸可溶性リン酸化合物質の流出を指標とした実験

対数期の細胞の酸可溶性物質を培養液中, [³H] uridine で3時間ラベルすると,細胞内に取り込まれた uridine は UDP, UTP とリン酸化され,細胞膜を通過できなくなり細胞内に保持される. このような標識細胞を洗浄後, buffer に移し, ATP の存在下, 37°C で incubate した. 反応後, filter を通して buffer より細胞を除外し, 細胞外に流出した放射活性を測定した. また, ラベル後の細胞内全酸可溶性物質は5%TCA にて処理後, 同様に放射活性を測定した.

2. cell viability の検討

細胞を pH 7.5または8.2の buffer 中, ATP を加えて10~20分間反応させ, 処理細胞を洗浄後, 通常の培養液中, 72時間 incubate し細胞数を count した.

3. ATP と抗癌剤の併用効果の検討

2の実験と同様, pH 8.2の buffer 中, 0.5mM ATP で10分間処理した細胞を, 抗癌剤を含む培地に移して incubate し, cell growth を検討した.

III. 結果

pNPP の流入, 加水分解を指標とした透過性変化は, 癌細胞である Clone-M3, Ehrlich 細胞の両者で確認された. ATP が高濃度になるに従い pNPP の加水分解が増加し, 細胞膜透過性の亢進を示した. また, この反応は, buffer の pH に依存し, 8.2のアルカリ側に強い反応がみられた (図1).

Clone-M3細胞における酸可溶性物質の流出を指標

図1 pNPP の流入, 加水分解を指標とした細胞膜の透過性変化

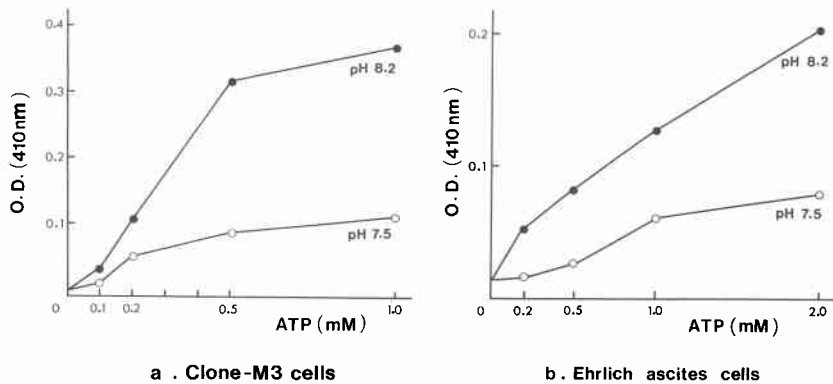
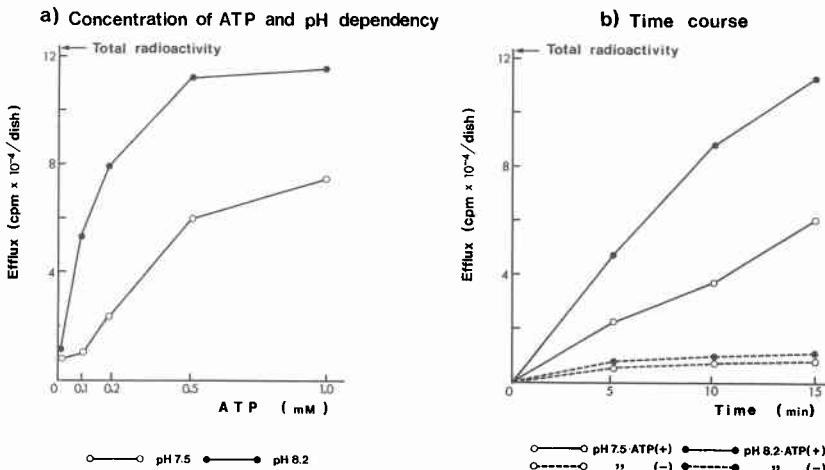


図2 酸可溶性物質の流出を指標とした細胞膜の透過性変化 (Clone-M3細胞)



とした細胞膜透過性の変化は、先の流入を指標とした実験と同様、ATP添加後数分以内におこり、15分時、pH 8.2では98%の流出が認められた。この変化は、pH 7.5ではゆるやかであり、同じ15分時、48%の流出がみられた。また、この反応はATP 0.1mMで誘導され、至適ATP濃度は、0.5~1.0mMであった。これらの結果は、ATPによる細胞膜透過性変化が物質の流入、流出両機構に同時に起きることを示している(図2)。

癌細胞と非癌化細胞の透過性変化を比較すると、0.5 mM ATPで15分処理時、癌細胞であるClone-M3細胞では、ATP未処理の10.6倍、細胞内全酸可溶性物質の98%の流出がみられたのに対し、非癌化細胞であるNIH 3T3では、1.8倍、36%、マウス胎児線維芽細胞では1.6倍、19%といずれも低値で、ATPの作用は用いた癌細胞に極めて特異的であった(図3)。

ATP処理を行ったClone-M3細胞のviabilityの変

化をregrowth assayにより調べた結果、膜透過性変化と同様、ATP処理したClone-M3細胞のviability

図3 癌細胞と非癌化細胞の透過性変化

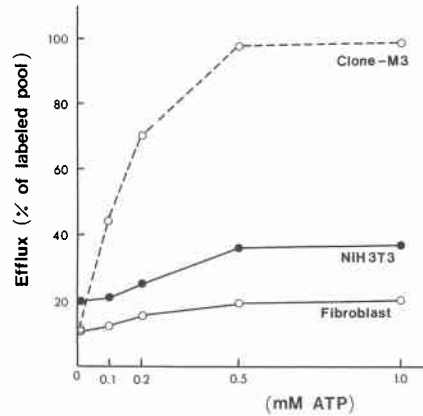


図4 ATPによる cell viability の変化 (Clone-M3細胞)

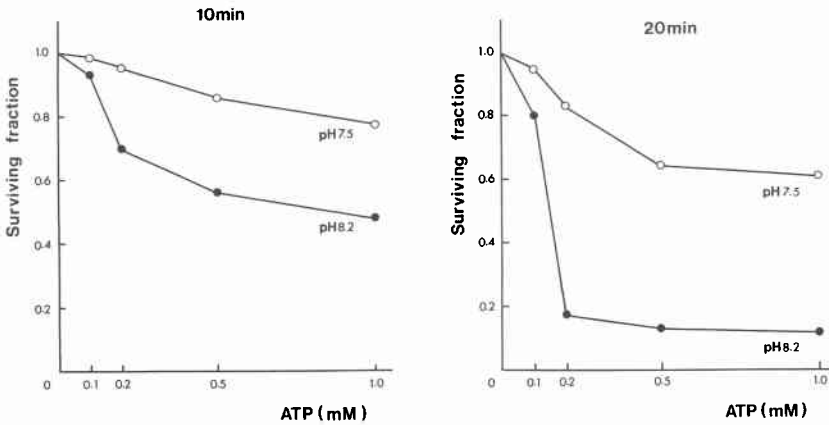


図5 ATPによる cell viability の変化 (NIH 3T3, マウス胎児線維芽細胞)

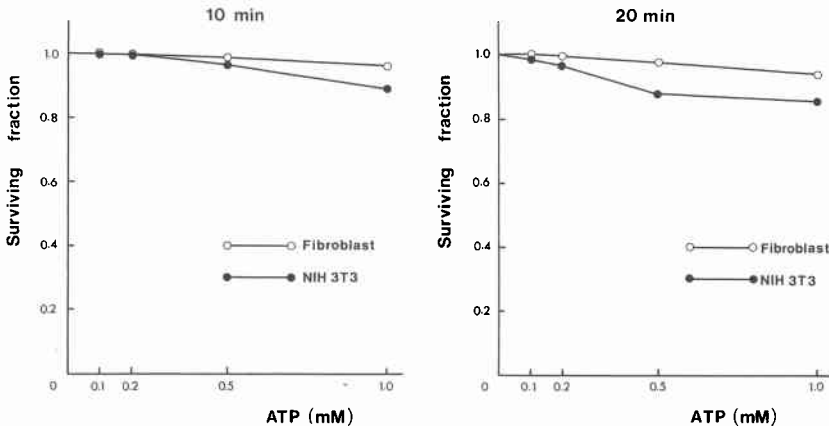


表1 抗癌剤の抗腫瘍効果に及ぼす ATP の影響

Drugs	Dose (ng/ml)	Survival rate (%)	
		ATP(-)	ATP(+)
5-FU	(-)	100.0	51.0
	100	93.4	50.4
	1.000	69.7	34.7
	10.000	25.1	13.7
	50.0	5.7	2.1
	100.000	24.9	12.1
ADM	(-)	100.0	48.1
	1	70.9	35.9
	10	32.6	16.0
	100	27.0	11.6
	500	2.5	0.5
MMC	(-)	100.0	52.1
	10	66.4	35.8
	100	24.7	13.5
	1000	19.7	10.6
ACNU	(-)	100.0	47.5
	10	94.6	46.3
	100	89.0	40.8
	1.000	20.7	10.2
	10.000	16.9	8.8
VCR	(-)	100.0	45.7
	0.1	96.2	33.4*
	1	77.2	26.9*
	5	25.6	9.8
	10	18.0	7.8

* Synergistic effect

は、ATP が高濃度になるに従い、また処理時間が長くなるに従って低下した (図4)。

一方、非癌化細胞である、NIH 3T3、マウス胎児線維芽細胞では、膜透過性変化と同様、ATP 処理による増殖抑制は極めて少なかった (図5)。

以上の知見をもとに、ATP による膜透過性の亢進ならびに殺細胞効果が、抗癌剤の抗腫瘍効果に及ぼす影響をさらに検討した。Clone-M3細胞において ADM と併用した結果をみると、ADM の抗腫瘍効果は、いずれの濃度においても ATP で処理することにより相加的に増強された。すなわち、1ng/ml の ADM 単独では 70.9%、ATP 処理のみでは 48.1% の生存率であったが、両者の併用により生存率は 35.9% と低下した。

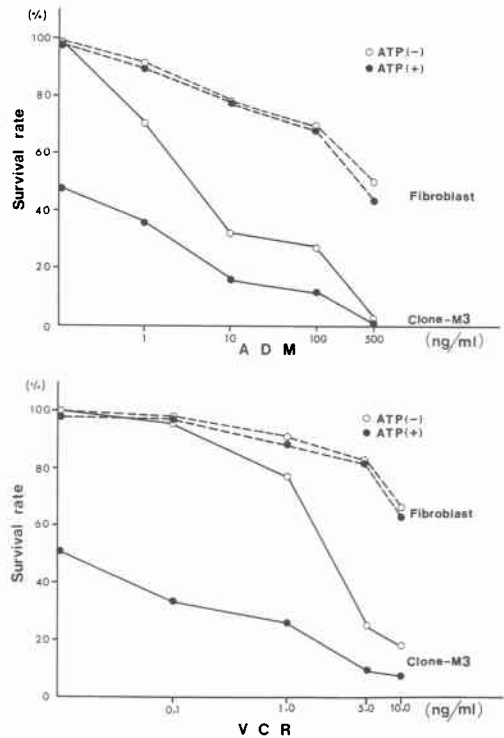
5-FU、MMC、ACNU を併用した場合も同様に相加的効果がみられた。VCR ではわずかながら、相乗的に増強された (表1)。

同様の実験で、正常細胞であるマウス線維芽細胞と癌細胞である Clone-M3細胞を比較すると、マウス線維芽細胞では、ATP の作用はほとんど認められず、ADM、VCR のいずれの濃度においても、Clone-M3細胞に比べ生存率は有意に高かった (図6)。

IV. 考 察

細胞外 ATP が、動物細胞の膜透過性変化をおこすことは、これまでもいくつかの報告がある¹⁾⁻³⁾⁶⁾。現在までに、3T6、SV3T3、PY3T3、B16 melanoma、L929、Friend erythroleukemia などのマウス由来の癌

図6 癌細胞と正常細胞における ATP の併用効果



細胞をはじめ、CHO-K1(ハムスター)や HeLa(ヒト)細胞などの種々の癌細胞で ATP 作用が認められている。今回の実験では、癌細胞である Colne-M3、Ehrlich 細胞において ATP 作用が確認され、また膜透過性の亢進に伴い cell viability の低下も認められた。しかし、非癌化細胞である NIH 3T3、マウス胎児線維芽細胞ではこれらの変化は軽微であり、ATP の作用は用いた癌細胞に特異的であった。

また、癌細胞における各種抗癌剤の増殖抑制効果は ATP 処理により相加的、一部、相乗的に増強された。ATP がすべての正常細胞に対して殺細胞効果を発揮しないとすれば、ATP の併用により少量の抗癌剤で癌の増殖を抑えることが可能となり、副作用の軽減にもつながる。したがって、臨床的に ATP の適切な投与方法を確立することで、これまでの化学療法に加えた治療効果が期待できるものと思われ、現在 *in vitro* での検討を行っている。

文 献

1) Rozengurt E, Heppel LA: A specific effect of external ATP on the permeability of transformed 3T3 cells. Biochem Biophys Res Commun

67 : 1581—1588, 1975

- 2) Rozengurt E, Heppel LA, Freiberg I: Effect of exogenous ATP on the permeability properties of transformed cultures of mouse cell lines. *J Biol Chem* 252 : 4584—4590, 1977
- 3) 北川隆之: ATPによる動物細胞表面膜の透過性調節. 蛋白質・核酸・酵素 29 : 511—522, 1984
- 4) 牟礼 勉: 癌細胞の増殖・膜透過性に及ぼす外因性 ATP の影響—*In vitro* における検討—. 川崎医

会誌 12 : 67—80, 1986

- 5) 佐野開三, 牟礼 勉: 腫瘍細胞に及ぼす外因性 ATP の影響. 外科治療 153 : 578—579, 1985
 - 6) Kitagawa T, Akamatsu Y: Modulation of passive permeability by external ATP and cytoskeleton-attacking agents in cultured mammalian cells. *Biochem Biophys Acta* 734 : 25—32, 1983
-