

培養肝癌細胞に及ぼす DIBUTYRYL CYCLIC AMP の影響

奈良県立医科大学病態検査学教室

岡本 康幸, 辻井 啓之, 中野 博

奈良県立医科大学第3内科学教室

松本 真, 中山 雅樹, 辻井 正

EFFECT OF DIBUTYRYL CYCLIC AMP ON THE GROWTH OF CULTURED HEPATOMA CELLS

YASUYUKI OKAMOTO, HIROYUKI TSUJII and HIROSHI NAKANO

Department of Clinico-Laboratory Diagnostics, Nara Medical University

MAKOTO MATSUMOTO, MASAKI NAKAYAMA and TADASU TSUJII

Third Department of Internal Medicine, Nara Medical University

Received January 9, 1989

Summary: Effects of dibutyryl cyclic AMP (DBcAMP) on the growth of cultured hepatoma cells were studied with rat Morris hepatoma cells (HTC) and human hepatoma cells (HepG₂).

DBcAMP inhibited DNA synthesis in HTC without cytotoxicity. DBcAMP also induced tyrosine aminotransferase (TAT) in HTC. DBcAMP inhibited DNA synthesis in HepG₂ at each time point during the 24h-culture. DBcAMP delayed the population doubling time of HepG₂ and the time at which the percentage of the cells with mitosis reached a peak.

These observations suggested that DBcAMP has an inhibitory effect on the growth of hepatoma cells by elongating the cell cycle.

Index Terms

dibutyryl cyclic AMP, cultured hepatoma cells

緒 言

Dibutyryl cyclic AMP (DBcAMP) は、最近、ショックの治療薬として臨床応用が可能となった薬剤であるが¹⁾²⁾、本剤の主要な薬理作用はすべて cyclic AMP の analog としてのものであり、当然、広範かつ多彩な作用を有することが予測される。本剤は、また、以前よりある種の癌細胞に作用して増殖を抑制したり分化を誘導することが知られており^{3)~6)}、とくに、ヒトの悪性黒色腫や神経芽細胞腫については比較的詳細に検討されている⁷⁾⁸⁾。肝癌も、本剤の増殖抑制作用が期待されるもの

として、ラットやマウスの培養肝癌細胞を用いた検討は多くみられている^{9)~15)}。しかも、最近、臨床的に本剤を切除不能な肝癌患者に投与することにより、今まで有効な対策の乏しかった門脈腫瘍塞栓が消失したとする極めて興味ある報告が出され¹⁶⁾、われわれも同様の効果を経験し得たことから¹⁷⁾、本剤の肝癌治療への応用が注目される。

そこで今回、われわれは、ラット Morris 肝癌細胞 HTC¹⁸⁾ およびヒト肝癌細胞 HepG₂¹⁹⁾ に対する DBcAMP の増殖抑制効果、機能変化の指標としての誘導酵素への影響について検討をおこない、興味ある成績を得

たので報告する。

実験方法

A. 細胞および試薬

Hepatoma tissue culture cells (HTC, ラット Morris 肝癌細胞 7288 c), newborn bovine serum (NBS), fetal bovine serum (FBS), 非必須アミノ酸 (NEAA), Eagle の minimum essential medium (MEM) および Dulbecco の MEM²⁰⁾ は, Flow Laboratories Inc. USA より購入した。[³H] thymidine (TdR) は, [³H] thymidine (>15 Ci/mmol, NEN Research Products) を用いた。その他の試薬は, 半井化学薬品(株)より購入し, ヒト肝癌細胞 HepG₂ は, 京都大学医学部第2内科福田善弘博士より供与されたものを用いた。また, DBcAMP は, 第一製薬(株)より供与された。

B. 培養方法

HTC は, 10% NBS と NEAA を含む Eagle の MEM 中に培養した。HTC は, 2×10^6 cells/ml に浮遊し, 96穴および 35 mm 径の plastic dish に 50,000 cells/cm² となるように播種し, 24時間培養した後 DBcAMP を含んだ medium に交換し, 実験に用いた。HepG₂ は, 10% FBS を含む Dulbecco の MEM 中に培養した。HepG₂ は, 4×10^4 cells/ml に浮遊し, HTC の場合と同様の dish に, 10,000 cells/cm² となるように播種し, 3日間培養した後 DBcAMP を含んだ medium に交換し, 実験に用いた。培養条件は, 37°C で, 5% CO₂ および 95% 空気下で行った。なお DBcAMP は, medium に終濃度 1 mM となるよう添加して用いた。

C. DNA 合成能の測定

DNA 合成能は, DNA への TdR の取り込みによって測定した。

HTC では, 96穴の dish で20時間培養し, さらに4時間 1 μ ci/well の TdR を加えて培養し, その後トリプシン処理にて細胞を剥離し, 7% の cold trichloric acid (TCA) を加え, 酸不溶性部分を cell harvester を用いて glass fiber filter に吸着させ, その比放射活性を液体シンチレーションカウンターにて測定した。HepG₂ でも同じように測定したが, TdR の投与法は次のように変えた。すなわち, 投与量は 0.1 μ ci/well とし24時間を6分割した各4時間での取り込みを経時的に測定した。また酸不溶性部分の DNA 量は, Setaro と Morley²¹⁾ の蛍光法により測定した。

D. 誘導酵素の組織化学的染色

HTC を3日間培養後, Dulbecco の phosphate-buf-

fered saline (PBS) にて細胞を3回洗浄し, 自然乾燥固定した後, 組織化学的に tyrosine aminotransferase (TAT) および γ -glutamyl transpeptidase (γ -GTP) を染色した。TAT は Thompson と Thomkins²²⁾ の方法, γ -GTP は Harada ら³²⁾ の方法で染色した。判定に際しては, 全く染色されない場合を陰性, 一様な染色像を得られた場合を陽性とした。

E. 細胞数および核の mitosis を有する細胞の出現率の算出

HepG₂ を 35 mm 径の dish で培養し, 24時間を6分割した各24時間で細胞を Giemsa 染色し, 光顕的に dish の任意の辺縁から中心にむかって細胞を1,000個ずつ2回観察し, 核の mitosis の出現率を求めた。細胞数は, 単層培養をトリプシンにて分散処理した後, 血球算定盤にて測定した。

F. その他

培養終了時の細胞の viability は, トリパンブルー染色により光顕的に観察し, 同時に培養前後の medium 中の lactate dehydrogenase (LDH) 活性の差を遊離酵素の1つとして測定した。データはすべて6 well の平均 (±標準偏差) で表現し, 有意差検定には Student の t-test を用いた。

結 果

A. HTC の DNA 合成能に対する DBcAMP の影響

HTC の DNA に取り込まれた TdR の量は, Control で 290.21 ± 22.07 (dpm/ng DNA, 以下同じ), DBcAMP 1 mM 投与では 98.62 ± 10.17 であった。DBcAMP 投与により有意な DNA 合成能の低下が認められた ($p < 0.001$)。

また, 培養終了時の細胞の viability は, Control および DBcAMP 投与群で差はなく, medium 中の LDH 活性は, Control で 26 ± 5 (IU/l, 以下同じ), DBcAMP 投与群で, 19 ± 6 であり, 有意差はなかった。

B. HTC の誘導酵素に対する DBcAMP の影響

HTC における TAT および γ -GTP の組織化学的染色像に対する DBcAMP の影響を検討した。その結果, TAT は, Control では染色されなかったが, DBcAMP 投与により軽度の陽性像が得られ, 本酵素の誘導が認められた。逆に, Control で陽性であった γ -GTP の発現は, DBcAMP 投与により抑制された。

C. HepG₂ の増殖に対する DBcAMP の影響

HepG₂ の DNA への TdR の取り込みの推移を Fig. 1 に示した。いずれの時点でも DBcAMP は TdR の取り込みを抑制し, またそれは DBcAMP が 100 μ M お

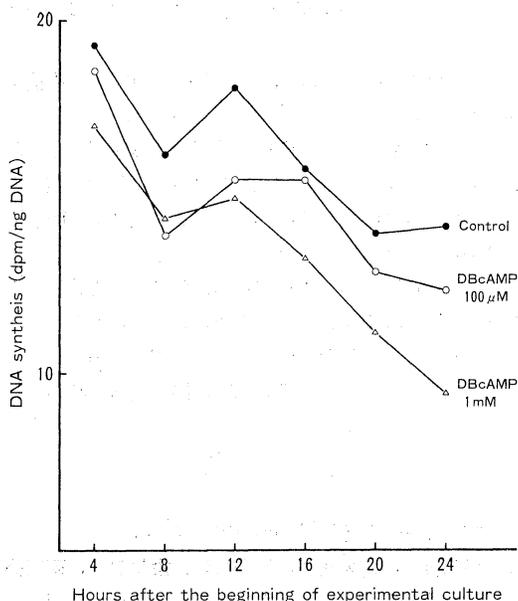


Fig. 1. Effect of DBcAMP on DNA synthesis of HepG₂.

DNA synthesis was determined in every 4-h interval during the culture.

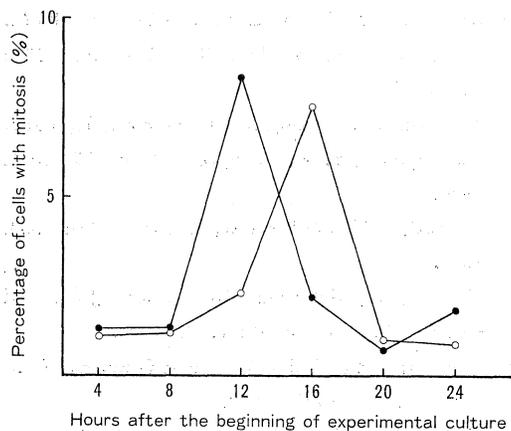


Fig. 2. Effect of DBcAMP on mitotic phase of HepG₂ cells.

よび 1 mM の二点ではほぼ濃度依存性の作用を示した。

光顕的に認められる核の mitosis 像の出現の比率の推移は、Fig. 2 に示すように、Control では実験培養開始 12 時間後に最大値 8.3% を示したが、DBcAMP 投与では 16 時間後に最大値 7.5% を示した。なお、その他の時点では、いずれも比率はほぼ 1-2% にとどまっていた。DBcAMP 投与は、核の mitosis 出現の比率そのものの低下に作用するよりは、むしろそのピーク時期を遅らせ

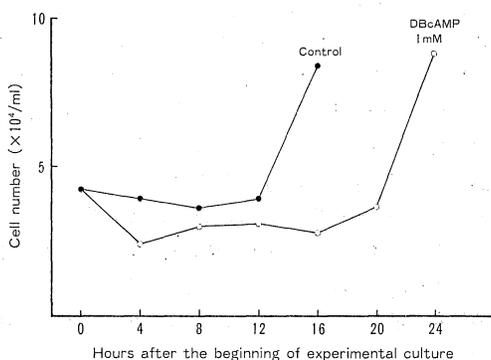


Fig. 3. Effect of DBcAMP on change of cell number of HepG₂.

るように作用するものと考えられた。

また、細胞数の推移では、Fig. 3 に示すように、前値 4.25 ± 2.8 ($\times 10^4$ cells/ml, 以下同じ) に対して、Control では実験培養開始 16 時間後に 8.45 ± 7.0 とほぼ倍加したが、DBcAMP 投与では 20 時間まで増加せず、24 時間後に 8.75 ± 7.1 となり、倍加する時点の遅延が認められた。

考 察

HTC の増殖に対する DBcAMP の影響については諸家により報告されているが^{9)~11)13)}、とくに van Wijk ら⁹⁾は、高濃度 (1-2 mM) でみられる増殖の抑制は非特異的な毒性によるものとし、Reuber H 35 すなわちラット肝癌細胞 H-4-II-E-C3 などで見られる特異的な増殖抑制とは異なるとした。さらに Hargrove と Graner¹³⁾は、培養に用いる血清中の酵素が DBcAMP から adenosine 様毒性物質を生じることが増殖抑制の要因であることを報告している。しかし、われわれの成績では、培養細胞から medium 中に遊離された酵素活性や細胞の viability の違いなどの毒性を示唆する所見は得られなかった。ただし、今回の検討では DBcAMP の投与期間は 24 時間と短期であり、また細胞の増殖機能のうちでも DNA への TdR の取り込みについてのみの検討であるため、毒性があまり前面に出なかったのかもしれない。今後細胞密度や培養期間などの実験条件の変化も含めた多角的な検討が必要であろう。

DBcAMP による TAT の誘導については Reuber H 35 においては認められているが^{24)~26)}、HTC においてはその作用があるとする成績²⁷⁾とないとする成績²⁸⁾があり、一致した見解は得られていない。ただし、同じように TAT を誘導することの知られているステロイドホルモンが HTC で本酵素を誘導することは報告され

ている²²⁾。われわれの成績では van Rijn らの報告²⁷⁾と同様に、軽度の TAT 誘導を認めた。DBcAMP による TAT 誘導の機序についてはかなり研究されており、gene の transcription および translation の両方に作用しているものと考えられている²⁰⁾。TAT は、ラット肝細胞での検討などでは、静止期細胞に出現することが特徴的であるが、 γ -GTP は逆に増殖期細胞に出現することを特徴としており³⁰⁾、腫瘍細胞の特性の1つとして重視される²³⁾。DBcAMP は、この γ -GTP の発現を抑制する傾向を示した。これらの酵素に対する DBcAMP の態度は、特異的な誘導および誘導抑制というよりはむしろ細胞の増殖を抑制し、分化に導くことによる副次的な現象のようにも思われる。

以上のようなラット肝癌細胞に対する DBcAMP の作用からみて、ヒト肝癌細胞においても類似した作用が期待される。しかし、ヒト培養肝癌細胞について DBcAMP の影響を検討した報告は、われわれが検索し得た範囲では認められておらず、その詳細は明らかにされていない。

そこでまず今回、われわれは、HepG₂ を用いて24時間経時的に DBcAMP の増殖への影響を検討した。その結果、DNA への TdR の取り込みはどの時点でも DBcAMP により抑制を受け、また細胞の分裂期が遅延する傾向が認められた。しかも、mitosis のピーク時での比率そのものに対する明らかな抑制作用はみられなかった。このことは、DBcAMP は、細胞周期の1部あるいはすべての時期を延長させることにより増殖を抑制するものであることを示唆しており、一般の抗癌剤のような toxic な作用の関与は少ないものと考えられる。

以上の成績および本剤の性質から考えて、DBcAMP が培養肝癌細胞に示す作用の主体は、おそらく細胞内情報伝達機構や代謝系などを介したものであろうと推測される。またそれは、細胞を分化に導く方向に作用している可能性が強い。今回われわれは、DBcAMP の長期投与による影響や形態学的な検討はおこなわなかったが、すでに他の培養癌細胞の中には、DBcAMP 投与により形態学的に分化を示すものも知られている⁸⁾³¹⁾。現時点では、本薬剤を単独で癌治療に臨床応用できる可能性は少ないが、今後、他の薬剤との併用や投与方法の工夫などによってユニークなメカニズムをもつ抗癌剤の1つとしてさらに積極的な臨床応用が可能となることが期待される。

結 論

ラット Morris 肝癌細胞 HTC およびヒト肝癌細胞

HepG₂ に対する DBcAMP の影響について検討をおこない、次の成績を得た。

- ① DBcAMP (1 mM) は、HTC の DNA 合成能を抑制したが、明らかな毒性は示さなかった。
- ② DBcAMP は、HTC に TAT 誘導作用を示したが、逆に HTC にみられる γ -GTP の発現を抑制した。
- ③ DBcAMP は、24時間経時的に測定した HepG₂ の DNA 合成能を、いずれの時点でも抑制した。
- ④ DBcAMP は、HepG₂ の細胞数の倍化時期および mitosis 期細胞数がピークとなる時期を遅延させた。
- ⑤ 以上より、DBcAMP は、肝癌細胞の細胞周期に影響することにより、増殖の抑制に働く傾向が認められた。

文 献

- 1) 吉武潤一：日本臨牀 38: 1914, 1980.
- 2) 西川英郎, 森本美典, 岡野秀治, 市川毅彦, 藤田公明, 小寺 崇, 金丸正泰, 中野 赴, 竹沢英郎：心臓 16: 450, 1984.
- 3) 及川 淳：代謝 17: 1427, 1980.
- 4) Cho-Chung, Y.S., Clair, T., Bodwin, J.S. and Berghoffer, B.: Science 214: 77, 1981.
- 5) Sherman, M.L., Shafman, T.D. and Kufe, D.W.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 134: 845, 1986.
- 6) Yoshida, H., Azuma, M., Yanagawa, T., Yura, Y., Hayashi, Y. and Sato, M.: Cancer 57: 1011, 1986.
- 7) Prasad, K.N. and Kumar, S.: Cancer 36: 1338, 1975.
- 8) Giuffre, L., Schreyer, M., Mach, J.-P. and Carrel, S.: Cancer 61: 1132, 1988.
- 9) van Wijk, R., Wicks, W.D. and Clay, K.: Cancer Res. 32: 1905, 1972.
- 10) Granner, D.K., Sellers, L., Lee, A., Butters, C. and Kutina, L.: Arch. Biochem. Biophys. 169: 601, 1975.
- 11) Bevers, M.M., van Rijn, J. and van Wijk, R.: FEBS Lett. 72: 275, 1976.
- 12) Hamman, H.C., Simpson, J.A. and Ledford, B.E.: Arch. Biochem. Biophys. 204: 277, 1980.
- 13) Hargrove, J.L. and Granner, D.K.: J. Cell. Physiol. 111: 232, 1982.
- 14) Hamman, H.C. and Ledford, B.E.: Arch. Biochem. Biophys. 213: 620, 1982.

- 15) Torii, M., Miyake, K. and Kanai, K.: *Gann* 75: 1083, 1984.
- 16) 石井公道, 白崎敬二, 杉本政直, 松木茂樹, 新井重紀, 荻部ひとみ, 國分茂博, 山田伸夫, 柴田久雄, 岡部治弥, 草野正一, 大部 誠, 奥平雅彦: *日本医事新報* No. 3339: 31, 1988.
- 17) 松本 真, 岡本康幸, 中野 博, 中山雅樹, 辻井正: *肝臓* 29 (Suppl.): 255, 1988.
- 18) Thompson, E.B., Tomkins, G.M. and Curran, J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 56: 296, 1959.
- 19) Knowles, B.B., Howe, C.C. and Aden, D.P.: *Science* 209: 497, 1980.
- 20) Dulbecco, R. and Freeman, G.: *Virology* 8: 396, 1959.
- 21) Sataro, F. and Morley, C.G.D.: *Anal. Biochem.* 71: 313, 1976.
- 22) Thompson, E.B. and Tomkins, G.M.: *J. Cell. Biol.* 49: 921, 1971.
- 23) Harada, M., Okabe, K., Shibata, K., Masuda, H., Miyata, K. and Enomoto, M.: *Acta Histochem. Cytochem.* 9: 168, 1976.
- 24) Snoek, G.T., Voorma, H.O. and van Wijk, R.: *Biochim. Biophys. Acta* 655: 107, 1981.
- 25) Snoek, G.T., Voorma, H.O. and van Wijk, R.: *Eur. J. Biochem.* 123: 217, 1982.
- 26) van Wijk, R., Loesberg, L. and Snoek, G.T.: *Biochimie* 65: 643, 1983.
- 27) van Rijn, H., Bevers, M.M., van Wijk, R. and Wicks, W.D.: *J. Cell. Biol.* 60: 181, 1974.
- 28) Butcher, F.R., Becker, J.E. and Potter, V.R.: *Exp. Cell Res.* 66: 321, 1971.
- 29) Noguchi, T., Diesterhaft, M. and Granner, D.K.: *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 14: 529, 1981.
- 30) 市原 明: *日本臨牀* 44: 361, 1986.
- 31) 大林 太: *岐阜大医紀* 33: 645, 1985.