

ヒト胃癌に対する Cis-diamminedichloroplatinum とカフェインとの併用効果と染色体におよぼす影響

横浜市立大学第1外科

山本 裕司 天野 富薫 今田 敏夫 青山 法夫
竹鼻 敏孝 利野 靖 高橋 誠 松本 昭彦

ヒト胃癌細胞株 STKM-1を用いて Cis-diamminedichloroplatinum(以下 CDDP)とカフェインとの併用抗腫瘍効果と染色体におよぼす影響について検討した。

CDDP (2 μ g/ml) 3時間接触で57%の増殖率であったが, CDDP 接触後カフェイン1mM 持続接触にて23%に, 2mM にて9.3%に低下し, 抗腫瘍効果の増強が認められた。

CDDP (2 μ g/ml) 処理後の染色体における gap/break の出現頻度は1.816 \pm 1.509/Cell, exchange の出現頻度は0.184 \pm 0.565/Cell であった。CDDP 処理直後からカフェイン1mM を24時間接触させると gap/break の出現頻度は4.206 \pm 3.162/Cell, exchange は0.760 \pm 0.938/Cell と増加した。CDDP 処理後24, 48時間後にカフェインを接触させても同様の結果が得られた。

以上より, カフェインは DNA 修復阻害作用を有し, 胃癌に対する化学療法において, CDDP との併用で抗腫瘍効果の増強が期待された。

Key words: human gastric cell line, STKM-1, caffeine, concomitant effects of CDDP and caffeine, chromosomal aberration

緒言

腹膜播種性転移に対する Cis-diamminedichloroplatinum (以下 CDDP) の腹腔内投与は Howel ら¹⁾によりその効果が報告され, 近年消化器癌に対しても応用されている。しかしながら, 投与量の増加にともなう副作用の発現や, 薬剤耐性などの問題を有し, 満足すべき成績は得られていない²⁾。

カフェインは DNA 修復阻害作用を有し, 種々の DNA 障害をもたらす制癌剤との併用で抗腫瘍効果を増強する³⁾⁻⁵⁾とされている。そこで, われわれはヒト胃癌細胞株 STKM-1⁶⁾を用いて CDDP とカフェインとの併用による抗腫瘍効果の増強と, 染色体に及ぼす影響について検討し, 腹膜播種性転移に対する CDDP・カフェインの腹腔内投与の臨床応用への可能性について報告する。

材料と方法

1. 増殖抑制効果

ヒト胃癌細胞株 STKM-1 (神奈川県立がんセン

ター)を用い, 10%牛胎児血清 (FBS, GIBCO Co.) 加 RPMI1640 (GIBCO Co.) 培養液にて37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ 下で培養した。上記培養液には Penicillin G 100unit/ml, Streptomycin 100 μ g/ml を加えた。

対数増殖期の細胞を用い, 1 \times 10⁵に調製した細胞浮遊液を60mm dish (Corning) に分注し, カフェインを 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0mM の濃度で持続接触させ, 72時間後に0.25%トリプシン (DIFCO, USA) で剥離分散後, 0.5%トリパンブルー色素排除法にて生細胞をカウントした。CDDP は0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0 μ g/ml の各濃度で3時間接触させ, 72時間後に同様に生細胞をカウントした。

また, CDDP 3時間接触後, カフェイン1mM および 2mM の濃度で72時間持続接触後, 同様に生細胞をカウントし, CDDP とカフェインの併用効果を検討した。

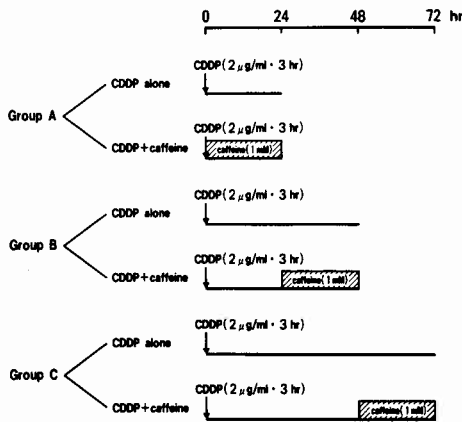
各条件下で3検体ずつ処理し, 生細胞数は3検体の平均値とした。なお, 検体中の生細胞数は1検体につき4回測定してその平均値とした。

2. 染色体分析

CDDP を2 μ g/ml の濃度で3時間接触させた。その

<1993年2月10日受理> 別刷請求先: 山本 裕司
〒232 横浜市南区浦舟町3-46 横浜市立大学医学部
付属浦舟病院第1外科学教室

Fig. 1 Method of treatment with Cis-diamminedichloroplatinum (CDDP) or caffeine
 Group A: after 24 hours of treatment with CDDP (2 μ g/ml \cdot 3hr), Group B: after 48 hours of treatment with CDDP (2 μ g/ml \cdot 3hr), Group C: after 72 hours of treatment with CDDP (2 μ g/ml \cdot 3hr)
 CDDP alone: Cells were treated with CDDP alone, CDDP+caffeine: Cells were treated with CDDP and exposed to caffeine (1mM) during last 24 hours before harvesting



後細胞の採取時間により3群(A群:24時間, B群:48時間, C群:72時間)に分けた。さらに各群をCDDP単独群(CDDP alone)とカフェイン併用群(CDDP+caffeine)に分けた。カフェイン併用群では細胞を採取する24時間前に培養液中のカフェインの濃度が1mMになるようカフェインを培養液中に添加した(Fig. 1)。

細胞培養液中にコルヒチンを0.001 μ g/mlの濃度になるように注入し, 3時間接触後, 細胞を採取し, 0.05 MのKClで12分間低調処理を行った。固定はCarnoy液(メタノール:氷酢酸3:1)で3回洗浄固定後, スライドグラスに塗布し, 空気乾燥した。乾燥後, トリプシン処理を行い, Giemsa染色し, 染色体分析を行った(Fig. 2)。

各処理ごとに30個以上の細胞分裂像を観察してgap, break, exchangeなどの染色体の構造異常を観察し, 計測した。Gapとbreakの区別は, 染色体が同軸線上にあるものをgapとし, 同軸線上よりはずれているものをbreakとされているが, 両者の区別は困難であり, 両者一括して測定した。

統計的処理はStudent-t検定および χ^2 検定を用いた。

Fig. 2 Method of chromosome staining

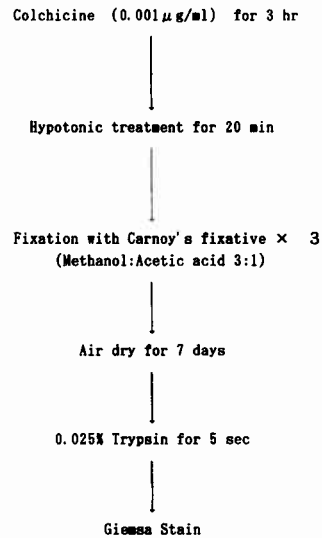
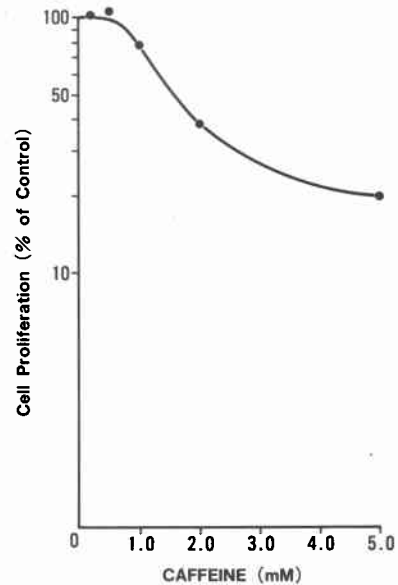


Fig. 3 Effect of caffeine alone on the cell proliferation



結果

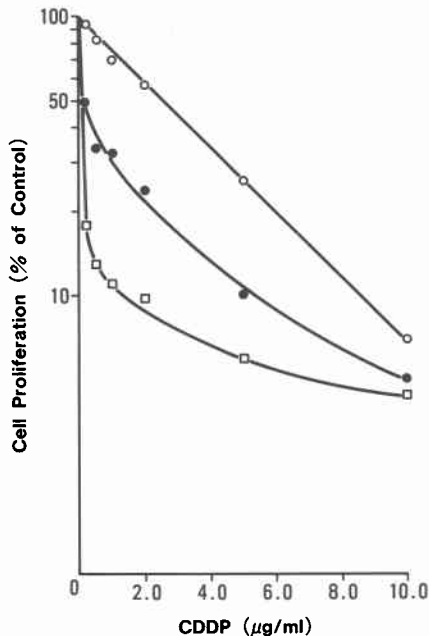
1. 増殖抑制効果

1) カフェイン単独

STKM-1細胞の増殖はカフェインの濃度が0.2mMおよび0.5mMではほとんど抑制されず, 1mMで約78%, 2mMで約40%, 5mMで約22%の増殖率であった(Fig. 3)。

Fig. 4 Combination effect of CDDP with caffeine on the cell proliferation.

○: CDDP alone (3hr), ●: CDDP (3hr)+caffeine 1 mM (72hr), □: CDDP (3hr)+caffeine 2mM (72 hr)



2) CDDP 単独

STKM-1細胞のCDDPに対する感受性は比較的低く、CDDPの濃度が0.2μg/mlで94%、1μg/mlで70%、2μg/mlで57%、5μg/mlで26%、10μg/mlで9%と増殖率はCDDPの濃度に対して直線的に低下した(Fig. 4).

3) CDDP・カフェインの併用効果

CDDP接触後カフェインを持続接触させると、低濃度のCDDPでもSTKM-1細胞の増殖率は著明に低下し併用効果がみられたが、CDDP 10μg/mlでは併用効果はみられなかった(Fig. 4).

2. 染色体の構造異常

STKM-1細胞の染色体数は46~90本で、最頻値は52本であった(Fig. 5, 6).

無処置群において染色体の構造異常を認めた細胞は9.1%、gap/breakの出現頻度は0.103±0.279/cell、exchangeの出現頻度は0.015±0.171/cellであった(Table 1).

CDDP単独群において染色体の構造異常を認めた細胞は24時間後(A群)で73.5%、48時間後(B群)

Fig. 5 Chromosomes of STKM-1

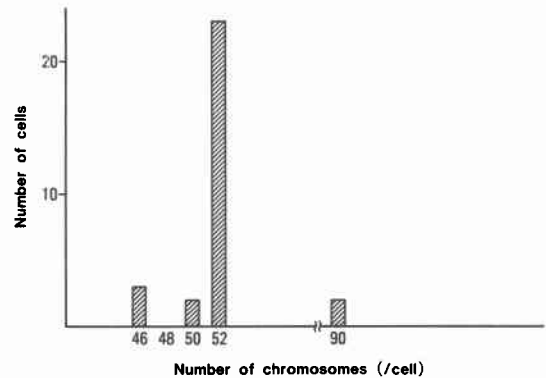
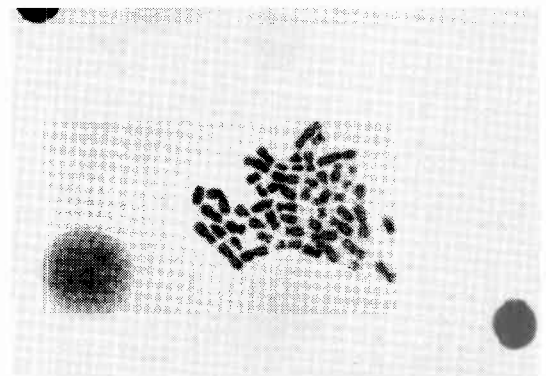


Fig. 6 Histogram of chromosome number of STKM-1



で60%、72時間後(C群)で51.5%と無処置群と比較して有意($p < 0.01$)に増加したが、時間の経過とともに減少する傾向がみられた(Table 1). さらに、gap/breakおよびexchangeの出現頻度も無処置群と比較し有意($p < 0.01$)に増加した(Fig. 7, 9, 10).

CDDP接触直後からカフェインを1mMの濃度で24時間接触させると(A群, CDDP+caffeine), 染色体の構造異常を認めた細胞は95.9%と有意($p < 0.01$)に増加し(Table 1), gap/breakおよびexchangeの出現頻度はCDDP単独接触群と比較し有意($p < 0.01$)に増加した(Fig. 8, 9, 10).

CDDP接触24時間後(B群, CDDP+caffeine)および48時間後(C群, CDDP+caffeine)にカフェインを接触させても同様の結果が得られた(Fig. 9, 10).

考 察

CDDPは1969年 Rosenbergら¹⁰⁾により開発された制癌剤であり、現在各領域の癌化学療法の中心的役割

Table 1 Incidence of chromosome aberrations

	No. of cells	damaged cells (%)	chromosome aberrations (/cell)		
			gap/break	exchange	
Control	33	3(9.1)	0.103±0.279	0.015±0.171	
Group A	CDDP alone	49	36(73.5)	1.816±1.509	0.184±0.565
	CDDP+caffeine	49	47(95.9)	4.206±3.162	0.760±0.938
Group B	CDDP alone	30	18(60.0)	1.000±1.240	0.167±0.456
	CDDP+caffeine	54	47(87.0)	5.037±3.990	1.574±1.525
Group C	CDDP alone	33	17(51.5)	1.152±1.302	0.030±0.183
	CDDP+caffeine	32	27(84.4)	3.844±3.323	0.719±0.023

*p<0.01

Fig. 7 Chromosome aberrations induced by CDDP treatment with 2μg/ml (↑ : break)

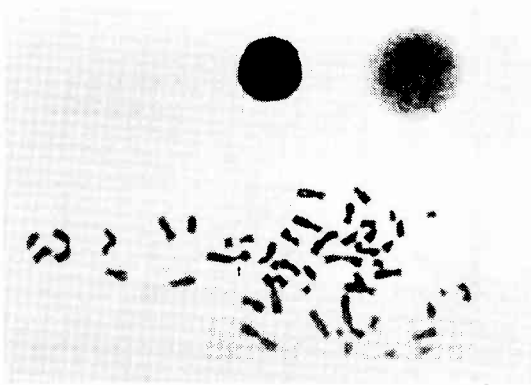
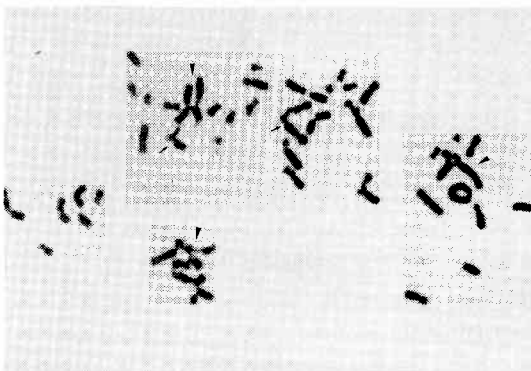


Fig. 8 Chromosome aberrations induced by treatment of CDDP (2μg/ml) and caffeine (1mM) (↑ : gap, ▲ : exchange)



を果たしている。その主たる作用機序はDNAと結合し、crosslinkを形成することによるDNA合成障害である^{11)~13)}。

Fig. 9 Incidence of chromatid gap/break

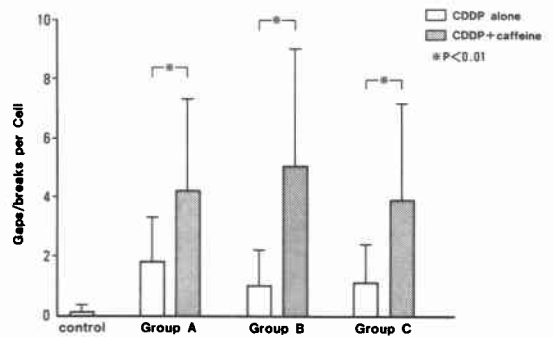
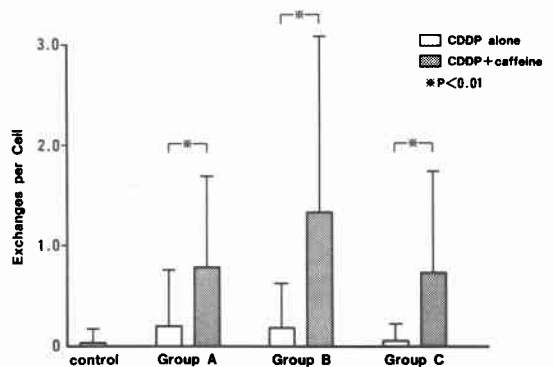


Fig. 10 Incidence of chromatid exchange



CDDPによりDNAに損傷を受けた細胞はG2期の延長を来し、この間にDNAは修復されM期へと回転するが、修復できない細胞は死滅する。このDNA修復機構には損傷を受けた部位が除去され、その後新しいDNAを合成し除去された部位に置換される excision repairと、損傷を受けたままDNAが複製され、その後修復される postreplication repair とがあるが、CDDPにより損傷を受けた細胞は後者の post replica-

tion repairにより修復する⁹⁾とされている。こうしたCDDPの作用はDNAヒストグラム上G2M期の蓄積として現れ、染色体にもgapやbreakなどの形態異常として現れてくる。

一方、カフェイン単独では高濃度の場合、細胞内cyclic AMPの上昇、ThymidineやUridineの細胞内への取り込みの低下あるいはDNA polymerase活性の低下などによりDNA合成を阻害するが、低濃度ではその効果はほとんどみられない¹⁴⁾とされている。われわれの実験結果からもカフェイン濃度が0.5mMまでの低濃度では増殖抑制効果はみられなかったが、1mMで約30%、2mMで約60%の増殖抑制がみられた。

カフェインの低濃度における作用はDNA修復阻害作用とされている。Van Den Bergら⁹⁾はCDDP処理後にみられるDNA合成の低下は0.75mMのカフェインを併用することにより正常レベルまで回復するが、合成された分子量は正常の分子量と比較して低いことからカフェインはpost replication repairを阻害するとしている。さらに、Isekiら⁶⁾の報告によるとNeocarzinostatinとの併用で、Mitotic Indexを経時的に測定すると、その回復時間はNeocarziostatin単独よりも速くなることからカフェインはDNA損傷を受けG2期に蓄積している細胞をDNAが修復されないままM期へと回転させるものと推測している。

著者はこうしたカフェインの作用を染色体の形態学的変化から検討した。CDDP単独処理後にみられたgapやbreakおよびexchangeの構造異常の出現頻度はカフェイン併用において有意($p < 0.01$)に高く、こうした変化はCDDP処理後72時間までのいずれの時期にカフェインを作用させても同様であった。

染色体の構造異常の生成機構は不明な点が多いが、CDDPにより損傷をうけたDNAは切断され、その大部分は元通りに修復するが、あるものはM期へと回転し、染色分体が切断されたまま残り、あるものは2個の切断部位が誤って再結合し、exchangeなどの異常を形成する¹⁵⁾と考えられる。

カフェイン併用により染色分体の構造異常が増加したことは、前述のごとくカフェインによりDNA修復が阻害されたものと考えられる。

以上のようにカフェインはDNA障害をもたらす制癌剤との併用で抗腫瘍効果の増強がみられるが、その効果発現にはカフェインが長時間持続的に接触することが必要であった。

In vivoによる実験ではKyriazisら⁷⁾は膵癌株を用

いてCDDPと1-β-D-Arabino-furanosylcytosine (Ara-C)を併用し、さらにカフェインを200~300mg/kg週1回の腹腔内投与で相乗効果が得られたとしている。また、Mourelatosら⁸⁾もEhrlich腹水癌細胞を用いてCyclophosphamideと併用しカフェイン130μg/gの腹腔内1回投与で相乗効果が得られたとしている。しかし、われわれの行った実験¹⁶⁾では相乗効果を得るためにはCDDP投与後カフェインを頻回に腹腔内投与する必要があると、Kyriazis⁷⁾やMourelatosら⁸⁾の報告と違った結果であった。

臨床例ではKelsenら¹⁷⁾は進行膵癌症例に対してCDDP、Ara-C投与後カフェイン400mg/m²皮下投与したが、効果は得られなかったとしている。しかし、カフェインは前述したように制癌剤投与後持続的に腫瘍と接触することが必要であり、臨床応用するにあたって、全身投与よりは腹腔内投与のような局所投与に適していると思われる。今後、さらにカフェインの投与量、投与時期などの検討が必要と思われるが、腹膜播種性転移を有する胃癌に対するCDDP腹腔内投与においてカフェインを併用することにより、抗腫瘍効果の増強が期待できるものと思われる。

稿を終えるに当たり、STKM-1細胞株を提供して頂いた神奈川県立がんセンターの矢野間俊介氏に心から感謝いたします。

文 献

- 1) Howell SB, Pfele CL, Wung WE et al: Intraperitoneal cisplatin with systemic thiosulfate protection. *Ann Intern Med* 97: 845-851, 1982
- 2) 山本裕司, 天野富薫, 今田敏夫ほか: 腹膜播種性転移を有する胃癌に対する化学療法法の検討. *癌の臨* 38: 987-991, 1992
- 3) 土屋弘行, 富田勝郎: 肉腫細胞に対する制癌剤とカフェイン及びカルシウム拮抗剤の併用効果についての検討. *日癌治療会誌* 22: 1003-1012, 1987
- 4) Pardee AB, Boorstein RJ, Lau CC: Interference with DNA repair mechanism of mammalian cells: Cell cycle dependence. *Japan Sci. Soc. Press, Tokyo/VNU Science Press, Utrecht*, 1983, p287-294
- 5) Van Den Berg HW, Roberts JJ: Inhibition by caffeine of post-replication repair in chinese hamster cells treated with cis platinum (II) diamminedichloride: The effect of platinum binding to template DNA in relation to the size of low molecular weight nascent DNA. *Chem Biol Interact* 12: 375-390, 1976

- 6) Iseki S, Ebina T, Ishida N: Effects of caffeine on Neocarzinostatin-induced inhibition of cell cycle traverse in Hela-S3 cells. *Cancer Res* 40: 3786—3791, 1980
- 7) Kyriazis AP, Kyriazis AA, Yagoda A: Enhanced therapeutic effect of cis-Diamminedichloroplatinum (II) against nude mouse grown human pancreatic adenocarcinoma when combined with 1- β -D-Arabinofuranosylcytosine and caffeine. *Cancer Res* 45: 6083—6087, 1985
- 8) Mourelatos D, Dozi-Vassiliades J, Kotsis A et al: Enhancement of cytogenetic damage and of antineoplastic effect by caffeine in Ehrlich ascites tumor cells treated with Cyclophosphamide in vivo. *Cancer Res* 48: 1129—1131, 1988
- 9) 有村明彦, 中村圭靖, 清水昭男ほか: CA19-9 を産生するヒト胃癌細胞株(STKM-1)の樹立. *Human Cell* 4: 67—70, 1991
- 10) Rosenberg B, Van Camp L, Trosko JE et al: Platinum compounds; a new class of potent antitumor agents. *Nature* 222: 385—386, 1969
- 11) Pascoe JM, Roberts JJ: Interactions between mammalian cell DNA and inorganic platinum compounds. I. DNA interstrand cross-linking and cytotoxic properties of platinum (II) compounds. *Biochem Pharmacol* 23: 1345—1357, 1974
- 12) Eastman A: Characterization of the adducts produced in DNA by cis-diamminedichloroplatinum (II) and cis-dichloro(ethylenediamine) platinum (II). *Biochemistry* 22: 3927—3933, 1983
- 13) Zwelling LA, Anderson T, Kohn KW: DNA-protein and DNA interstrand cross-linking by cis and trans-platinum (II) diamminedichloride in L1210 mouse leukemia cells and relation to cytotoxicity. *Cancer Res* 39: 365—369, 1979
- 14) Timson J: Caffeine. *Mutat Res* 47: 1—52, 1977
- 15) Turnbull D, Popescu NC, Dipaolo JA et al: Cis-platinum (II) diamminedichloride caused mutation, transformation and sister-chromatid exchanges in cultured mammalian cells. *Mutat Res* 66: 267—275, 1979
- 16) 山本裕司, 天野富薫, 今田敏夫ほか: 腹膜播種に対する Caffeine 併用 CDDP 腹腔内投与に関する実験的研究. *癌と治療* 18: 1825—1831, 1991
- 17) Kelsen D, Hudis C, Niedzwiecki D et al: A phase III comparison trial of streptozotocin, mitomycin, and 5-fluorouracil with cisplatin, cytosine arabinoside, and caffeine in patients with advanced pancreatic carcinoma. *Cancer* 68: 965—969, 1991

The Concomitant Effects of Cis-diamminedichloroplatinum and Caffeine on the Proliferation and Chromosomal Changes

Yuji Yamamoto, Tomishige Amano, Toshio Imada, Norio Aoyama, Hiroharu Suzuki, Toshitaka Takehana, Yasushi Rino, Makoto Takahashi and Akihiko Matsumoto
First Department of Surgery, Yokohama City University School of Medicine

The antitumor activity of concomitant Cis-diamminedichloroplatinum (CDDP) and caffeine treatment and its chromosomal effects were studied using by a human gastric cancer cell line, STKM-1. The growth rate was 57% after 3 hours of treatment with CDDP (2 μ g/ml), but it was reduced to 23% and 9.3% respectively by incubation with 1 mM and 2 mM caffeine following treatment with CDDP. Thus, the antitumor effect of CDDP was enhanced by caffeine. The incidence of gaps or breaks in the chromosomes after treatment with CDDP (2 μ g/ml) was 1.816 ± 1.509 /cell and the incidence of exchange was 0.184 ± 0.565 /cell. When the cells were incubated with 1 mM caffeine for 24 hours beginning just after CDDP treatment, the incidence of gaps or breaks increased to 4.206 ± 3.162 /cell and that of exchanges to 0.760 ± 0.938 /cell. The same results were obtained by incubation with caffeine for either 24 or 48 hours after CDDP treatment. These findings indicate that caffeine may inhibit DNA repair, and should enhance antitumor activity when used concomitantly with CDDP in the treatment of gastric cancer.

Reprint requests: Yuji Yamamoto First Department of Surgery, Yokohama City University School of Medicine
3-46 Urafune-cho, Minami-ku, Yokohama, 232 JAPAN