

Raji および K562 細胞に対するナマズ卵レクチンと抗腫瘍薬との併用効果

菅原 栄紀, 新谷 香絵, 細野 雅祐, 立田 岳生, 仁田 一雄

Combination Effect of Catfish Lectin and Anti-cancer Drugs on Raji and K562 Cells

Shigeki SUGAWARA, Kae ARAYA, Masahiro HOSONO, Takeo TATSUTA, and Kazuo NITTA

(Received November 20, 2011)

Silurus asotus (catfish) lectin (SAL) is a 32 kDa protein belonging to the rhamnose-binding lectin (RBL) family. SAL also recognizes galactosyl α -linked carbohydrate chains of not only glycoproteins but also glycosphingolipids, especially globotriaosylceramide (Gb3). In the previous study, we revealed that SAL increased uptake of doxorubicin (Dox) into Raji cells, and consequently enhanced cytotoxic effect of Dox. We studied whether SAL also enhances the cytotoxic effect of vinblastine and irinotecan in Gb3-expressing Raji or Gb3-negative K562 cells. Treatment of Raji cells with vinblastine (2.5 μ g/mL) and irinotecan (5 μ M) for 48 h caused decrease of cell viability to 69% and 68%, respectively. Although cytotoxic effects of vinblastine and irinotecan were significantly increased in SAL-pretreated Raji cells, only a slight increase was observed in SAL-pretreated K562 cells with vinblastine. These results indicate that SAL enhances the cytotoxic effect of vinblastine or irinotecan in Raji but not K562 cells.

Key words — Rhamnose-binding lectin; globotriaosylceramide; anti-cancer drug

緒 論

糖鎖の構造を認識して結合するレクチンは、あらゆる動物種に存在しており、近年では第3の生命鎖として考えられている糖鎖の受け手として注目が集まっている。動物レクチンは感染・生体防御・受精・細胞分化・細胞接着への関与が示唆されており、その生物学的機能に関心が寄せられている。¹⁾ 構造上の特徴である糖結合ドメイン (carbohydrate recognition domain, CRD) の類似性から、動物レクチンは、主なものとして活性発現にカルシウムイオンを必要とするC型レクチンと β -ガラクトシド結合糖鎖を認識するガレクチン類などが知られている。^{1,2)} 魚卵より単離・精製されたレクチンは、上記のレクチンとは異なりL-ラムノースと α -ガラクトシドに対して高い親和性を有することが示されており、ラムノース結合性レクチン (rhamnose-binding lectin, RBL) と呼ばれている。ナマズ卵より得られたRBLである *Silurus asotus* lectin (SAL) は、ガラクトシル α 結合糖鎖を有する分子を認識し、特に糖脂質の globotriaosylceramide (Gb3) に結合することが明らかにされている。³⁻⁵⁾ Gb3を高発現しているパーキットリン腫 Raji 細胞への SAL の結合は、multidrug resistance 1 P-glycoprotein (MDR1 P-gp) の活性化を介してホス

ファチジルセリン (PS) の細胞膜内層側から外層側への移行を引き起こし、⁶⁾ また、カリウムチャネル Kv1.3 の活性化を介して、細胞内から細胞外へのカリウムイオン放出が起こり、同時に水分子が流出するため、腫瘍細胞の縮小が引き起こされる。⁵⁾ しかし、Gb3を発現していない K562 細胞ではこのような現象は見られないことから、これらの現象は SAL の Gb3 への結合が引き金となって引き起こされていることを示している。⁵⁾ 加えて、SAL は Raji 細胞に対してヨウ化プロピジウム (PI) の細胞内への取り込みを増加させるが、DNA断片化などのアポトーシス時に見られる変化を引き起こさないことも示している。⁵⁾ これまでに、Raji 細胞には多剤耐性に重要な役割を演じている ATP-binding cassette (ABC) 輸送体に属する MDR1 P-gp および multidrug resistance associated protein 1 (MRP1) が発現していることが知られていることから、抗腫瘍薬に対する感受性が低いと考えられた。一方、SAL と抗腫瘍薬であるアドリアマイシンとの併用により、Raji 細胞内へのアドリアマイシンの取り込み量が増加し、低用量のアドリアマイシンで細胞死を誘導することを報告している。^{6,7)}

本論文では、SAL とアドリアマイシンとの併用で認められる現象が、Raji および慢性骨髄性白血病細胞株 K562 細胞と他の薬剤との組み合わせでも

起こるか否かを, ビンカア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およびトポイソメラーゼ阻害薬で肺癌および非ホジキンリンパ腫の治療に使われるイリノテカンを使用することで薬剤間の作用の違いも合わせて検討した.

実験材料および実験方法

1. 実験材料

SAL は, 既報の方法により精製した.³⁾ Raji 細胞および K562 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. これらの細胞を, 10%非働化ウシ胎児血清を含む RPMI1640 培地 (日水製薬社製, 東京) を用い, 37°C, 5% CO₂ 存在下で培養した.

2. Total RNA の抽出および cDNA の合成

Raji 細胞および K562 細胞 (1×10⁶ 個) を TRIzol (Invitrogen 社製, Carlsbad, CA) 200 μL に懸濁後, purelink RNAmimi 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 合成キット (Invitrogen 社製) で cDNA を合成した. MRP1, MRP4, MRP5, MDR1 および GAPDH の遺伝子発現は, 合成した cDNA を用いて遺伝子特異的プライマー, MRP1 (forward: 5' AGTGGAAC CCCTCTCTGTTTAAG 3'; reverse 5' CCTGATAC GTCTTGGTCTTCATC 3'), MRP4 (forward: 5' TGATGAGCCGTATGTTTTGC 3'; reverse 5' CTT CGGAACGGACTTGACAT 3'), MRP5 (forward: 5' AGAGGTGACCTTTGAGAACGCA 3'; reverse 5' CTCCAGATAACTCCACCAGACGG 3'), MDR1 (forward: 5' GCCTGGCAGCTGGAAGACAAATAC 3'; reverse 5' ATGGGAACCCCTCTCTGTTTAAG 3'), GAPDH (forward: 5' ACCACAGTCCATGCC ATCAC 3'; reverse 5' TCCACCACCCTGTTGCTG TA3'). を利用し, 94°C で 30 秒, 55°C で 30 秒, 72°C で 30 秒を 35 サイクル行い, 増幅産物 (MRP1: 552 bp, MRP4: 245 bp, MRP5: 173 bp, MDR1: 253 bp および GAPDH: 500 bp) を 1.5% のアガロースゲル電気泳動により調べた.

3. トリパンプルー色素排除試験

Raji および K562 細胞を SAL および抗腫瘍薬で処理後, 0.5% トリパンプルー溶液 (Nakarai 社製,

京都) と細胞懸濁液を 2:8 で混和し, 顕微鏡にて生細胞数と死細胞数を計測し, 生存率を算定した.

4. 抗腫瘍薬による細胞増殖抑制

Raji (5×10⁴ 個/well) および K562 細胞 (2×10⁴ 個/well) を 96 well プレートに播種した. その後, ビンブラスチン (Sigma 社製, St. Louis, MO, USA) の終濃度が 0, 25, 200 および 400 ng/mL, あるいはイリノテカン (Sigma 社製) の終濃度が 0, 5, 10, 20 および 50 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.

5. SAL および 抗腫瘍薬による細胞増殖抑制

Raji (5×10⁴ 個/well) および K562 細胞 (2×10⁴ 個/well) を 96 well プレートに播種し, SAL を終濃度 0, 25, 25 および 50 μg/mL 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およびイリノテカンの終濃度がそれぞれ 25 ng/mL, 50 μM 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. SAL の前処理時間は, 細胞に対して影響のない処理時間である 24 時間処理を用いた (unpublished data).

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. Raji および K562 細胞における多剤耐性タンパク質遺伝子の発現

Raji および K562 細胞には多剤耐性タンパク質として知られている MDR1 や MRP1 が発現していることが知られている.⁶⁾ この多剤耐性タンパク質により, 抗腫瘍薬の細胞外排出が起これ, 薬剤耐性や副作用の増大が引き起こされ, 治療の大きな妨げとなっている. そこで, Raji および K562 細胞には MDR1 P-gp や MRP1 以外にどのような多剤耐性タンパク質遺伝子が発現しているのかを RT-PCR を用いて調べた. その結果, Raji および K562 細胞には MRP1, MRP4, MRP5 が発現していたが, MDR1 は Raji 細胞のみで発現していた (Fig. 1).

2. Raji 細胞における抗腫瘍薬の効果

Fig. 1 より, Raji 細胞には MDR1, MRP1, MRP4, MRP5 が発現していることが示された. これらの多

剤耐性タンパク質を発現している Raji 細胞に対する抗腫瘍薬ビンブラスチンあるいはイリノテカンの効果をトリパンプルー色素排除試験を用いて検討した。その結果、Raji 細胞をビンブラスチン処理した場合、処理濃度と処理時間依存的に細胞の生存率が有意に低下し、25 ng/mL, 48 時間処理により 69% まで低下した (Fig. 2A)。また、Raji 細胞をイリノテカンで処理すると 24 時間処理では生存率に変化は認められなかったが、48 時間および 72 時間では処理時間依存的に細胞の生存率が低下し、5 μ M, 48 時間処理により 68% まで低下した (Fig. 2B)。

3. Raji 細胞における SAL と抗腫瘍薬との併用効果

SAL と抗腫瘍薬との併用により、抗腫瘍効果が増強するか否かを検討した。Fig. 2A および 2B より、併用するビンブラスチンの濃度および時間は

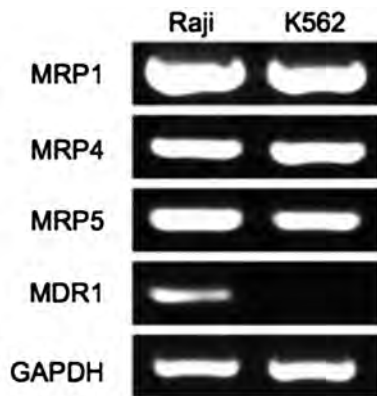


Fig. 1. Expression of ABC Transporter Genes in Raji and K562 Cells

Total RNAs prepared from Raji and K562 cells were subjected to RT-PCR using MRP1, MRP4, MRP5, MDR1 and GAPDH specific primers, respectively. PCR products were analyzed on 1.5% agarose gels.

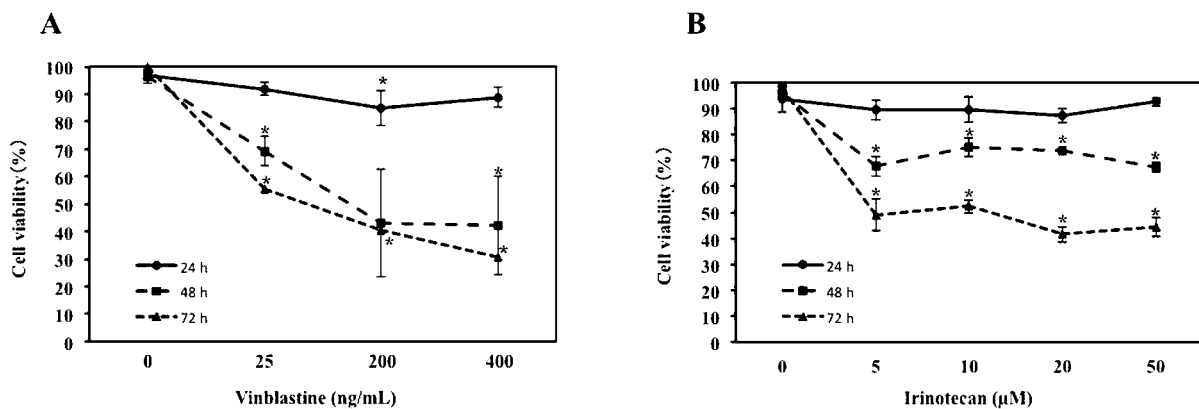


Fig. 2. Cytotoxic Effect of Vinblastine or Irinotecan in Raji Cells

Raji cells were treated with vinblastine (0, 25, 200 and 400 ng/mL; A) or irinotecan (0, 5, 10, 20 and 50 μ M; B) at 37°C for 24, 48 and 72 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 untreated control cells.

生存率が 69% に低下する 25 ng/mL, 48 時間処理とし、イリノテカンでは生存率が 68% に低下する 5 μ M, 48 時間処理とした。Raji 細胞においては、SAL (50 μ g/mL) 単独処理では生存率にほとんど変化は認められなかったが、Raji 細胞を SAL で 24 時間前処理後、ビンブラスチン処理により、SAL の処理濃度に依存して生存率が低下し、ビンブラスチン単独処理時の生存率は 85% であったが、SAL (50 μ g/mL) との併用処理時では 55% まで生存率が有意に低下した (Fig. 3A)。また、Raji 細胞を SAL で 24 時間前処理後、イリノテカン処理により、SAL の処理濃度に依存して生存率が低下し、イリノテカン単独処理時の生存率は 74% であったのに対して、SAL (50 μ g/mL) との併用処理時では 59% まで生存率が有意に低下した (Fig. 3B)。

4. K562 細胞における抗腫瘍薬の効果

Raji 細胞と同様に、ビンブラスチンとイリノテカンの K562 細胞に対する影響をトリパンプルー色素排除法試験を用いて検討した。K562 細胞をビンブラスチン処理すると、24 および 48 時間処理では生存率に変化は認められなかったが、72 時間処理では細胞の生存率が、25 ng/mL では 71%, 200 ng/mL では 63% まで低下したが濃度依存性は認められなかった (Fig. 4A)。また、K562 細胞をイリノテカン処理すると、50 μ M, 72 時間処理で、生存率の変化は認められなかった (Fig. 4B)。

5. K562 細胞における SAL と抗腫瘍薬の併用効果

SAL とビンブラスチンの併用により、ビンブラスチン単独処理の効果より増強するか否かを検討した。Fig. 4A より、併用するビンブラスチンの濃

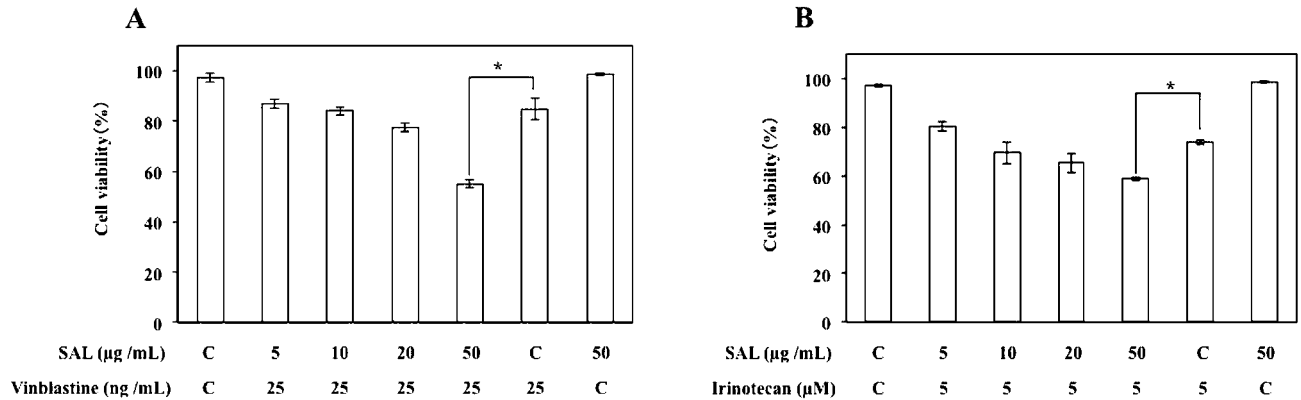


Fig. 3. Cytotoxic Effect of Vinblastine or Irinotecan in SAL-pretreated Raji Cells

Raji cells were pretreated with SAL (5, 10, 20 and 50 $\mu\text{g/mL}$) at 37°C for 24 h. Then SAL-pretreated cells were treated with vinblastine (25 ng/mL; A) or irinotecan (5 μM ; B) at 37°C for 48 h. Control (C), SAL, vinblastine or irinotecan-free medium. 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 vinblastine or irinotecan-treated cells.

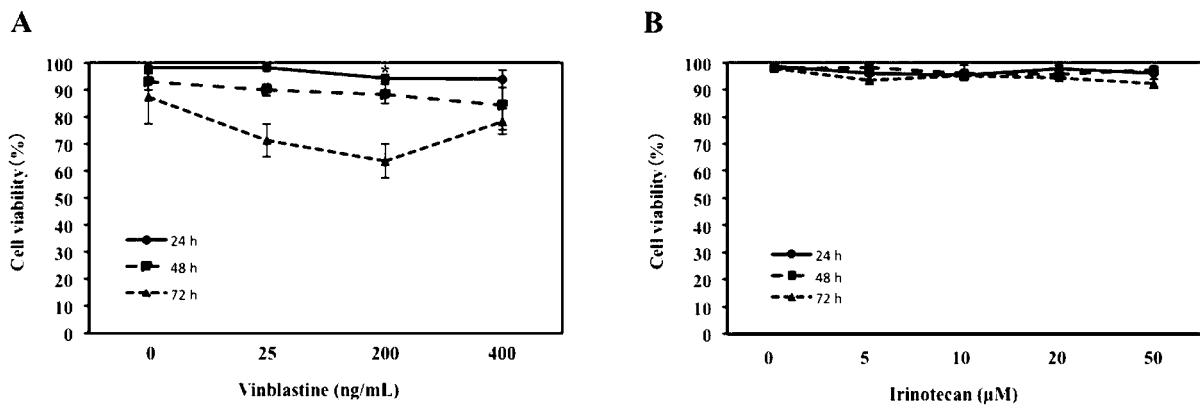


Fig. 4. Cytotoxic Effect of Vinblastine or Irinotecan in K562 Cells

K562 cells were treated with vinblastine (0, 25, 200 and 400 ng/mL; A) or irinotecan (0, 5, 10, 20 and 50 μM ; B) at 37°C for 24, 48 and 72 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 untreated control cells.

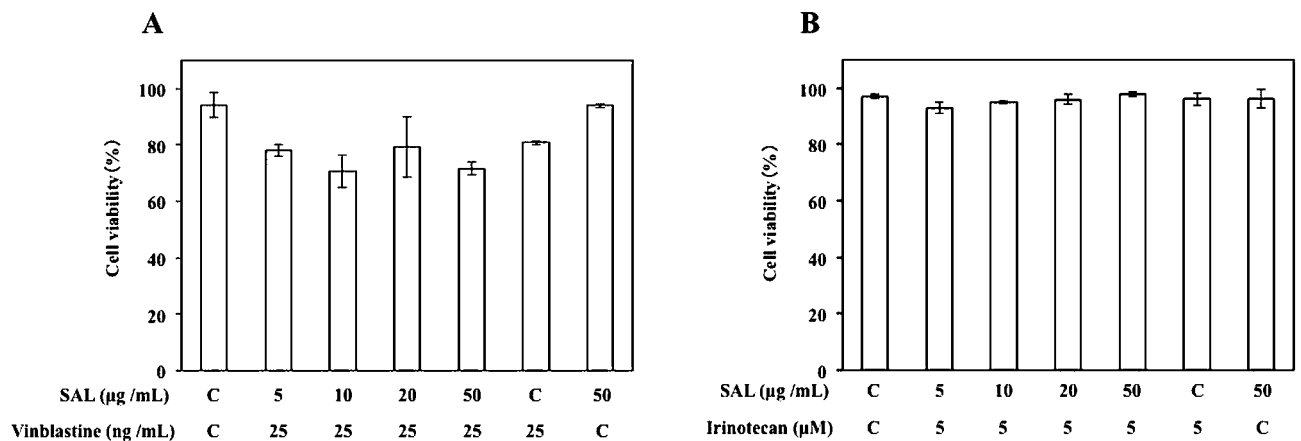


Fig. 5. Cytotoxic Effect of Vinblastine or Irinotecan in SAL-pretreated K562 Cells

SAL-pretreated K562 cells as described in the legend of Fig. 3 were treated with vinblastine (25 ng/mL; A) or irinotecan (5 μM ; B) at 37°C for 48 h. Control (C), SAL, vinblastine or irinotecan-free medium. 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 vinblastine or irinotecan-treated cells.

度および時間は 25 ng/mL, 48 時間処理とし, イリノテカン[®]は 5 μ M, 48 時間処理とした. K562 細胞においては, SAL (50 μ g/mL) 単独処理では生存率にほとんど変化は認められなかったが, K562 細胞の場合, ビンブラスチン単独処理時の生存率は約 81%であるのに対し, SAL (50 μ g/mL) 前処理では約 71%に低下したものの, この実験では SAL の効果に濃度依存性は認められなかった (Fig. 5A). また, K562 細胞を SAL で 24 時間前処理後, イリノテカン処理を行っても生存率の低下は認められなかった (Fig. 5B).

考 察

ビンブラスチンは MDR1 P-gp で排泄されることが知られている.⁸⁾ 今回の実験により, K562 細胞では多剤耐性タンパク質 MDR1 をコードしている遺伝子の発現が認められなかったことから (Fig. 1), Raji 細胞に比べて抗腫瘍薬への感受性が高いのではないかと考えられた. しかし, Raji 細胞と比較して, K562 細胞の生存率に時間依存性および用量依存性が認められなかったことから (Fig. 2, 4), K562 細胞では, ビンブラスチンが多剤耐性タンパク質に依存しない排出経路で排泄される. あるいはビンブラスチンにより誘導される細胞死に対して K562 細胞が抵抗性を有している可能性が考えられる. また, SAL と抗腫瘍薬による併用効果を検討した結果, SAL は Gb3 を発現している Raji 細胞に対して処理濃度依存的に生存率を減少させるが, Gb3 を発現していない K562 細胞に対してはその効果が低いことが明らかになった (Fig. 3, 5). Raji 細胞を SAL 処理することによって引き起こされる PS の細胞膜外層側への移行, 細胞縮小および PI の細胞内への取り込みは K562 細胞では起こらないことを明らかにしており,⁵⁾ これらの効果を誘導するためには, SAL が Gb3 に結合することが必要であると考えられる. SAL 処理によって引き起こされる PI の取り込み促進に着目し, このような現象が抗腫瘍薬でも引き起こされるか否かをアドリマイシンを用いて検討したところ, アドリマイシンと SAL との併用により, アドリマイシンの細胞内への取り込み量が SAL 処理により増加し, 併用効果が増加するという結果が得られているので,⁷⁾ 本論文での Raji および K562 細胞で認められた併用効果の差異は, 細胞に発現している

Gb3 に依存し, SAL が Gb3 に結合すること起因していると思われる. しかし, K562 細胞でも弱い併用効果が認められたことから, Gb3 以外の経路でも作用を及ぼしている可能性が考えられる. 引き続き実験を行い, Gb3 発現の有無による抗腫瘍薬併用効果の差異について検討し, さらに癌細胞に対する抗腫瘍薬の作用を増強することが可能か否かを検討する必要がある.

最近, マスノスケ卵より得られた RBL である chinook salmon roe lectin (CSRL) は乳癌細胞株である MCF7 や肝癌細胞株である Hep G2 に対して細胞毒性を示すことが報告された.⁹⁾ ナマズ卵より得られた SAL は, 単独処理では Raji 細胞に対して細胞死を誘導しない. しかし, 緒論でも述べたように, SAL 処理により細胞膜不透過性物質である PI が, 細胞死を誘導されていない細胞に取り込まれる. PI がどのような機構により細胞内に導入されているのかはまだ説明できないが, この現象を利用してアドリマイシンの取り込み量を増加できる結果が得られている.⁷⁾ 今回, 実験に利用したビンブラスチンおよびイリノテカンは, アドリマイシンと異なり分子自身に自家蛍光をもたないため, その薬物の取り込みが, SAL 処理により増加したか否かを調べることはできない. しかし, SAL 単独では細胞死を誘導しないことから, 併用効果のメカニズムとしては SAL が Gb3 発現している Raji 細胞に結合することにより細胞膜の透過性が亢進し, 抗腫瘍薬の取り込み量が増加した結果, 抗腫瘍効果が強く現れたものと考えられる. また, SAL は MDR1 P-gp を活性化して PS の細胞膜外層側への移行を引き起こすことが明らかになっており,⁶⁾ MDR1 P-gp を介して排泄されるアドリマイシンは, SAL 処理により細胞内含有量が減少し, 薬剤の効果が現弱するものと考えられた. しかし, 結果として SAL 処理 Raji 細胞に対する薬剤の効果が増強したことから, SAL 処理により排泄される量を上回る薬剤の細胞内への取り込み量が増加したものと考えられる. ビンブラスチンは MDR1 P-gp を介して排泄されるため,⁸⁾ アドリマイシンと同様に SAL 処理により細胞内への取り込み量が増加し, 作用が相乗的に増加したものと推測されるが, ビンブラスチンの作用機構は細胞周期を分裂中期で停止させることにより抗腫瘍効果を発揮することが知られおり,¹⁰⁾ SAL は Raji 細胞に対して細胞周期を停止させる効果があることから (unpublished

data), 相加的に効果が増強した可能性も考えられる。イリノテカン¹¹⁾は, ABC 輸送体に属する ABCG2 により排泄されることから, ¹¹⁾ アドリアマイシンやビンブラスチンとは異なる機構で相乗的に作用が増強したと考えられる。

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CHOP療法が行われているが, 治療には高濃度の薬剤を投与する必要があり, その結果として, 例えばビンブラスチンの副作用である白血球減少や末梢神経炎, イリノテカンの副作用である骨髄機能抑制, 高度の下痢あるいは間質性肺炎などの発現頻度が高まることが知られている。今後, SALによる薬剤の効果増強の機構を明らかにすることにより, Gb3を高発現している細胞に対して, 薬剤の細胞への取り込み量をコントロールできれば, SALが細胞内へ薬剤を有効的に導入できるツールとして医療への応用も可能になると考えられる。

REFERENCES

- 1) Sharon N., Lis H., "Lectin," Second Edition, Kluwer Academic Publishers, London, 2003.
- 2) Goldstein I. J., Hughes R. C., Monsigny M., Osawa T., Sharon N., *Nature*, **285**, 66 (1980).
- 3) Hosono M., Kawauchi H., Nitta K., Takayanagi Y., Shiokawa H., Mineki R., Murayama K., *Biol. Pharm. Bull.*, **16**, 1-5 (1993).
- 4) Hosono M., Ishikawa K., Mineki R., Murayama K., Numata C., Ogawa Y., Takayanagi Y., Nitta K., *Biochim. Biophys. Acta*, **1472**, 668-675 (1999).
- 5) Kawano T., Sugawara S., Hosono M., Tatsuta T., Ogawa Y., Fujimura T., Taka H., Murayama K., Nitta K., *Biol. Pharm. Bull.*, **32**, 345-353 (2009).
- 6) Sugawara S., Hosono M., Ogawa Y., Takayanagi M., Nitta K., *Biol. Pharm. Bull.*, **28**, 434-441 (2005).
- 7) Sugawara S., Sasaki S., Ogawa Y., Hosono M., Nitta K., *Yakugaku Zasshi*, **125**, 327-334 (2005).
- 8) Kuteykin T. K., Luna T. C., Ambroziak K., Löscher W., *Br. J. Pharmacol.*, **160**, 1453-1463 (2010).
- 9) Bah C. S., Fang E. F., Ng T. B., Mros S., McConnell M., Bekhit Ael-D., *J. Agric. Food Chem.*, **59**, 5720-5728 (2011).
- 10) Anderson H. J., Coleman J. E., Anderson R. J., Roberge M., *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **39**, 223-226 (1997).
- 11) 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).