

原 著

レスベラトロール処理細胞における抗腫瘍薬の効果

菅原 栄紀, 半田佳奈絵, 任 彰堯, 細野 雅祐, 立田 岳生, 仁田 一雄

Cytotoxic effect of anti-cancer drugs in resveratrol-treated cells

Shigeki SUGAWARA, Kanae HANDA, Im CHANGHUN, Masahiro HOSONO, Takeo TATSUTA, and Kazuo NITTA

(Received November 20, 2012)

Chemo-resistance to anti-cancer drugs is a major obstacle in efforts to develop a successful treatment of cancer. Resveratrol (RSV) facilitates the cellular uptake of doxorubicin through an induced down-regulation of multidrug resistance-associated protein-1 (MRP1) expression. We studied whether RSV enhances the cytotoxic effect of vinblastine, vincristine, irinotecan, and etoposide in MRP1-expressing Burkitt's lymphoma Raji cells. Treatment with RSV caused decrease of cell viability in a time- and dose-dependent manner, and down-regulation of MRP1 expression in Raji cells. The cytotoxic effects of vinblastine, vincristine, and etoposide increased in RSV-pretreated Raji cells, but the effect of irinotecan did not change in the cells. These results indicate that RSV enhances the cellular uptake of vinblastine, vincristine, and etoposide in Raji cells.

Key words — multidrug resistance-associated protein-1; resveratrol; anti-cancer drug

緒 論

スチルベン系化合物でポリフェノールの一種であるレスベラトロール (resveratrol, RSV; 3, 5, 4'-trans-trihydroxystilbene) は, ブドウの茎や果皮に多く含まれる抗酸化物質として知られており,¹⁾ 現在, RSV による寿命延長作用の研究が行なわれている. 2006 年にはヒトと同じ哺乳類であるマウスの寿命を延長させるとの成果が発表され, さらに長寿遺伝子として知られているサーチュイン (sirtuin) がコードする NAD⁺依存性脱アセチル化酵素活性をもつタンパク質の活性を上昇させることも報告され, 注目を集めている.^{2,3)}

2010 年に Kweon らは, がんの多剤耐性の原因の一つと考えられている薬物排出型 ABC transporter である multidrug resistance-associated protein-1 (MRP1) を高発現しているドキソルビシン耐性ヒト急性骨髄性白血病細胞を RSV で処理することにより, MRP1 の発現量が減少し, ドキソルビシン抵抗性を解除し得ることを示した.⁴⁾ しかし, RSV が他のがん細胞に対して同様の効果を有するか否かについては不明である. バーキットリンパ腫は, 非ホジキンリンパ腫の中でも悪性度の高い腫瘍である. 症状としては首, 脇の下, 足の付け根などのリンパ節の多い部位に痛みを伴わないしこりができる. ま

た, 治療はシクロホスファミド, アドリアマイシン, ビンクリスチン, プレドニゾロンの 4 剤での CHOP 療法が行われているが, いずれの薬剤も高濃度で使用することが必要である. また, ヒトバーキットリンパ腫 Raji 細胞において, MRP1 が発現していることが知られているので,⁵⁾ Raji 細胞の薬剤への抵抗性はこの分子に起因すると推測される.

本論文では, RSV が Raji 細胞に発現している MRP1 の発現量を減少させることができれば, 低濃度の薬剤で細胞死を誘導することができると考え, ビンカルカロイド系に属し, 臨床では悪性リンパ腫の治療に使われるビンブラスチン, 微小管の重合反応を阻害し, 小児がんの治療に使われるビンクリスチン, トポイソメラーゼ I 阻害薬で肺がん・非ホジキンリンパ腫の治療に使われるイリノテカンおよびトポイソメラーゼ II 阻害作用により, ホジキンリンパ腫の再発に対するサルベージ (救援) 療法に使われるエトポシドを用いて, RSV との併用による Raji 細胞への細胞死誘導効果を検討した.

実験材料および実験方法

1. 実験材料

Raji 細胞は東北大学加齢医学研究所医用細胞資源センターより供与されたものを用いた. この細

胞を, 10%非働化ウシ胎児血清を含む RPMI 1640 培地 (日水製薬社製, 東京) 中で, 37°C, 5% CO₂ 存在下で培養した。

2. レスベラトロールによる細胞増殖抑制

Raji (5×10⁵ 個/well) を 48 well プレートに播種した。その後, RSV (和光純薬工業社製, 大阪) の終濃度が 0, 12.5, 25, 50 および 100 μM になるように加え, 37°C, 5% CO₂ 存在下で, 24, 48 および 72 時間培養し, 生存率をトリパンプルー色素排除試験により求めた。

3. レスベラトロール処理による MRP1 発現量の変化

Raji (5×10⁵ 個/well) を 48 well プレートに播種した。その後, RSV の終濃度が 0, 12.5, 25, 50 および 100 μM になるように加え, 37°C, 5% CO₂ 存在下で, 24 時間培養した。培養後, TRIzol (Invitrogen 社製, Carlsbad, CA, USA) 200 μL に懸濁後, purelink RNA mini kit (Invitrogen 社製) を用いて total RNA を抽出した。RNA 濃度は, GeneQuant100 (GE 社製, Uppsala, Sweden) を用いて測定し, 1 μg を用いて VILO cDNA synthesis kit (Invitrogen 社製) で cDNA を合成した。遺伝子発現量は, TaqMan probe 法を利用して以下の配列特異的プライマー MRP1 (forward: 5' CCATGTGGGAAAACACATCTT3'; reverse: 5' CTGTGCGTGACCAAGATCC3'), β-actin (forward: 5' CCAACCGCGAGAAGATGA3'; reverse: 5' CCAGAGGCGTACAGGGATAG3') およびプライマーに応じた universal probe (MRP1: #89, β-actin: #64) 用い, Light Cycler[®] 480 (Roche 社製, Indianapolis, IN) で測定した。定量を行うための検量線は任意の cDNA を 10~10⁴ 倍に希釈したものを template として測定し, 得られた数値を基に検量線を作成した。

4. レスベラトロールおよび抗腫瘍薬による細胞増殖抑制

Raji (5×10⁴ 個/well) を 48 well プレートに播種し, RSV を終濃度 12.5 μM になるように加え, 37°C, 5% CO₂ 存在下で 24 時間を培養した。その後, 培養液に直接ビンブラスチン (Sigma 社製, St. Louis, MO, USA), イリノテカン (Sigma 社製), ビンクリスチン (Sigma 社製) およびエトポシド (Sigma 社製) の終濃度がそれぞれ 25 ng/mL, 5 μM, 10 ng/mL, 100 ng/mL になるように加え, 再度 48 時間培養し, 培養後トリパンプルー色素排

除試験により生存率を求めた。

5. トリパンプルー色素排除試験

Raji 細胞を各時間および各濃度で処理後, 0.4% トリパンプルー溶液 (5 μL) (Bio-Rad 社製, Hercules, CA, USA) と細胞懸濁液 (5 μL) を混和し, 全量 (10 μL) を TC10™ 全自動セルカウンター専用スライド (Bio-Rad 社製) にロード後, TC10™ 全自動セルカウンター (Bio-Rad 社製) にて生細胞数と死細胞数を計測し, 生存率を算出した。

6. 統計学的処理

実験結果は, 平均値と標準誤差で示した。有意差検定は, Student's t 検定により行い, 危険率 5% 以下を有意差ありと判定した。

結 果

1. レスベラトロールによる Raji 細胞の生存率の変化

RSV が, Raji 細胞に対して処理濃度および処理時間依存的に細胞死を誘導するか否かを検討した。RSV の処理濃度を 0, 12.5, 25, 50, 100 μM および処理時間を 24, 48, 72 時間とし, 細胞生存率の変化を調べた。その結果, RSV 処理により, 濃度および時間依存的に Raji 細胞の生存率が低下し, 25 μM 以上の処理により, 濃度依存的に有意に生存率が低下した。RSV 12.5 μM で 24 時間処理した Raji 細胞の生存率は 95% で, 未処理細胞 (97%) とほぼ同じであった (Fig. 1)。

2. レスベラトロールによる MRP1 発現量の変化

RSV 処理により, Raji 細胞に発現している MRP1 量が変化するか否かを定量 RT-PCR を用い

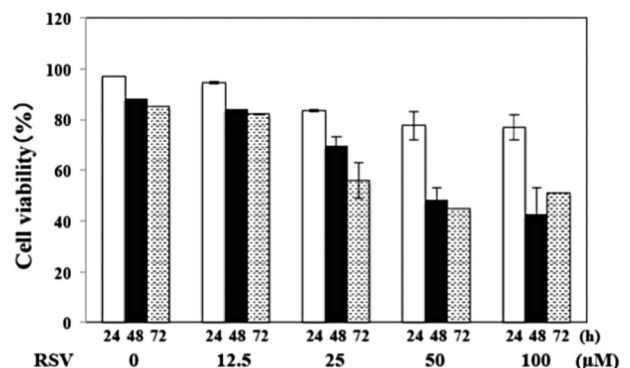


Fig. 1. Cytotoxic effect of RSV in Raji cells

Raji cells were treated with resveratrol (0, 12.5, 25, 50 and 100 μM) at 37°C for 24 (open bars), 48 (solid bars) and 72 h (dotted bars). Cell viability was measured by trypan blue dye exclusion assay. Each value represents the mean ± S.E. for three independent experiments.

て調べた. MRP1 発現量は, RSV 処理 12.5 μM では 23%, 25 μM では 53%と有意に低下した. しかし, 未処理細胞よりも, 50 μM 処理では 44%, 100 μM 処理では 25%と, MRP1 発現は有意に低下す

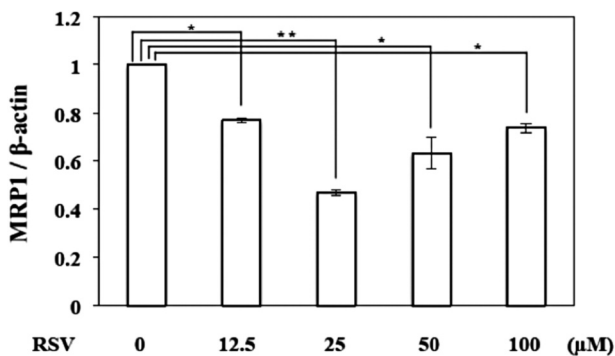


Fig. 2. Alteration of MRP1 in RSV-treated Raji cells

Raji cells were pretreated with RSV (0, 12.5, 25, 50 and 100 μM) at 37°C for 24 h. Total RNAs, extracted from RSV-untreated and -treated cells, were analyzed by qRT-PCR using MRP1 and β -actin specific primers. β -Actin was used as the internal control. Results are presented by one fold increase, and each value represents the mean \pm S.E. for at least two independent experiments. *, $p < 0.05$ versus control. **, $p < 0.01$ versus control.

るのだが, 濃度が高くなるにつれて MRP1 発現量の低下が減弱する結果が得られた (Fig. 2). Fig. 1 および 2 の結果から, 50 μM 処理により MRP1 発現量は最も低下するが, この濃度では細胞生存率が未処理細胞より約 14%低下した. そのため, 抗腫瘍薬との併用に用いる RSV 濃度は, 細胞生存率が未処理細胞とほぼ同じレベルで, MRP1 発現量を低下させる 12.5 μM とした.

3. 抗腫瘍薬とレスベラトロール併用による細胞死誘導効果

Fig. 1 および 2 で検討した RSV 濃度および処理時間で, ビンブラスチン, ビンクリスチン, イリノテカン, エトポシドとの併用により, 細胞死誘導効果に変化するか否かを検討した. トリパンブルー色素排除試験の結果から, RSV 12.5 μM では, 未処理 Raji 細胞と比較して有意な生存率の低下は認められず, また, それぞれの抗腫瘍薬単剤処理での生存率は, ビンブラスチンで約 78%, ビンクリスチンで約 74%, イリノテカンで約 82%, エト

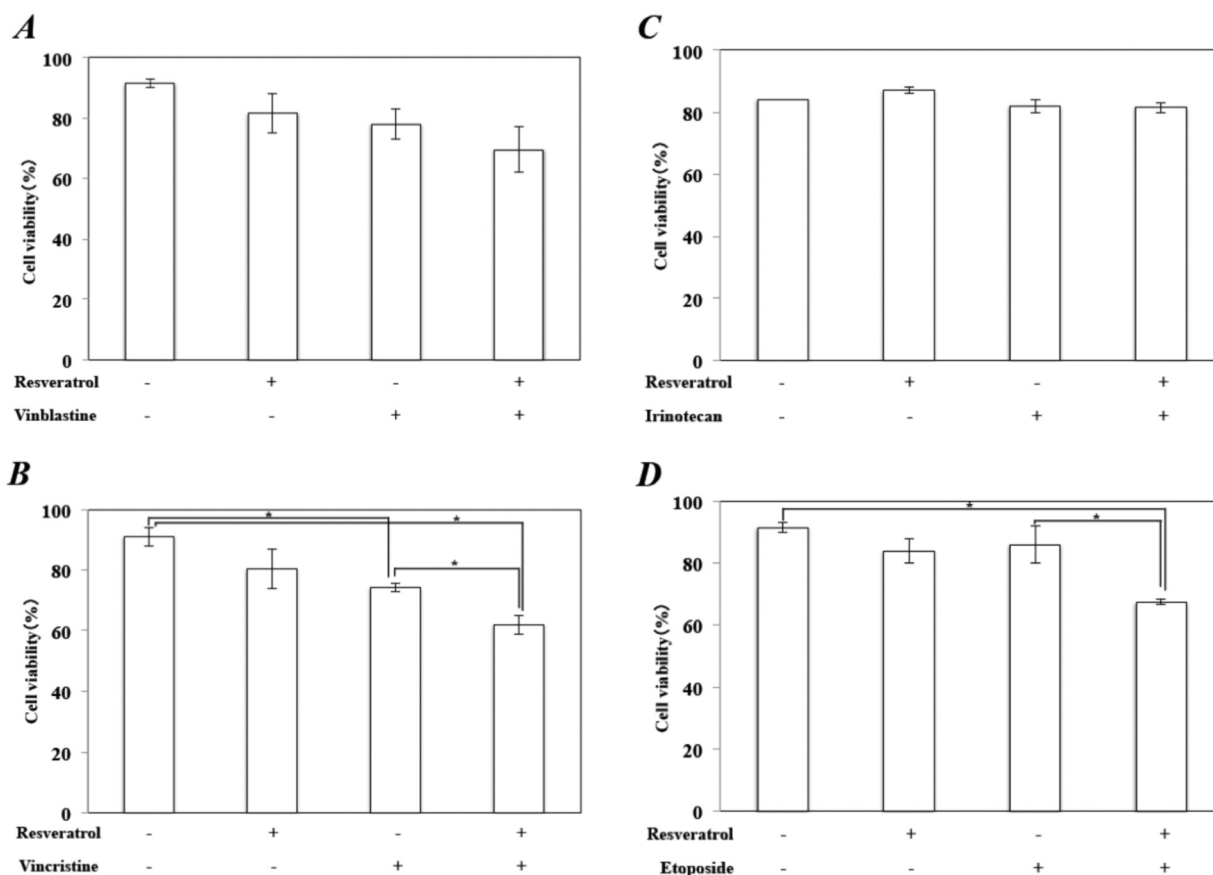


Fig. 3. Cytotoxic effect of anti-cancer drugs in resveratrol-pretreated Raji cells

Raji cells were pretreated with resveratrol (12.5 μM) at 37°C for 24 h. Then, resveratrol-pretreated cells were treated with vinblastine (25 ng/mL) (A), vincristine (10 ng/mL) (B), irinotecan (5 μM) (C), or etoposide (100 ng/mL) (D) at 37°C for 48 h. Cell viability was measured by trypan blue dye exclusion assay. Each value represents the mean \pm S.E. for three independent experiments. *, $p < 0.05$ versus control and anti-cancer drug alone.

ポシドで約 86%となり, ビンクリスチンでのみ有意に生存率が低下した. RSV 前処理後, それぞれの抗腫瘍薬で処理した細胞の生存率は, ビンブラスチンで約 69%, ビンクリスチンで約 62%, イリノテカンで約 81%, エトポシドでは約 67%であった. イリノテカンにおいては, 有意な増強は認められず, ビンブラスチンでは 9%の増強が認められたものの, 有意な差はなかった. 一方, ビンクリスチンでは 12%, エトポシドでは 19%の有意な作用増強が認められた (Fig. 3A-D).

考 察

悪性リンパ腫の治療に使用されているアドリアマイシンに耐性を有した慢性骨髄性白血病細胞は multidrug resistance 1 P-glycoprotein (MDR1 P-gp) を発現するようになり, MDR1 P-gp で特異的に排泄される薬物であるローダミン 123 を細胞外に排泄することが報告されている.⁵⁾ このように, がん細胞の多剤耐性化は, MDR1 P-gp や MRP1 を含む薬物排泄トランスポーターの発現を誘導し, 抗がん剤の細胞外への排泄を促進し, 抗がん剤の効果を減弱させ, 治療効果を低下させることにつながる. 今回の実験から, RSV には, Raji 細胞に対して高濃度あるいは長時間処理により生存率を低下させる効果のあることが示された (Fig. 1). また, 細胞の生存率が大きく変化しない濃度で, MRP1 タンパク質をコードしている MRP1 mRNA 発現量を約 23%減少させることも示された (Fig. 2). MRP1 発現量を 23%減少させることができる RSV の処理条件下で, 抗がん薬の細胞死誘導効果が高まるか否かを検討したところ, RSV とビンブラスチンとの併用では, ビンブラスチン単独処理と比較して生存率が約 9% 低下し, ビンクリスチンとの併用ではビンクリスチン単独処理と比較して約 12% 減少した (Fig. 3A, B). ビンブラスチンとビンクリスチンは, 共に MDR1 P-gp および MRP1 で排泄されると報告されているので,^{6,7)} ビンクリスチンとの併用で効果が高くなるのは, MRP1 発現量の低下に伴ってビンクリスチンの排泄が低下したと考えられる. すなわち, RSV は MDR1 P-gp の発現には影響を及ぼさない可能性があることを示している. RSV と併用しても効果のなかったイリノテカンは (Fig. 3C), ABC 輸送体に属する ABCG2 により排泄されることが報告さ

れている.⁸⁾ そのため, RSV と併用しても RSV が ABCG2 の発現に影響を及ぼさない可能性があり, 併用効果がないと考えられる. RSV との併用により, 細胞死誘導効果が約 15%増加したエトポシドは (Fig. 3D), MRP1 で排泄されることが知られており,⁷⁾ 併用により細胞死誘導効果が有意に増加したと考えられる. これまでに, MRP1 発現を抑制することが報告されているスチルベン化合物は RSV だけであるが, 同じスチルベン化合物に属して構造が非常に似ているピセアタンノール (piceatannol, 3,3',4,5'-*trans*-tetrahydroxystilbene) も, RSV と同様に MRP1 発現を抑制する可能性がある. しかし, RSV がどのような機序で MRP1 発現を抑制するのかについてはまだ詳細な報告はなく, また同じスチルベン化合物でも RSV と同様の効果を示すか否かは不明である.

今後, RSV の MRP1 発現抑制機構およびがん細胞の生存率に影響を及ぼさない RSV の適正濃度と効果的な MRP1 発現抑制のための RSV 適正濃度を確立することにより, バーキットリンパ腫細胞のみならず MRP1 を発現しているあらゆるがん細胞に対して, 抗がん剤の効果の増強あるいは大量の抗がん剤使用により引き起こされる骨髄抑制などの副作用の低減につながることを期待したい.

REFERENCES

- 1) Murias M., Jäger W., Handler N., Erker T., Horvath Z., Szekeres T., Nohl H., Gille L., *Biochem. Pharmacol.*, **69**, 903–912 (2005).
- 2) Baur J. A., Pearson K. J., Price N.L., Jamieson H.A., Lerin C., Kalra A., Prabhu V. V., Allard J. S., Lopez-Lluch G., Lewis K., Pistell P. J., Poosala S., Becker K. G., Boss O., Gwinn D., Wang M., Ramaswamy S., Fishbein K.W., Spencer R. G., Lakatta E.G., Le Couteur D., Shaw R. J., Navas P., Puigserver P., Ingram D. K., de Cabo R., Sinclair D. A., *Nature*, **444**, 337–342 (2006).
- 3) De Boer V. C., de Goffau M. C., Arts I. C., Hollman P. C., Keijer J., *Mech. Ageing. Dev.*, **127**, 618–627 (2006).
- 4) Kweon S. H., Song J. H., Kim T. S., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **395**, 104–110 (2010).
- 5) Sugawara S., Hosono M., Ogawa Y., Takayanagi M., Nitta K., *Biol. Pharm. Bull.*, **28**, 434–441 (2005).

-
- 6) Kuteykin T. K., Luna T. C., Ambroziak K., Löscher W., *Br. J. Pharmacol.*, **160**, 1453–1463 (2010).
- 7) Borst P., Evers R., Kool M., Wijnholds J., *J. Natl. Cancer Inst.*, **92**, 1295–1302 (2000).
- 8) Arnaud O., Boumendjel A., Gèze A., Honorat M., Matera E. L., Guitton J., Stein W. D., Bates S. E., Falson P., Dumontet C., Di Pietro A., Payen L., *Eur. J. Cancer*, **47**, 640–648 (2011).