

アドリアマイシン耐性細胞の酸素呼吸

川崎祥二 野村貴子¹⁾ 松浦順子¹⁾ 佐々木順造¹⁾ 高献書²⁾
浅海淳一²⁾ 西川光治²⁾ 平木祥夫²⁾ 内海耕慥³⁾

要 約

エールリッヒ腹水癌細胞を用いアドリアマイシンに対する耐性細胞(ADR耐性細胞)を樹立した。電子顕微鏡を用い撮影写真から細胞質当たりのミトコンドリア(MT)の割合を面積比で求めた。親株に比較して1 $\mu\text{g/ml}$ ADR耐性細胞では1.32倍, 10 $\mu\text{g/ml}$ ADR耐性細胞では1.47倍であった。これらの細胞の呼吸を測定した。耐性細胞の内発呼吸は親株に比較して増加していた。1 $\mu\text{g/ml}$ ADR耐性細胞では1.45倍, 10 $\mu\text{g/ml}$ ADR耐性細胞では1.49倍であり, MTの増加量とほぼ同じ割合であった。これらのことから, 細胞が耐性になるとエネルギー消費が高まるために細胞内MTが増加し, その結果呼吸(酸素消費)が増加することが推察された。

キーワード: アドリアマイシン, 多剤耐性, 酸素消費, 呼吸, ミトコンドリア

緒 言

癌に化学療法が行われると制癌剤に対し耐性を獲得した細胞(多剤耐性細胞)の出現することが経験されている。癌細胞が薬剤に耐性を獲得する機構としてはいくつかあげられている^{1,2)}。その一つに遺伝子MDR 1の発現により細胞膜上にp-glycoprotein (PG)の排泄ポンプが多く発現し, 多剤耐性を示す⁴⁻⁵⁾。PGはATP-ase活性を持ち, 細胞内エネルギーを使用し, 細胞内に入ってくる化合物を細胞外に汲み出している⁶⁾。したがって, 細胞がMDR 1を発現し耐性を獲得した細胞はその野生株に比しより多くのエネルギーを消費することが考えられる。

一方, Rhodamine 123 (Rho123)は細胞内ミトコンドリア(MT)の膜電位の大きさに応じてMT内に取り込むと考えられている蛍光化合物である⁷⁾。2 $\mu\text{g/ml}$ ADR耐性細胞ではRho123の細胞内への取り込みが9%に減少する⁷⁾。しかしながら, セファランチン(CP)(PGの作用を抑制す

る化合物)のRho123の取り込みに対する効果を観察すると, Rho123の取り込みはCPにより親株では約1.2倍になるが, 耐性細胞では親株に比し約3倍に増加する⁸⁾。このことから耐性細胞ではMTが活発に働くか, 細胞内でのMT数が増加していることが推察される。

本研究ではADRに耐性になった細胞のMTの機能と形態を観察した。MTの機能としては細胞の酸素消費量を測定し, 形態の変化は電子顕微鏡を用いMTの細胞内状態を検討した。

材料及び方法

細胞: エールリッヒ腹水癌細胞(EATC)はグルベッコ変法イーグル培地に通常量のペニシリン, ストレプトマイシンを加え, 10%仔牛血清を加えたものを使用した。細胞は5% CO₂+95% airのCO₂インキュベーターで培養した。当研究室で樹立したADR耐性細胞は, 各濃度のADRを含む培養液で増殖する細胞で, その濃度は0.2, 0.5,

岡山大学医療技術短期大学部診療放射線技術学科

1) 岡山大学医学部第1解剖学教室

2) 岡山大学医学部放射線医学教室

3) 倉敷成人病センター

1.0, 2.0, 10.0 $\mu\text{g/ml}$ であった⁹⁾。

酸素消費：細胞の呼吸は反応液の酸素消費から測定した。反応液は10mM glucoseを加えた磷酸緩衝液 2 ml で37°Cである。反応液に細胞懸濁液を加え、攪拌しながら酸素消費量を測定した。添加した薬剤の濃度は ADR (10 $\mu\text{g/ml}$), 2, 4-DNP ($2 \times 10^{-4}\text{M}$), CP (10 $\mu\text{g/ml}$) であった。

MT の測定：MT の観察は電子顕微鏡で行った。標本は培養細胞を遠心し、通常の方法に従って、固定染色を行い、8,300倍で写真撮影した後24,380倍とし、面積計を用い細胞質の面積(核面積を除く) 1,000 μ^2 当たりの MT の面積で表した。

結 果

1) ADR 耐性細胞の呼吸

図1に親株と10.0 $\mu\text{g/ml}$ 耐性細胞の酸素呼吸量を示している。反応液に細胞懸濁液を加えると、内発呼吸が観察される。10⁶細胞/mlの酸素消費量は親株では2.57 $\mu\text{moles/ml}$ である。耐性細胞では酸素消費量はどの濃度でも増加していた(図1, 表1)。ADRを添加すると親株ではほとんど変わらないが、5.0, 10.0 $\mu\text{g/ml}$ 耐性細胞では酸素消費量は約10%増加した。反応液に2,4-DNPを添加すると酸素消費が増加するが、耐性細胞の増加が大きい(表1)。CPを添加すると親株では酸素消費が著しく低下するが1.0, 10.0 $\mu\text{g/ml}$ 耐性細胞では少し低下する。他の耐性細胞ではむしろ増加した(表1)。

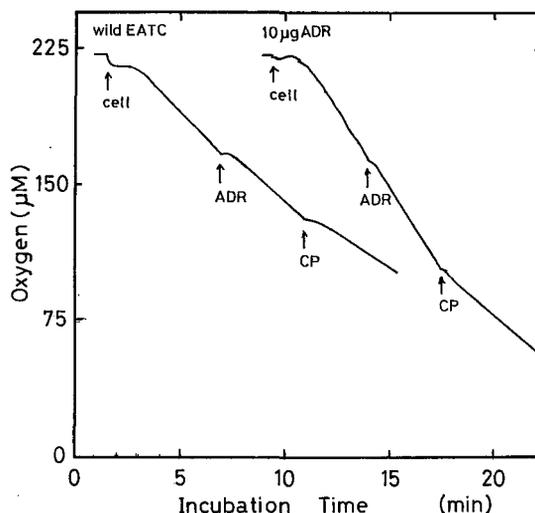


図1 エールリッヒ腹水癌細胞の呼吸

反応液は10mM glucoseを加えた磷酸緩衝液 2 ml で37°Cである。反応液に細胞懸濁液を加え、攪拌しながら酸素消費量を測定した。添加した薬剤の濃度は ADR (10 $\mu\text{g/ml}$), CP (10 $\mu\text{g/ml}$) であった。wild EATC は親株, 10 μg ADR は10 $\mu\text{g/ml}$ ADR 耐性細胞を示す。

2) ADR 耐性細胞の MT

電子顕微鏡で細胞内の MT を観察すると親株に比し ADR 耐性細胞では小形の MT が多かった(data は示していない)。MT の数を撮影した写真(20視野)から1,000 μ^2 当たりの MT の面積で表した(表2)。親株では39.3, ADR 耐性細胞(1.0 $\mu\text{g/ml}$) では51.8 μ^2 で親株の MT に比較すると1.32倍, ADR 耐性細胞(10.0 $\mu\text{g/ml}$) では57.7 μ^2

表1 ADR 耐性細胞の酸素消費

		Wild EATC	ADR 耐性細胞 ($\mu\text{g/ml}$)				
			0.5	1.0	2.0	5.0	10.0
内発呼吸	酸素消費量 (A)	2.57	3.31	3.73	4.67	3.13	3.84
	呼吸比 (耐性細胞/親株)	1.0	1.29	1.45	1.81	1.22	1.49
ADR 添加時	酸素消費量 (B)	2.45	3.33	3.66	4.82	3.45	4.16
	呼吸比 (B/A)	0.95	1.01	0.98	1.03	1.10	1.08
2, 4-DNP 添加時	酸素消費量 (C)	5.58	10.55	8.55	11.00	9.71	8.83
	呼吸比 (C/A)	2.15	3.19	2.29	2.36	3.10	2.30
CEP 添加時	酸素消費量 (D)	1.54	4.11	4.52	6.13	3.38	3.68
	呼吸比 (D/A)	0.59	1.24	1.21	1.31	1.08	0.95

酸素消費量： $\mu\text{moles/min}/10^6\text{cells/ml}$

であり親株細胞に比し1.47倍で、細胞がADRに耐性になるほど細胞当たりのMTの面積が増加した。

表2 ADR耐性細胞の細胞内ミトコンドリア数

細胞の種類	ミトコンドリアの面積 ($\mu^2/1,000\mu^2$) (%)
親株 EATC	39.3 (100)
1.0 $\mu\text{g/ml}$ ADR耐性 EATC	51.8 (132)
10.0 $\mu\text{g/ml}$ ADR耐性 EATC	57.7 (147)

考 察

細胞が薬剤耐性を獲得する機序としては①薬剤の細胞内への流入の抑制、②細胞内に流入した薬剤を細胞外に排泄する機構の増強、③細胞内に入った薬剤の解毒機構の増強、④薬剤による細胞内損傷の回復能力の増強等が考えられている。EATCから樹立したADR耐性細胞は上記②の排泄機能が増強していた⁶⁾。排泄能力が増強することは、多剤耐性遺伝子(MDR)やそれに関連した遺伝子(MRP)を発現するようになる⁷⁾。排泄ポンプの役割をする蛋白質としては180kDaの糖蛋白質でATP-ase活性を示す。ADR耐性細胞でこの糖蛋白質の活性が増加していることは、細胞の周囲にADRが存在すると(培養液にADRを添加すると)細胞内に流入してくるADRを排泄する機能が働いている。この機能が働くことと細胞内のエネルギー(ATP)を消費することである。従って、ATPを産生する細胞内小器官であるMTが耐性細胞では発達していることが考えられた。

そこで、細胞の呼吸(酸素消費)量を測定すると、内発呼吸では親株に比較して1 $\mu\text{g/ml}$ ADR耐性細胞では1.45倍、10 $\mu\text{g/ml}$ ADR耐性細胞では1.49倍であり(図1, 表1), MTの増加量(表2)とほぼ同じであった。

その上、反応液にADRを添加すると親株ではほとんど変わらないが、耐性度の大きい5 $\mu\text{g/ml}$ 、10 $\mu\text{g/ml}$ ADR耐性細胞では呼吸量が約10%増加する。これは細胞周囲にADRが加えられると、排泄ポンプの活動がより盛んになるためエネルギー補給のためにMTが活動すると考えられ

る。

Rho123はMTの膜電位差に応じて特異的にMTに取り込まれる。2 $\mu\text{g/ml}$ ADR耐性細胞ではRho123の取り込みは親株に比し9%である。CP処理により親株では20%増加するが、耐性細胞では親株(CP存在下)に比し約3倍多くなる⁸⁾。この事実は、多量のMTが耐性細胞内に存在することによって考えられたが、電子顕微鏡の観察では約1.45-1.49倍のMT量の増加であり、Rho123の取り込み量の増加はMT量の増加だけからでは説明できない。CPの添加により親株では内発呼吸に比し著しく低下するが、2 $\mu\text{g/ml}$ ADR耐性細胞ではむしろ増加している(表2)。このことがRho123の取り込み量の増加の原因になっているの可能性がある。また、MT内の電子伝達系でATP合成過程の共役阻害剤である2,4-DNPの添加では耐性細胞の呼吸比(2,4-DNP添加時呼吸/内発呼吸)は親株の増加に比し大きいことから、今後MTのこれらの阻害剤に対する反応の違いが何に起因しているかを詳細に検討する必要がある。

文 献

- 1) 和田守正, 長谷川周二, 河野公俊, 桑野信彦: 多剤耐性. 癌と化療21巻: 936-944, 1994.
- 2) 鈴木日出夫: 制癌剤の耐性機構とその克服をめざして. 蛋白質 核酸 酵素33巻: 400-406, 1988.
- 3) Thorgeirsson S. S., Huber B. E., Sorreli A., Foji A. T., Pastan I., Gottesman M. M.: Expression of the multidrug-resistant gene in hepatocarcinogenesis and regenerating rat liver. Science 236: 1120-1122, 1987.
- 4) Foji A. T., Ueda K., Slamon D. J., Poplack D. G., Gottesman M. M., Pastan I.: Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 265-269, 1987.
- 5) 植田和光, 駒野 徹: 抗癌剤耐性遺伝子MDR 1. 癌の化療15巻: 2858-2862, 1988.
- 6) 鶴尾 隆, 内藤幹彦, 遊佐敬介: 薬剤耐性の分子機構とその生理機能. 細胞工学9巻: 89-95, 1990.
- 7) Johnson L. V., Walsh M. L., Bockus B. L., Chen L. B.: Monitoring of relative mitochondrial membrane potential in living cells by fluorescence microscopy. J Cell Biol 88: 526-535, 1981.
- 8) 岡崎良夫: Ehrlich 腹水癌細胞および adriamycin 耐

性細胞の Rhodamine 123 Uptake を指標としたミト
コンドリア活性. 岡山医学会誌102: 779-788, 1989.

耐性とその克服に関する研究. 岡山医学会誌102: 679-
690, 1989.

9) 井上信雄: Ehrlich 腹水癌細胞における adriamycin

Oxygen uptake of adriamycin resistant cells of Ehrlich ascites tumor

Shoji KAWASAKI, Takako NOMURA¹⁾, Junko MATSUURA¹⁾, Junzo SASAKI¹⁾, Xian Shu GAO²⁾,
Jun-ichi ASAUMI²⁾, Kouji NISHIKAWA²⁾, Yoshio HIRAKI²⁾, Kozo UTSUMI³⁾

Abstract

Adriamycin-resistant cells of Ehrlich ascites tumor cells were established in our laboratory. Using electron microscope, the area of mitochondria(MT) per cytoplasm of ADR-resistant cells were measured with planimeter. The values of wild-type cells, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ADR-resistant cells and 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ADR-resistant cells were 39.3, 51.8 and 57.7 μ^2 per 1,000 μ^2 of cytoplasm, respectively. Oxygen consumption of 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ADR-resistant cells and 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ADR-resistant cells were 1.45-fold and 1.49-fold compared to that of wild-type cells, respectively. These results indicate that ADR-resistant cells require more energy to work efflux pump than wild-type cells.

Key words : adriamycin, multidrugs resistant, oxygen uptake, respiration, mitochondria

School of Health Sciences Okayama University

1) Department of 1st Anatomy, Okayama University Medical School

2) Department of Radiology, Okayama University Medical School

3) Institute of Medical Science, Center of Adult Disease, Kurashiki