

多剤耐性遺伝子(MDR1)過剰発現肝細胞癌に対する electrochemotherapyの有用性に関する基礎的検討

奈良県立医科大学第3内科学教室

西 脇 功

ELECTROCHEMOTHERAPY CAN OVERCOME P-GLYCOPROTEIN RELATED TUMOR RESISTANCE IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA

ISAO NISHIWAKI

Third Department of Internal Medicine, Nara Medical University

Received October 15, 2003

Abstract : The aim of this study was to investigate the role of electroporation in the treatment of carcinoma expressing multidrug resistance gene 1 (MDR1). The cells stably expressing MDR1 gene (BNL/MDR1-Bulk) and the clone expressing the MDR1 gene at the highest level (BNL/MDR1-Clone) were established by transducing human MDR1 gene into the mouse hepatocellular carcinoma (HCC) cell line, BNL1ME.7R.1. The expressions of P-glycoprotein on the cell surface of the established HCC cells, BNL/MDR1-Bulk and BNL/MDR1-Clone, were determined by fluorescence-activated cell sorter (FACS) with the monoclonal antibody MRK16, specific against human P-glycoprotein. BNL/MDR1-Bulk expressed P-glycoprotein on the cell surface at various levels, and BNL/MDR1-Clone expressed it at the highest level. In vitro, BNL/MDR1-Bulk and BNL/MDR1-Clone exhibited approximately 8-fold and 10-fold higher resistance against adriamycin, respectively, 4-fold and 10-fold higher resistance against vinblastin, respectively, and 2-fold and 5-fold higher resistance against mitomycin C, respectively. When these cells were exposed to adriamycin with electroporation in vitro, the chemosensitivities against adriamycin were increased, reaching the level of the parental cells (BNL/Wild). In the mouse models of subcutaneous tumors produced by inoculation of these cells, electroporation alone or injection of adriamycin at 1/10 of the 50% lethal dosage could not inhibit the growth of the tumor. However, electrochemotherapy consisting of adriamycin injection with electroporation did inhibit tumor growth not only in mice inoculated with the parental HCC cells or BNL/Wild cells, but also in P-glycoprotein presenting mice inoculated with BNL/MDR1-Bulk or BNL/MDR1-Clone. These results indicated that electrochemotherapy has the potential to overcome the tumor resistance related to MDR function in hepatoma cells.

Key words : electrochemotherapy, multidrug resistance gene 1, hepatocellular carcinoma, adriamycin

緒 言

我が国における肝細胞癌患者の年間死亡者数は約35000人¹⁾であり、男女ともに癌死の上位を占めている。近年、超音波、CT、MRIなどの画像診断の進歩による肝細胞癌の検出能、診断能の向上に加え、肝動脈塞栓療法(TAE)、エタノール注入療法(PEIT)、マイクロ波凝固療法(PMCT)、ラジオ波焼灼療法(RFA)などの局所療法の進歩、安全確実な外科切除手技の開発により治療成績は確実に向上している。しかし、門脈、肝静脈への脈管浸潤をとまうような高度に進行した症例では上述した治療法が不可能な場合も多い。こうした症例には抗癌剤の肝動脈注入を含む化学療法がおこなわれるが、十分な効果は得られておらず、進行肝癌の予後は依然として不良である。さらに肝癌患者は通常肝硬変を合併しており、肝機能障害や汎血球減少のために、抗癌剤による治療が制限されているのが現状である²⁾。このように癌化学療法の有効性は低く、延命効果も必ずしも明らかでないことから、肝細胞癌は抗癌剤に対して低感受性、抗癌剤抵抗性の癌腫として認識されており、肝細胞癌に対する安全かつ有効な化学療法の開発は重要な研究課題の一つと言える。

ところで癌化学療法の効果が不良である要因として腫瘍細胞の多剤耐性形質が考えられており、従来からアドリアマイシンやビンクリスチンなどに耐性となった腫瘍細胞は、構造や作用機序の異なる他の抗癌剤に対しても広範な交差耐性を持つことが知られている。この多剤耐性形質の一つの原因が細胞の膜上に存在する分子量170kDaの糖蛋白(P-glycoprotein: P-糖蛋白)である。P-糖蛋白はATPの加水分解エネルギーを用いて抗癌剤を細胞外へ排出するポンプとして働き、このため癌細胞は多剤耐性を獲得すると考えられている³⁾。

一方、electroporationは高圧電気パルスを細胞に負荷することにより一過性に細胞膜に小孔をつくり、DNAなどの様々な分子を細胞内へ導入する方法として幅広く応用されている。特に、抗癌剤投与後に高圧電気パルスを負荷するelectrochemotherapyは動物実験のみならず臨

床応用も開始され、その有効性と安全性がいくつかの癌ですでに報告されている⁴⁾。

本研究ではMDR1遺伝子産物であるP-糖蛋白の過剰発現のために多剤耐性を獲得した肝癌細胞に対して、アドリアマイシン投与後に高圧電気パルスによるelectroporationを負荷するelectrochemotherapyをおこない、その有用性をin vitro, in vivoで検討した。

材 料 と 方 法

1) MDR1 過剰発現肝細胞癌細胞株の作製

Amphotropic retrovirus packaging cell lineであるPAMP51細胞⁵⁾へLTR promoter制御下にヒトMDR1遺伝子を発現し、かつネオマイシン耐性遺伝子を選択マーカーとして併せ持つretrovirus back bone plasmidであるpHIRMDR1(Fig.1)(京都大学 植田和光教授より御供与)をlipofection法を用いて導入し、レトロウイルス産生細胞を作製した。

このレトロウイルス産生細胞を直径6cmの培養皿に巻き、10% fetal calf serum(FCS), L-グルタミン0.3mg/dl, アンピシリン100unit/ml, ストレプトマイシン100mg/ml含有RPMI1640培養液(ニッスイ, 日本)にて、37℃, 5% CO₂の条件下で12時間培養し、その培養上清をウイルス液として回収した。

BALB/cマウス由来の肝細胞癌細胞であるBNL1ME.7R.1細胞(ATCC, Rockville, MD)を同じ条件下に培養後、8μg/mlポリブレン(Sigma Chemical Co, St. Louis, MO)を添加したウイルス液に4時間暴露し、作製したレトロウイルスベクターを細胞に導入した。MDR1ベクター導入2日後に培養液を最終濃度1mg/mlのG418(GIBCO BRL, Bethesda, MD)を含む培養液に交換し、ウイルス導入細胞を選択した。導入細胞選択開始から14日後に形成された細胞コロニーを拾い上げMDR1遺伝子導入細胞クローンを樹立した。残る細胞はBulk細胞(BNL/MDR1-Bulk)として樹立した。

2) 肝細胞癌細胞表面のP-糖蛋白発現の分析

MDR1遺伝子導入により樹立されたClone細胞およびBulk細胞と、親株肝細胞癌細胞(BNL/Wild)をトリプシ

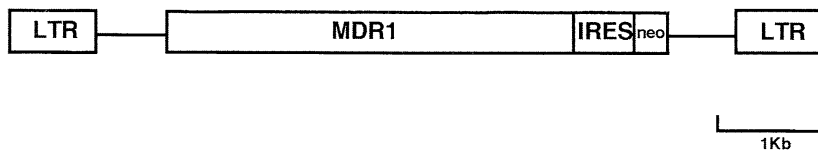


Fig. 1. Linear representation of retroviral vector pHIRMDR1. LTR : long terminal repeats of retrovirus. MDR1 : multidrug resistance gene 1. IRES : internal ribosome entry site. neo : neomycin resistance gene.

ンにて細胞浮遊液とし、メッシュを通した後 phosphate buffered saline (PBS) にて2回洗浄した。さらに、1次抗体として抗ヒトP-糖蛋白モノクローナル抗体MRK16 (協和メディクス, 東京) に水中で30分間反応させた後、再びPBSにて2回洗浄し、水中にて2次抗体フルオレシシン標識ヤギ抗マウスIgG抗体(Kirkegaard & Perry Laboratories Inc, Gaithersburg, MD, Germany) と30分間反応させた。これら細胞をFACScan (Becton Dickson, San Jose) を用いて解析した。このFACSの結果に基づき、樹立したClone細胞のうち最もP-糖蛋白発現量の多いCloneを選びBNL/MDR1-CloneとしてBNL/MDR1-Bulkとともに以後の実験に用いた。

3) 細胞表面発現P-糖蛋白機能の評価

P-糖蛋白基質であるアドリアマイシン(ADM) (協和発酵, 東京), ビンブラスチン(VLB) (塩野義製薬, 東京) ならびにマイトマイシンC(MMC) (協和発酵, 東京) を各種濃度で上記各細胞に添加し, 4日間暴露した後MTTアッセイ⁹⁾により生存細胞量を定量し, 50%細胞増殖阻止濃度(IC₅₀)を算出した。

4) in vitro electrochemotherapy

BNL/Wild, BNL/MDR1-Bulk, BNL/MDR1-Cloneの各細胞について, FCSを含まない種々の濃度のADM含有培養液で 1×10^6 cells/mlの細胞密度の細胞浮遊液を作製した。これらの細胞浮遊液400 μ lをEP Chamber (Bio-Rad, Hercules, CA) に入れ, Gene Pulser (Bio-Rad, Hercules, CA) を用いて750V/cm, 960 μ F, 99 μ secの条件で電気パルスを負荷した後, 48穴の細胞培養プレートに撒き, 20%FCS含有培養液を400 μ l加え(最終濃度10%), 4日間培養した。対照として同じ細胞浮遊液をEP Chamberに入れた後, 電気パルスを負荷せずに48穴の細胞培養プレートに撒き, 同様に20%FCS含有培養液で4日間培養する実験群を設けた。4日間培養後の生存細胞数をMTTアッセイを用いて定量し, さらに50%細胞増殖阻止濃度(IC₅₀)を算出した。

5) 細胞内ADM量の定量

BNL/Wild, BNL/MDR1-Bulk, BNL/MDR1-Cloneの各細胞を, FCSを含まない1 μ g/ml ADM含有培養液で 1×10^6 cells/mlの細胞密度に調整し, 30分間振盪培養後, 400 μ lをEP Chamber (Bio-Rad, Hercules, CA) に入れ, Gene Pulser (Bio-Rad, Hercules, CA) を用いて750V/cm, 960 μ F, 99 μ secの条件で電気パルスを負荷した。10分間水中に静置後PBSにて2回洗浄し, 顕微鏡下で細胞数を算定した。さらに, 遠心後の細胞ペレットを500 μ lの2回蒸留水にて再懸濁し, MICROSON (Misonix Inc, Farming Dale, NY) を用いて超音波破碎し,

再度遠心後上清中のADM量をHPLC法⁷⁾を用いて測定した。対照として上記の通り30分間培養し, 400 μ lの細胞含有液を電気パルスを負荷せずに10分間水中にて静置後PBSにて2回洗浄する実験群を設けた。同様に10分間水中に静置後, PBSにて2回洗浄し, 細胞数を算定後, ADM量をHPLC法を用いて定量した。

6) in vivo electrochemotherapy

in vivo での実験を施行するにあたり, in vitro におけるBNL/Wild, BNL/MDR1-Bulk, BNL/MDR1-Cloneの細胞増殖能を検討した。その結果, BNL/WildとBNL/MDR1-Bulkの間には増殖速度に差は認めなかったが, BNL/MDR1-Cloneではこれらと比較して有意に細胞増殖が遅かった。そのため, 本実験ではBNL/WildとBNL/MDR1-Bulkを使用し, その結果を検討した。

BNL/WildおよびBNL/MDR1-Bulkの各細胞を 2×10^7 cells/mlの細胞密度にPBSにて調整した。この細胞浮遊液100 μ lを親株細胞BNLIME. 7R. 1細胞の由来元であるマウスと同系のBALB/cマウス(日本SLC, 浜松)の皮下に接種し, マウス皮下肝細胞癌モデルを作製した。腫瘍径が8mmに達した時点で, それぞれの細胞の皮下肝癌マウスをランダムに4群に振り分け, 以下の実験をおこなった。

Electrochemotherapy負荷群(n=8)では50%マウス致死量の1/10量(0.98mg/kg)に相当するアドリアマイシン溶液100 μ lを尾静脈より静脈内投与し, 15分後に腫瘍の両端を挟み込むように2本の針電極を刺入し, PA4000 (Cyto Pulse Science Inc, Columbia, MD) を用いて電圧1000V/cm, パルス幅99 μ secの電気パルスを1Hz, 8秒間腫瘍局所へ負荷した^{8,9,10)}。抗癌剤単独負荷群(n=8)ではelectrochemotherapy群と同様にアドリアマイシンを静脈内投与し, 電気パルスを負荷しなかった。

電気パルス単独負荷群(n=8)では100 μ lのPBSを尾静脈より投与し, 15分後にelectrochemotherapy群と同じ条件で電気パルスを負荷した。

抗癌剤, 電気パルスともに負荷しないコントロール群(n=8)においては尾静脈より100 μ lのPBSを静脈内投与したのみで電気パルスを負荷しなかった。

各皮下肝癌マウスの腫瘍サイズの推移を評価するために, ノギスを用いて腫瘍の長径, 短径を2日おきに測定し, 腫瘍容積を以下のように算出した¹¹⁾。腫瘍容積(mm³) = [長径(mm) × 短径²(mm²)]/2。

7) 統計学的検定

平均値の差の有意差検定はStudent *t*-testおよびtwo-way ANOVAとFisher検定によった。

結 果

1) 肝細胞癌細胞表面のP-糖蛋白発現とその機能

ヒトMDR1遺伝子をレトロウイルスベクターを用いて肝細胞癌細胞へ導入し、導入細胞の細胞表面に発現したヒトP-糖蛋白をFACSscanを用いて解析した。この結果、BNL/MDR1-Bulk細胞は様々なレベルのヒトP-糖蛋白を発現していた(Fig. 2B)。樹立したクローン細胞の

細胞表面に発現するP-糖蛋白量をFACSscanにて同様に評価し、最も発現レベルの高いクローン(BNL/MDR1-Clone: Fig. 2C)を選んだ。

次にこれらの細胞を、P-糖蛋白の基質であるADM, VLB, MMCに暴露し、暴露4日後の生存細胞から50%増殖阻止濃度(IC₅₀)を算出した。

BNL/Wild, BNL/MDR1-Bulk, BNL/MDR1-Cloneの各細胞におけるADMに対するIC₅₀はそれぞれ

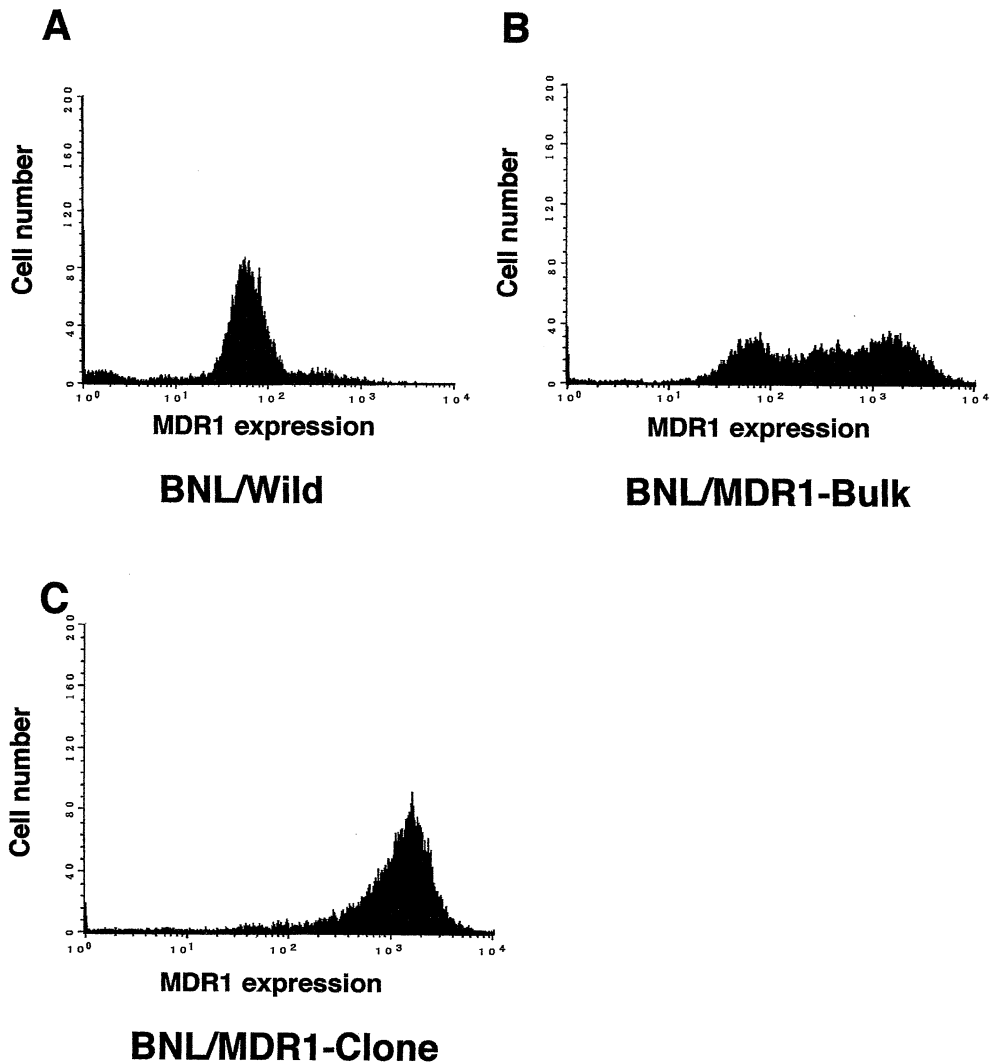


Fig. 2. Expression patterns of P-glycoprotein on the sell surface of HCC cells, parental HCC cells (BNL/Wild) (A), bulk of HCC cells transduced with human MDR1 gene (BNL/MDR1-Bulk)(B) and clone of HCC cells expressing P-glycoprotein at the highest level (BNL/MDR1-Clone)(C). The expression levels were analyzed by fluorescence-activated cell sorter (FACS) detected by indirect immunostaining using anti-human P-glycoprotein monoclonal antibody.

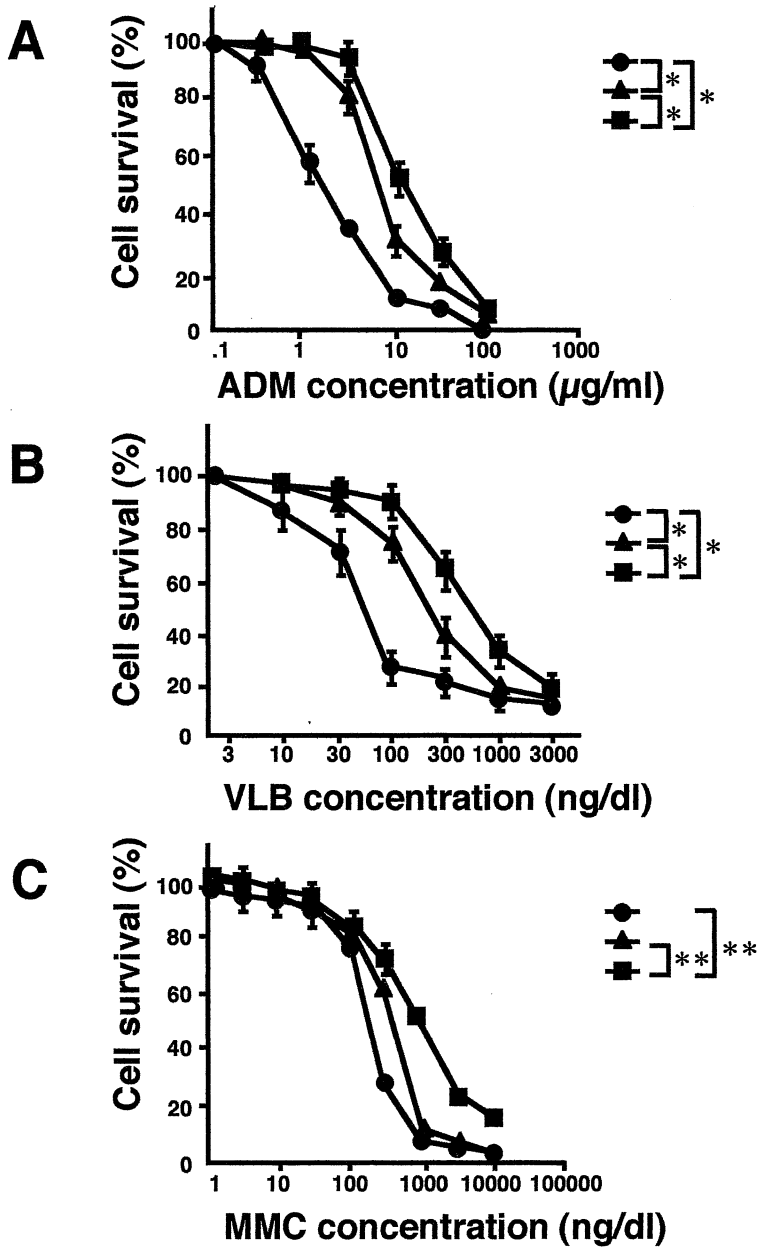


Fig. 3. Resistance of HCC cells by transducing MDR1 gene against anticancer agents, adriamycin (ADM) (A), vinblastin (VLB) (B), and mitomycin C (MMC)(C). Parental HCC cells (BNL/Wild)(●), bulk of HCC cells transduced with human MDR1 gene (BNL/MDR1-Bulk)(▲) and clone of HCC cells expressing P-glycoprotein at the highest level (BNL/MDR1-Clone)(■) were cultured with various concentrations of ADM, VLB or MMC. After a 4-days incubation, cell survival ratios were determined by MTT assay, Statistical analysis was performed by two-way ANOVA followed by Fisher's PLSD. Each data point represents the mean \pm SD for duplicate experiments.

*; $p < 0.0001$, **; $0.0001 \leq p < 0.001$.

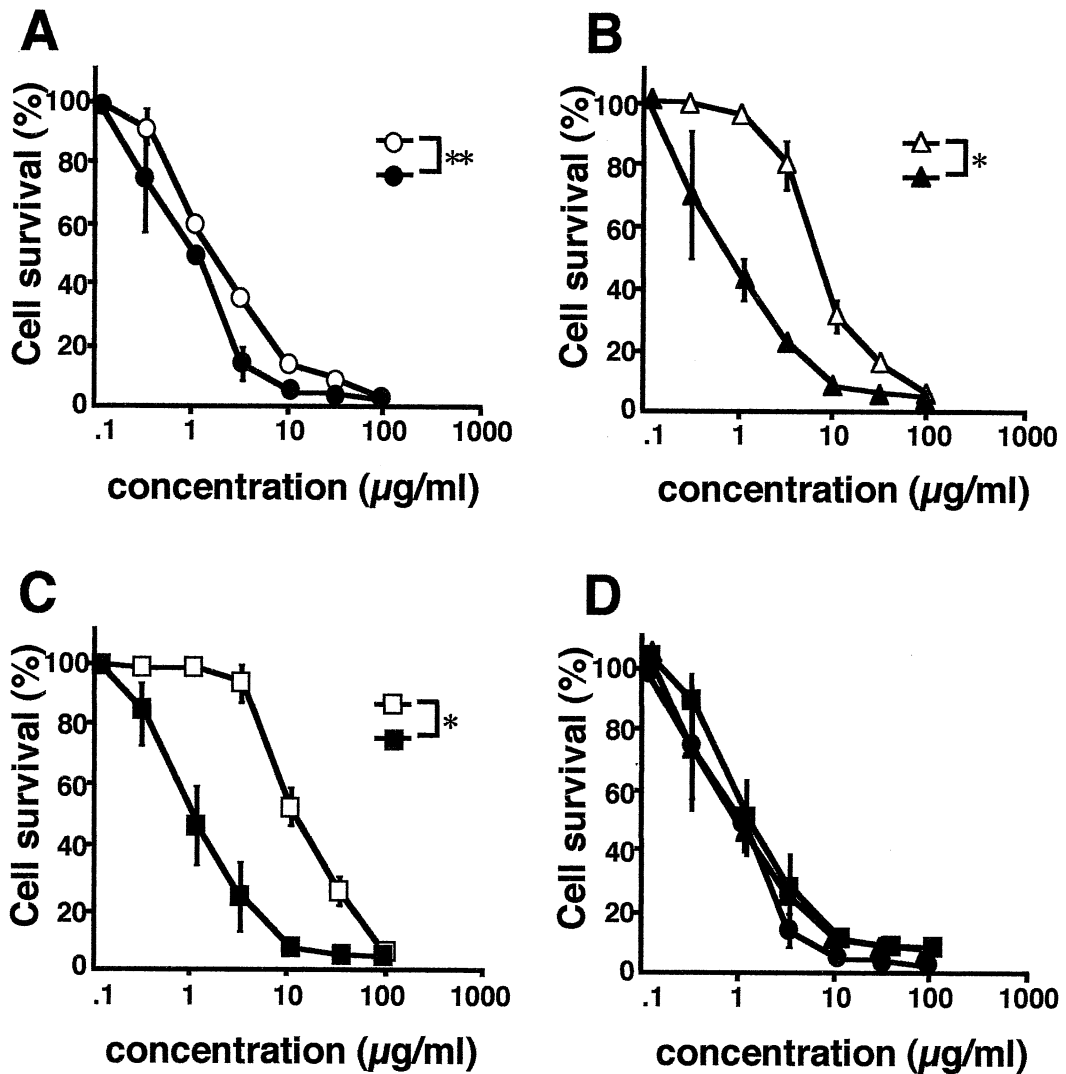


Fig. 4. Chemosensitivity of HCC cells against adriamycin with or without electroporation. Parental HCC cells (BNL/Wild)(A), bulk of HCC cells transfected with human MDR1 gene (BNL/MDR1-Bulk)(B) and clone of HCC cells expressing P-glycoprotein at the highest level (BNL/MDR1-Clone)(C) were cultured with various concentrations of adriamycin with (closed shape : ●, ▲ and ■) or without (open shape : ○, △ and □) electroporation. After a 4-days incubation, cell survival ratios were determined by MTT assay. Sensitivity against adriamycin of each group of cells accompanied by electroporation were summarized (D). Statistical analysis was performed by two-way ANOVA followed by Fisher's PLSD. Each data point represents the mean ± SD for duplicate experiments.
 * ; p < 0.0001, ** ; 0.0001 ≤ p < 0.001.

1.06µg/ml, 8.01µg/ml, 10.06µg/ml, VLB に対する IC₅₀ はそれぞれ 40ng/ml, 160ng/ml, 400ng/ml, MMC に対する IC₅₀ はそれぞれ 180ng/ml, 400ng/ml, 900ng/ml であり (Fig. 3), P-糖蛋白の発現レベルが高い

BNL/MDR1-Clone では IC₅₀ は有意に高値を示した。
 2) P-糖蛋白発現肝細胞癌細胞に対する in vitro electrochemotherapy の効果
 BNL/Wild, BNL/MDR1-Bulk, BNL/MDR1-Clone

の各細胞について電気パルス負荷の有無による ADM に対する感受性の変化を ADM へ暴露 4 日後の生存細胞数を MTT アッセイにて評価した (Fig. 4).

BNL/Wild, BNL/MDR1-Bulk, BNL/MDR1-Clone のいずれの細胞においても ADM に対する感受性は電気パルス負荷により有意に増強された (Fig. 4A, B, C). しかも電気パルスを負荷された細胞の ADM に対する感受性は BNL/Wild, BNL/MDR1-Bulk, BNL/MDR1-Clone の各細胞間において有意差がなかった (Fig. 4D).

3) 電気パルス負荷による肝細胞癌細胞内の ADM 量の変化

BNL/Wild, BNL/MDR1-Bulk, BNL/MDR1-Clone の各細胞について ADM への暴露後に細胞内の ADM 量を HPLC 法にて測定し, 電気パルス負荷の有無による変化を評価した (Fig. 5).

電気パルスを負荷しない場合, ヒト MDR1 遺伝子導入肝細胞癌細胞である BNL/MDR1-Bulk,

BNL/MDR1-Clone 細胞内の ADM 量はそれぞれ $199.7 \pm 65.1 \text{ ng}/1 \times 10^6 \text{ cells}$, $169.2 \pm 26.5 \text{ ng}/1 \times 10^6 \text{ cells}$ であり, ヒト MDR1 遺伝子非導入親株肝細胞癌細胞である BNL/Wild 細胞内の ADM 量が $413.6 \pm 43.1 \text{ ng}/1 \times 10^6 \text{ cells}$ であったのに比し, 有意にすくなかった.

ADM に暴露後に電気パルスを負荷したところ, いずれの細胞においても ADM 量は有意に増加した. 電気パルスを負荷された BNL/Wild, BNL/MDR1-Bulk, BNL/MDR1-Clone の各細胞内 ADM 量はそれぞれ $887.6 \pm 139.6 \text{ ng}/1 \times 10^6 \text{ cells}$, $902.4 \pm 133.1 \text{ ng}/1 \times 10^6 \text{ cells}$, $942.1 \pm 107.9 \text{ ng}/1 \times 10^6 \text{ cells}$ であり, 各細胞間に有意差を認めなかった.

4) ADM を用いた in vivo electrochemotherapy の有用性

マウス皮下肝細胞癌モデルを作製し, 形成された腫瘍に対する ADM 投与の効果, 電気パルス負荷の効果, さらに ADM 投与後に電気パルスを負荷する electroche-

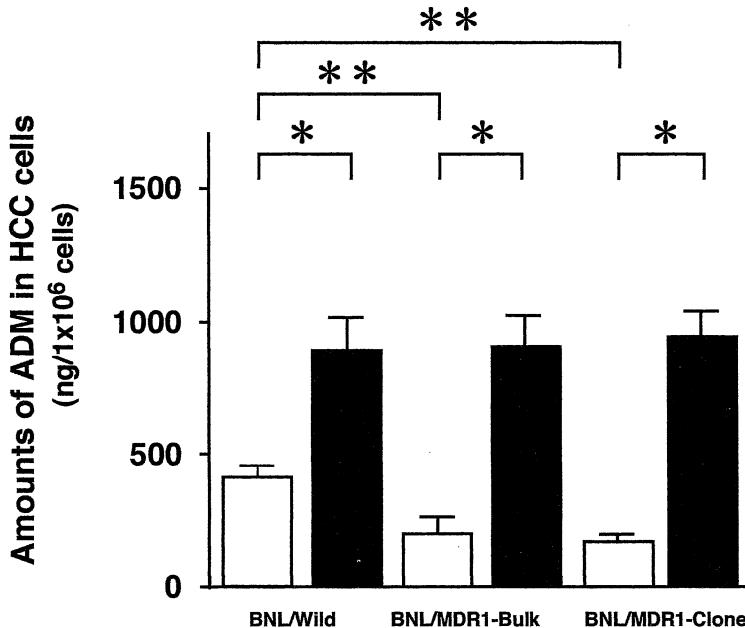


Fig. 5. Intracellular amounts of adriamycin in HCC cells with or without electroporation. Parental HCC cells (BNL/Wild)(A), bulk of HCC cells transduced with human MDR1 gene (BNL/MDR1-Bulk) and clone of HCC cells expressing P-glycoprotein at the highest level (BNL/MDR1-Clone) were exposed to adriamycin ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) for 30 minutes and treated with or without electroporation. Intracellular amounts of adriamycin were determined with high performance liquid chromatography (HPLC). The closed bars represent the amount in cells treated with electroporation and the open bars represent the amount in cells without electroporation. Statistical analysis was performed by Student's *t* test. Each data point represents the mean \pm SD for duplicate experiments.

*; $p < 0.0001$, **; $0.0001 \leq p < 0.001$.

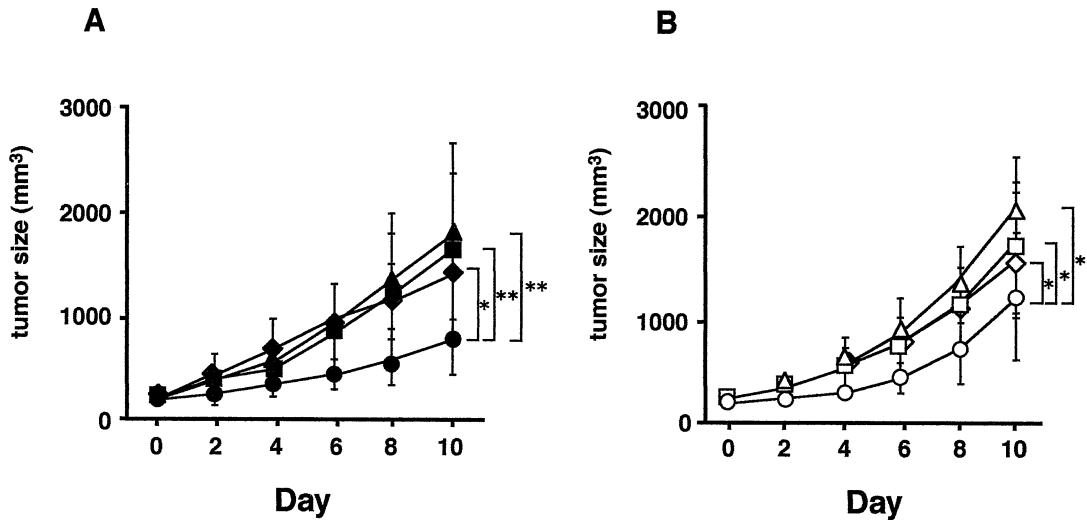


Fig. 6. Antitumor effects of electrochemotherapy with adriamycin followed by electroporation on subcutaneous tumor of HCC expressing P-glycoprotein in mice. Parental HCC cells (BNL/Wild) and bulk of HCC cells transduced with human MDR1 gene (BNL/MDR1-Bulk) were inoculated subcutaneously into the flank regions of syngeneic BALB/c mice. When subcutaneous tumors reached approximately 8 mm in diameter, animals received injection of PBS alone (◆ and ◇), electroporation alone (■ and □), injection of adriamycin alone (▲ and △), or injection of adriamycin followed by electroporation (● and ○) on Day 0. Each group consisted of 8 mice. Closed shapes represent BNL/Wild (A) and the open shapes represent BNL/MDR1-Bulk (B). Statistical analysis was performed by two-way ANOVA followed by Fisher's PLSD. Each data point represents the mean \pm SD for duplicate experiments. (Data were not shown after any animals died in the comparative group.) *; $p < 0.0001$, **; $0.0001 \leq p < 0.001$.

motherapy の効果を検討した (Fig. 6).

電気パルスのみを負荷したマウス皮下肝癌, 50% 致死量の 1/10量に相当する 2mg の ADM のみを投与したマウス皮下肝癌の容積はコントロール群である PBS のみを投与したマウス皮下肝癌の容積と有意差なく, BNL/Wild (Fig. 6A), BNL/MDR1-Bulk (Fig. 6B) ともに経過を追って増大した。これに対し, electrochemotherapy を施行したマウスの皮下腫瘍の発育は BNL/Wild, BNL/MDR1-Bulk ともに他群に比べ有意に遅延した。Electrochemotherapy を施行した場合 BNL/Wild と BNL/MDR1-Bulk の間で皮下腫瘍容積に有意差を認めなかった。

考 察

抗癌剤に対する薬剤感受性は癌化学療法 of 成否を左右する一要因であり, その研究は 1972 年の Dano らによる多剤耐性の報告¹²⁾に端を発する。1976 年には Juliano らが細胞膜に存在する薬剤排出ポンプである P-糖蛋白を発見し¹³⁾, さらに, 1986 年 Gottesmann 一派はこの P-糖蛋白をコードする multidrug resistance gene 1

(MDR1) 遺伝子の配列を明らかにした¹⁴⁾。この結果, 癌細胞における P-糖蛋白を介した多剤耐性形質に関する解析が可能となった。

肝細胞癌に対する抗癌剤の効果は総じていまだ十分とは言えない状況にある。特に P-糖蛋白の基質を用いる抗癌剤治療では MDR1 遺伝子を発現する肝細胞癌患者の予後は改善されず, 肝細胞癌も他の癌と同様に MDR1 発現が抗癌剤に対する耐性に深く関わっている可能性が示唆されている¹⁵⁾。一方, これまでに MDR1 遺伝子発現による多剤耐性を克服するために多大な努力が払われてきた。In vitro の研究ではベラパミル¹⁶⁾, シクロスポリン¹⁷⁾, キニジン¹⁸⁾, タモキシフェン¹⁹⁾, プログステロン²⁰⁾, レセルピン²¹⁾などの薬剤が P-糖蛋白のポンプ作用を抑制し, 多剤耐性の克服に有用である可能性が示されているが, in vivo においてはそれぞれの毒性のために満足のいく結果は得られていない。

本研究では, まずヒト MDR1 遺伝子をレトロウイルスベクターを用いてマウス肝細胞癌細胞に導入し, MDR1 遺伝子を過剰発現する肝細胞癌モデル細胞を作製した。この際, MDR1 遺伝子を導入した BNL/MDR1-Bulk 細胞

および BNL/MDR1-Clone 細胞はその細胞表面に遺伝子産物である P-糖蛋白を過剰発現しており、これらの細胞では P-糖蛋白の基質である ADM, VLB, MMC に対する感受性が低下し、その低下の程度が細胞表面の P-糖蛋白の発現量と平行することが明らかになった。さらに、ADM 暴露後の細胞内の ADM 量はヒト MDR1 遺伝子導入により有意に低下していた。以上より、ヒト MDR1 遺伝子導入により肝細胞癌は P-糖蛋白を過剰に発現するようになり、ADM を含む多剤耐性を獲得したと考えられた。

Electroporation は高電圧パルスを細胞に負荷し、細胞膜へ小孔を開けることにより DNA や薬剤など様々な分子の細胞内への導入を可能にする方法であり、幅広い分野で応用されている。当教室では抗癌剤の細胞内移行を高めるために抗癌剤投与後に高電圧パルスを負荷する electrochemotherapy について研究を重ねており、これまでに *in vitro*, *in vivo* 動物実験モデルにおいてその有効性を報告している^{22, 23}。しかし、これまで electrochemotherapy の MDR1 発現細胞に対する有効性については研究がなされていない。

今回の実験では、*in vitro* において先に述べた MDR1 過剰発現肝細胞癌細胞に対し ADM を用いた electrochemotherapy をおこなったところ、BNL/MDR1-Bulk, BNL/MDR1-Clone のいずれにおいても ADM 感受性は有意に増強し、親株肝細胞癌細胞と同程度の値を示したことから、ADM を用いる electrochemotherapy は P-糖蛋白過剰発現細胞に対して有効であることが明らかになった。さらに、ADM の細胞内量は electroporation をおこなうことにより増加し、P-糖蛋白発現量の異なる細胞間でその量には有意差を認めなかった。したがって、electroporation をおこなうことにより ADM の細胞内移行が増加することが、P-糖蛋白過剰発現細胞における ADM 感受性増強の機序の一つであると考えられた。

これまで種々の動物腫瘍モデルにおいて、様々な抗癌剤を用いる electrochemotherapy の有効性が証明されている²⁴。さらに頭頸部腫瘍²⁵、基底細胞癌²⁶、悪性黒色腫²⁷などのヒト体表腫瘍に対してプレオマイシン、シスプラチンによる electrochemotherapy の臨床応用が欧米において試みられ、その安全性と高い有効性がすでに報告されている。動物モデルにおける electrochemotherapy の作用機序については *in vitro* で観察された抗癌剤の細胞内移行の増加に加え、電気パルスによる血管内皮細胞への直接作用による腫瘍血流の減少が考えられている²⁸。本研究では P-糖蛋白を過剰に発現し多剤耐性を獲得した細胞を用いた皮下腫瘍モデルを作製し、ADM による

electrochemotherapy の有効性を検討した結果、P-糖蛋白過剰発現による ADM に対する耐性は *in vivo* では証明されず、一方ではマウスの LD₅₀ の 1/10 量に相当する ADM の投与のみでは有意な抗腫瘍効果が得られなかった。しかし同量の ADM 投与後に electroporation を負荷する electrochemotherapy をおこなったところ有意に腫瘍発育は遅延した。他の報告と同様に electroporation 負荷により腫瘍血流は一時的に減少したと思われるが、electroporation のみでは腫瘍発育への影響は認められなかったことから、主たる作用機序は肝細胞癌内の ADM 量の増加であったと考える。

これまでに electrochemotherapy が臨床応用されてきた体表癌とは異なり、肝細胞癌は深部臓器である肝臓に発生するが、エコーガイド下のエタノール注入療法やラジオ波焼灼療法など腫瘍への体外からのアプローチが確立されており、この方法により今回の実験と同様に針電極を肝内の腫瘍両端へ挿入することは容易であることから、electrochemotherapy も将来の局所治療の一つの選択肢になる可能性がある。

以上、P-糖蛋白を過剰発現することにより多剤耐性を獲得した肝細胞癌に対し、electrochemotherapy は P-糖蛋白の働きを凌駕する有効な治療法となり得る可能性が示された。

結 語

- 1) ヒト MDR1 遺伝子を導入されたマウス肝細胞癌細胞は、その細胞表面に efflux pump として機能する P-糖蛋白を過剰発現することにより多剤耐性を獲得した。
- 2) ADM 存在下に electroporation を負荷する *in vitro* の electrochemotherapy は ADM の細胞内移行を高めることにより、P-糖蛋白過剰発現細胞の ADM 感受性を増強させ、この ADM 感受性は親株細胞に匹敵するものであった。
- 3) マウス皮下肝腫瘍モデルでは抗腫瘍効果を示さない量の ADM 投与と electroporation を組み合わせる electrochemotherapy により、その腫瘍発育が有意に遅延した。

以上より ADM と electroporation を併用する electrochemotherapy は P-糖蛋白の機能を凌駕する有効な肝細胞癌の治療法となり得る可能性が示された。

本論文の要旨は、第 44 回日本消化器病学会大会 (2002 年 10 月横浜) で発表した。

謝 辞

稿を終えるに臨み、終始御懇篤なる御指導、御校閲を賜りました奈良県立医科大学第3内科学教室福井博教授に深甚の謝意を捧げるとともに、御高閣、御助言を賜りました本学第1外科学教室中島祥介教授、本学腫瘍病理学教室國安弘基教授に深謝申し上げます。さらに本研究の遂行にあたり常に御指導、御助力をいただきました香川医科大学第3内科学教室栗山茂樹教授、奈良県立医科大学第3内科学教室辻之上裕久先生に感謝いたします。また、終始、御協力いただきました第3内科学教室の諸兄に感謝の意を表します。

文 献

- 1) Arii, S., Okamoto, E. and Imamura, M. : Registry in Japan : current status of hepatocellular carcinoma in Japan. Liver Cancer Study Group of Japan. *Semin. Surg. Oncol.* **12** : 204-211, 1996.
- 2) Sangro, B., Herraiz, M., Martinez-Gonzales, M. et al. : Prognosis of hepatocellular carcinoma in relation to treatment : a multivariate analysis of 178 patients from a single European institution. *Surgery* **124** : 575-583, 1998.
- 3) Gottesman, M. M., Fojo, T. and Bates, S. E. : Multidrug resistance in cancer : role of ATP-dependent transporter. *Nature Rev. cancer* **2** : 48-58, 2002.
- 4) Heller, R., Gilbert, R. and Jaroszeski, M. J. : Clinical trials of solid tumors using electrochemotherapy. In *Electrochemotherapy, Electrogenotherapy, and Transdermal drug delivery* (Jaroszeski MJ, Heller R, Gilbert R, eds). Towata, Humana Press, pp.137-156, 2000.
- 5) Yoshimatsu, T., Tamura, M., Kuriyama, S. and Ikenaka, K. : Improvement of retroviral packaging cell lines by introducing the polyomavirus early region. *Hum. Gene Ther.* **9** : 161-172, 1998.
- 6) Kuriyama, S., Nakatani, T., Masui, K., Sakamoto, T., Tominaga, K., Yoshikawa, M., Fukui, H., Ikenaka, K., and Tsujii, T. : Bystrander effect caused by suicide gene expression indicates the feasibility of gene therapy for hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **22** : 1838-1846, 1995.
- 7) Shinozawa, S., Mimaki, Y., Araki, Y. and Oda, T. : Determination of the concentration of adriamycin and its metabolites in the serum and tissues of Ehrlich carcinoma-bearing mice by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **196** : 463-469, 1980.
- 8) Jaroszeski, M. J., Gilbert, R. A. and Heller, R. : In vivo antitumor effects of electrochemotherapy in a hepatoma model. *Biochemica et Biophysica Acta.* **1334** : 15-18, 1997.
- 9) Cemazar, M., Miklavcic, D., Mir, L. M., Belehradec, J. Jr., Bonnay, M., Fourcault, D., and Sersa, G. : Electrochemotherapy of tumors resistant to cisplatin a study in a murine tumor model. *Eur. J. Cancer* **37** : 1166-1172, 2001.
- 10) Kuriyama, S., Mitoro, A., Tsujinoue, H., Toyokawa, Y., Nakatani, T., Yoshiji, H., Tsujimoto, T., Okuda, H., Nagao, S. and Fukui, H. : Electrochemotherapy can eradicate established colorectal carcinoma and leaves a systemic protective memory in mice. *Int. J. Oncol.* **16** : 979-985, 2000.
- 11) Carlsson, G., Gullberg, B., and Hafstrom, L. : Estimation of liver tumor volume using different formulas—an experimental study in rats. *J. Cancer Res. clin. Oncol.* **105** : 20-23, 1983.
- 12) Dano, K. : Cross resistance between vinca alkaloids and anthracyclines in Ehrlich ascites tumor in vivo. *Cancer Chemother. Rep.* **56** : 701-708, 1972.
- 13) Juliano, R. L. and Ling, V. : A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim. Biophys. Acta.* **455** : 152-162, 1976.
- 14) Chen, C. J., Chin, J. E., Ueda, K., Clark, D. P., Pastan, I., Gottesman, M. M. and Roninson, I. B. : Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug resistant human cells. *Cell* **47** : 381-389, 1986.
- 15) Sangro, B., Herraitz, M., Martinez-Gonzalez, M. et al. : Prognosis of hepatocellular carcinoma in relation to treatment : A multivariate analysis of 178 patients from a single European institution. *Surgery* **124** : 575-583, 1998.

- 16) **Tsuruo, T., Iida, H., Tsukagoshi, S. and Sakurai, Y.** : Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. *Cancer Res.* **41** : 1967-1972, 1981.
- 17) **Twentyman, P. R.** : Cyclosporine as drug resistance modifiers. *Biochem. Pharmacol.* **43** : 109-117, 1992.
- 18) **Tsuruo, T., Iida, H., Kitatani, Y., Yokota, K., Tsukagoshi, S. and Sakurai, Y.** : Effects of quinidine and related compounds on cytotoxicity and cellular accumulation of vincristine and adriamycin in drug-resistant tumor cells. *Cancer Res.* **44** : 4303-4307, 1984.
- 19) **Ramu, A., Glaubiger, D. and Funfs, Z.** : Reversal of acquired resistance to doxorubicin in P388 murine leukemia cells by tamoxifen and other triparanol analogues. *Cancer Res.* **44** : 4392-4395, 1984.
- 20) **Huang Yang, C. P., DePinho, S. G., Greenberg, L. M., Arceci, R. J. and Horwitz, S. B.** : Progesterone interacts with P-glycoprotein in multidrug-resistant cells and in the endometrium of gravid uterus. *J. Biol. Chem.* **264** : 782-788, 1989.
- 21) **Inaba, M., Fujikura, R., Tsukagoshi, S. and Sakurai, Y.** : Restored in vitro sensitivity of adriamycin- and vincristine-resistant P388 leukemia with reserpine. *Biochem. Pharmacol.* **30** : 2191-2194, 1981.
- 22) **Mitoto, A., Kuriyama, S., Tsujinoue, H., Matsumoto, M., Nakatani, T. and Fukui, H.** : Electrochemotherapy with bleomycin against colorectal carcinoma in mouse model : evaluation of the dose and administration route of the drug and the electric field intensity. *Int. J. Oncol.* **16** : 97-104, 2000.
- 23) **Kuriyama, S., Kikukawa, M., Mitoro, A., Tsujinoue, H., Nakatani, T., Yamazaki, M., Yoshiji, H., Toyokawa, Y., Yoshikawa, M. and Fukui, H.** : Antitumor effect of electrochemotherapy on colorectal carcinoma in an orthotopic mouse model. *Int. J. Oncol.* **14** : 321-326, 1999.
- 24) **Orlowski, S. and Mir, L. M.** : Cell electroporation ; a new tool for biochemical and pharmacological studies. *Biochem. Biophys. Acta.* **1154** : 51-63, 1993.
- 25) **Domenge, C., Orlowski, S., Lubinski, B., Debaere, T., Schwaab, G., Belehradec, J. Jr. and Mir, L. M.** : Antitumor electrochemotherapy. New advances in the clinical protocol. *Cancer* **77** : 956-963, 1996.
- 26) **Heller, R., Jaroszeski, M. J., Glass, L. F., Messina, J. L., Rappaport, D. P., DeConti, R. C., Fenske, N. A., Gilbert, R. A., Mir, L. M. and Reintgen, D. S.** : Phase I/II trial for the treatment of cutaneous and subcutaneous tumors using electrochemotherapy. *Cancer* **77** : 964-971, 1996.
- 27) **Rols, M. P., Bachaud, J. M., Giraud, P., Chevreau, C., Roche H. and Teissie J.** : Electrochemotherapy of cutaneous metastasis in malignant melanoma. *Melanoma Res.* **10** : 468-474, 2000.
- 28) **Sersa, G., Cemazar, M., Parkins C. S. and Chaplin D. J.** : Tumor blood flow changes induced by application of electric pulses. *Eur. J. Cancer* **35** : 672-677, 1999.