

VP16-213 (Etoposide) の絨毛癌に対する 抗腫瘍効果についての基礎的研究

千葉大学医学部産科婦人科学教室

松井 英雄 小林 治 城武 昇一
関谷 宗英 高見沢裕吉

Anticancer Effect of VP16-213 (Etoposide) on Three Choriocarcinoma Cell Lines

Hideo MATSUI, Osamu KOBAYASHI, Shoichi SHIROTAKE,
Souei SEKIYA and Hiroyoshi TAKAMIZAWA

Department of Obstetrics and Gynecology, Chiba University School of Medicine, Chiba

概要 新しい抗癌剤である VP16-213 の 3 株の培養絨毛癌細胞 (BeWo, HCCM-5, SCH 株) に対する効果を, 生存率の変化, DNA 合成の抑制により MTX, Act-D と比較した。

(1) VP16-213 100mg 点滴静注後の血中濃度は, 1 時間後に $10.3 \pm 1.19 \mu\text{g/ml}$, 12 時間後に $1.35 \pm 0.38 \mu\text{g/ml}$ となった。

(2) DNA 合成の抑制; VP16-213 による ^3H -thymidine 取り込みは, 3 株とも 70% 程度に抑制された。これは, MTX, Act-D の臨床使用濃度における抑制と同レベルであった。

(3) 細胞生存率; VP16-213 による生存率は, 6 日目には 3 株とも 10% 以下となり, MTX, Act-D と同程度あるいはそれ以上の効果が見られた。

(4) VP16-213 の薬剤動態は, MTX と同様な短時間の取り込み, 放出を示した。

以上の事より, 3 株の培養絨毛癌細胞を使った *in vitro* における検討では, VP16-213 の抗腫瘍効果は, MTX, Act-D と同等あるいはそれ以上と考えられる。

Synopsis A new anticancer drug, VP16-213 was studied *in vitro* to determine its effect upon ^3H -thymidine uptake and the survival rate of choriocarcinoma cells in comparison with the effect of MTX and Act-D. Three human choriocarcinoma cell lines, BeWo, HCCM-5 and SCH were used. The results were as follows;

(1) Serum VP16-213 levels were $10.3 \pm 1.19 \mu\text{g/ml}$ and $1.35 \pm 0.38 \mu\text{g/ml}$ at one hour and 12 hours after the administration of 100mg of VP16-213, respectively.

(2) In those three cell lines, VP16-213 suppressed cellular ^3H -thymidine uptake by 70% as compared with the control.

(3) On the sixth day after exposure to VP16-213, the survival rate of choriocarcinoma cells was less than 10% in each of the three cell lines.

(4) One of the most prominent pharmacodynamic characteristics of VP16-213 was a rapid influx and efflux mechanism as seen in MTX.

From the above, the anticancer effect of VP16-213 upon those three cell lines was supposed to be equal to or more than those of MTX and Act-D.

Key words: Choriocarcinoma cell lines • VP16-213 • Methotrexate • Actinomycin-D

緒 言

Methotrexate (MTX)¹²⁾, Actinomycin-D (Act-D)²⁰⁾, さらには MAC 療法 (MTX, Act-D, Cyclophosphamide) を代表とする多剤併用療法の導入により, 絨毛性疾患の寛解率は, 侵入奇胎, 非転移性絨毛癌では 100%, 転移性絨毛癌でも 50%

に向上している⁴⁾⁸⁾。一方 MAC 抵抗性症例や再発症例に対しては, CHAMOMA¹⁶⁾, CDDP + BLM²¹⁾, Modified MAC (MACII)⁷⁾²⁷⁾などの治療法が試みられているが, いまだ有効な方法は見られない。

最近 Newlands et al.^{15)~17)}は, 難治性絨毛癌に

対し、新しい抗癌剤 VP16-213 (Etoposide) を中心とした多剤併用療法を試み、60~80%の寛解率を報告している。そこで今回、VP16-213, MTX および Act-D の血中濃度の変化に基づき、絨毛癌培養細胞株に対する効果を検討したので報告する。

実験材料および方法

細胞株

慈恵会医科大学産婦人科伊藤治英、中本 治両博士より分与された HCCM-5株¹⁴⁾、大日本製薬組織培養センターより購入した BeWo 株¹⁹⁾、千葉大学微生物学教室桑田次男博士より分与された SCH 株³⁾を用いた。

培養方法

細胞株は RPMI1640 培地 (日水製薬) に 100 単位/ml のペニシリン G カリウム (明治製菓)、100 μ g/ml の硫酸ストレプトマイシン (明治製菓) および 10% 牛新生児血清 (Flow Lab.) を添加した培養液を用い、ガラス培養瓶 (フラット) に接種し、5% CO₂、加湿恒温器 (Forma Sci.) 中 37°C にて静置単層培養した。

薬剤

抗癌剤は MTX (日本レーダー)、Act-D (萬有製薬)、VP16-213 (Etoposide: 日本化薬) の 3 剤を使用した。添加濃度は各々の抗癌剤の臨床使用量の最高血中濃度および 12 時間血中濃度を基準として設定した。また添加時間は Act-D のみ 1 日 2 時間とし、他の 2 剤は 48 時間とした。

生存率の判定

1~3 $\times 10^5$ 個/ml の絨毛癌培養細胞株を plastic culture bottle (Falcon 3013) に接種し、5% CO₂ 37°C にて培養した。接種 24~48 時間後より MTX 2 $\times 10^{-8}$ M, Act-D 10 $^{-8}$ M, VP16-213 1 μ g/ml で 48 時間処理した (Act-D のみ 1 日 2 時間連日処理とした)。処理後 2, 4, 6, 8 日目の生存率を Oku et al.¹⁸⁾の方法に従い、生細胞の中性赤の取り込みを吸光度計 (日立モデル 220) を用いて測定した。

³H・thymidine の取り込み

Ball et al.⁶⁾の方法に従って、滅菌したガラス Scintillation vial に各細胞を約 10⁵個/ml 接種し、72 時間静置単層培養した。種々の濃度の MTX, Act-D, VP16-213 で 1 時間 (MTX のみ 48 時間) 処

理後 48 時間 incubation した。薬剤で処理したのち、³H-thymidine (Spec. act. 15Ci/mmol, New England Nuclear Corp.) 1 μ Ci/ml で 30 分間 incubation, 次いで冷 BSS (千葉血清), 冷 1.5% 過塩素酸で洗浄した。洗浄後純エタノール 10ml を添加し、10 分後洗浄, 更に 5% 過塩素酸 1ml を添加, 70°C 1 時間加湿後 4°C で冷却した。Triton X シンチレーター 10ml を添加後シンチレーションカウンター Rack Beta モデル 1215 (LKB wallac) でその放射活性を測定した。

細胞内取り込みと放出

1 $\times 10^6$ 個/ml の絨毛癌細胞株を plastic culture bottle (Falcon 3046) に接種し、5% CO₂ 37°C にて 48~72 時間培養した。培養後 ³H-MTX (Spec. act. 238mCi/mmol, Amersham International Limited), ³H-Act-D (Spec. act. 8.7Ci/mmol, Amersham International Limited), ³H-VP16-213 (日本化薬より分与) を加え、30~240 分後の細胞内濃度を Tsuruo et al.²⁹⁾変法に従い測定した。また 120 分処理後 Hank's BSS (千葉血清) で 2 回洗浄し、薬剤を含まない培養液中に放出される ³H 濃度を経時的に測定した。

研究成績

1. 血中濃度

MTX 20mg 筋注, あるいは 450mg 点滴静注時の経時的な MTX 血中濃度を図 1 に示した。MTX 20mg 投与では 1 時間後に最高値を示し、以後漸減し、12 時間後には 10⁻⁷M に低下した。一方 MTX 450mg 点滴静注では 3 時間後にピークを示し、以後減少するが 12 時間後でも 10⁻⁶M の濃度を維持していた。

次に VP16-213 100mg あるいは 200mg を 1 時間で点滴静注した後、1, 3, 6, 12, 24 時間後の血中濃度を測定した (図 2)。100mg 点滴静注後 VP16-213 の血中濃度は 1 時間で 10.3 $\pm$ 1.19 μ g/ml と最高値を示し、以後漸減し 12 時間で 1.35 $\pm$ 0.38 μ g/ml となつた。200mg 点滴後の最高血中濃度は 24.3 μ g/ml であつた。

以上の結果から in vitro における MTX, VP16-213 の濃度は各々 2 $\times 10^{-8}$ M, 1 μ g/ml とし、処理時間は 48 時間とした。また Tattersall et al.²⁸⁾

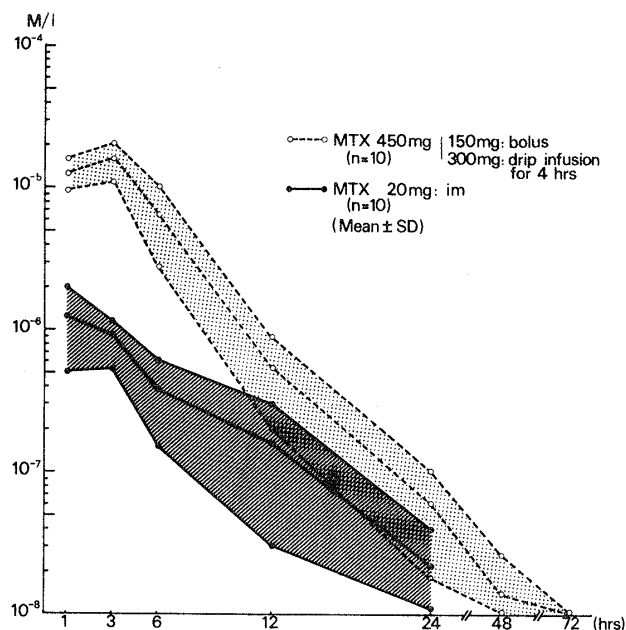


図1 Serum MTX concentration

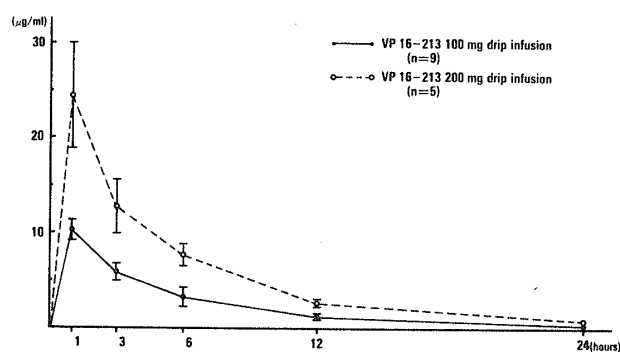
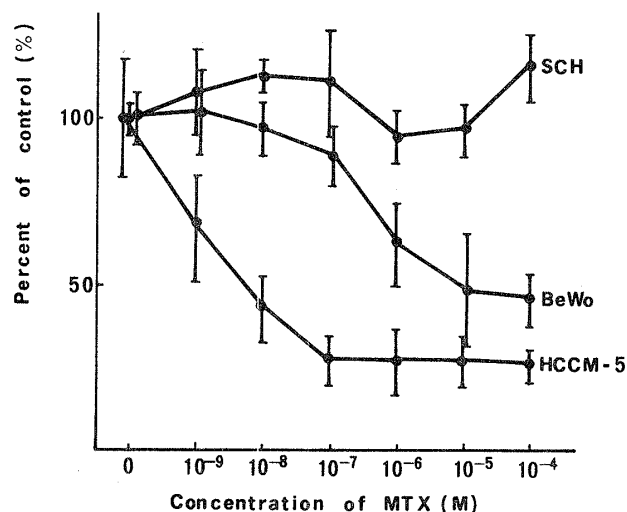
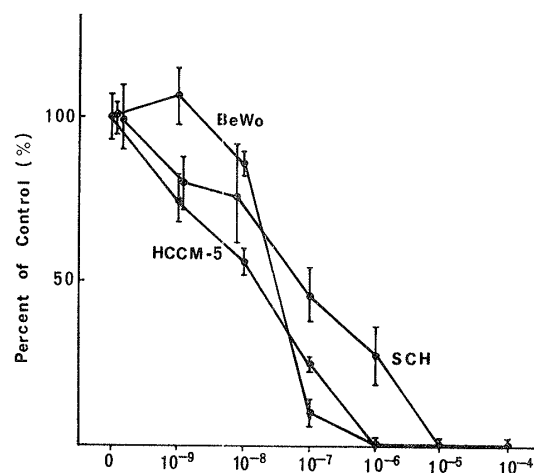
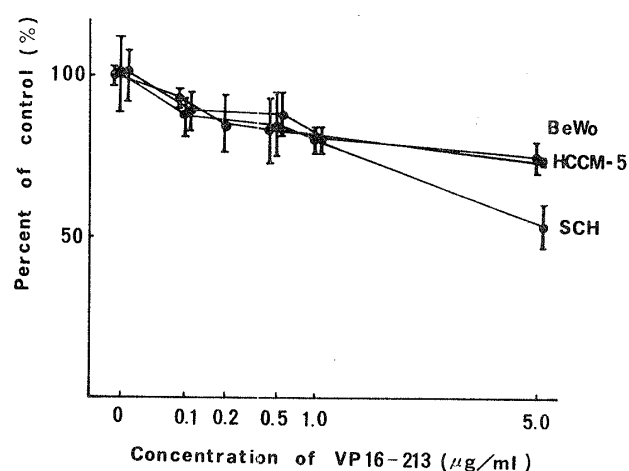


図2 Serum VP 16-213 concentration

によると, Act-D の血中濃度は0.5mg 静注後2時間で 5×10^{-9} M と報告されているので, 処理濃度は 10^{-8} M, 処理時間は1日2時間とした。

2. DNA 合成に及ぼす影響

3剤の各種濃度処理時における ^3H -thymidine 取り込みによるDNA合成の変化を図3～5に示した。MTX: HCCM-5株のDNA合成は 10^{-9} Mで抑制されたが, SCH株では, 10^{-4} Mでも全く抑制されず, MTXに対する感受性は, HCCM-5, BeWo, SCH株の順であった¹⁾。Act-D: 10^{-7} MではSCH株45%, HCCM-5株25%, BeWo株10%にDNA合成は抑制されたが, $10^{-8} \sim 10^{-9}$ Mではいずれの細胞株とも70～80%の抑制であり, 細胞株間のAct-D感受性には, 差を認めなかった²⁾。

図3 Effect of MTX on the ^3H ・TdR uptake図4 Effect of Actinomycin-D on the ^3H ・TdR uptake図5 Effect of VP16-213 on the ^3H ・TdR uptake

VP16-213: $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度におけるDNA合成は, いずれの細胞株とも70%程度の抑制であり,

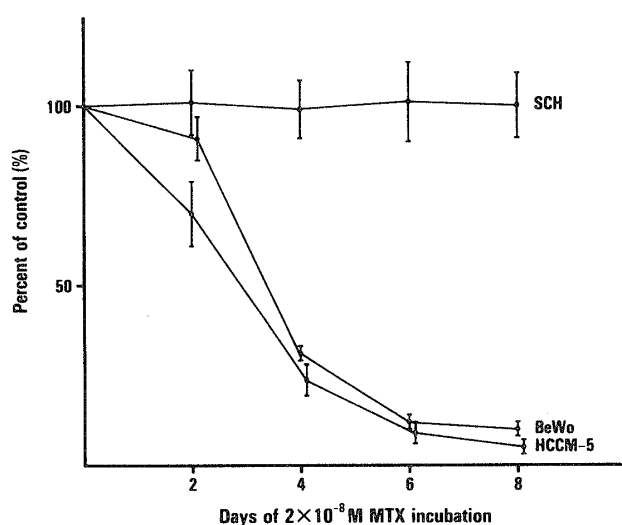


図6 Survival curve treated with MTX

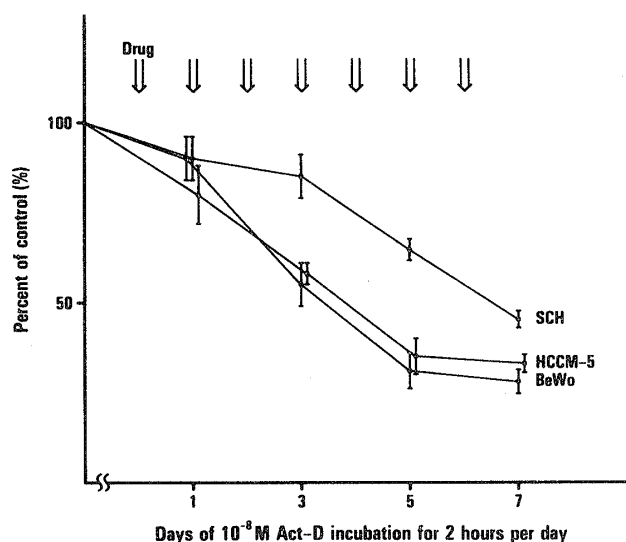


図7 Survival curve treated with Actinomycin-D

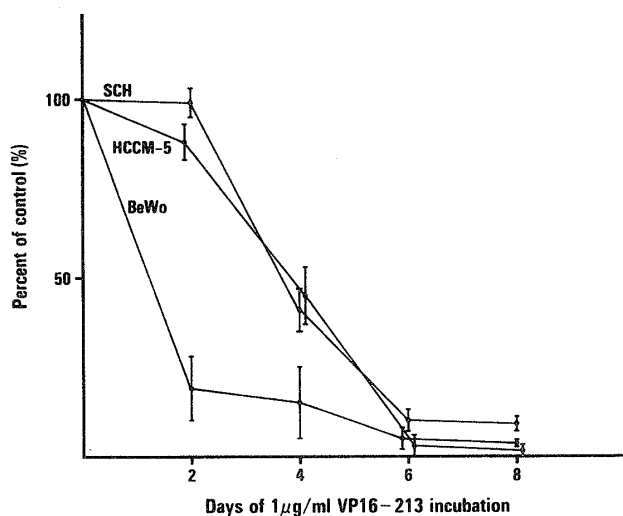
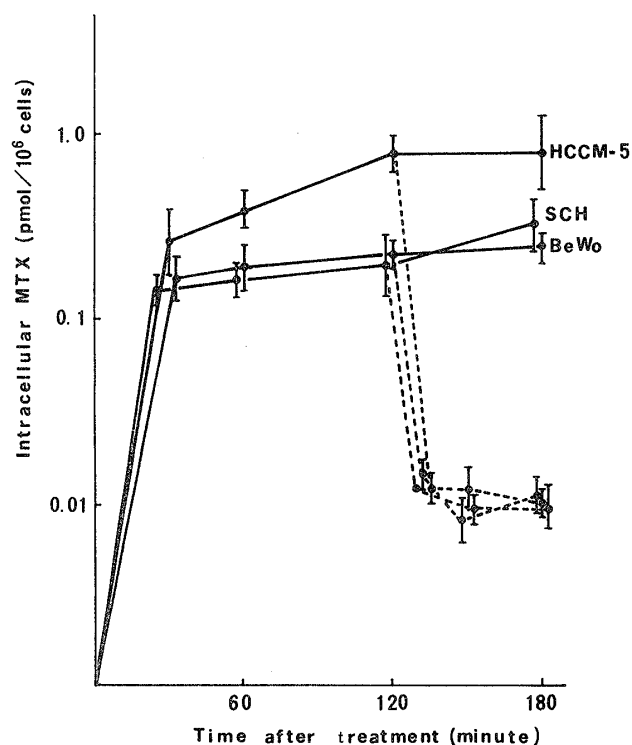


図8 Survival curve treated with VP16-213

図9 Influx and efflux of ^3H -MTX

また他の2剤に比し、濃度依存性のDNAの合成抑制は示さなかった。

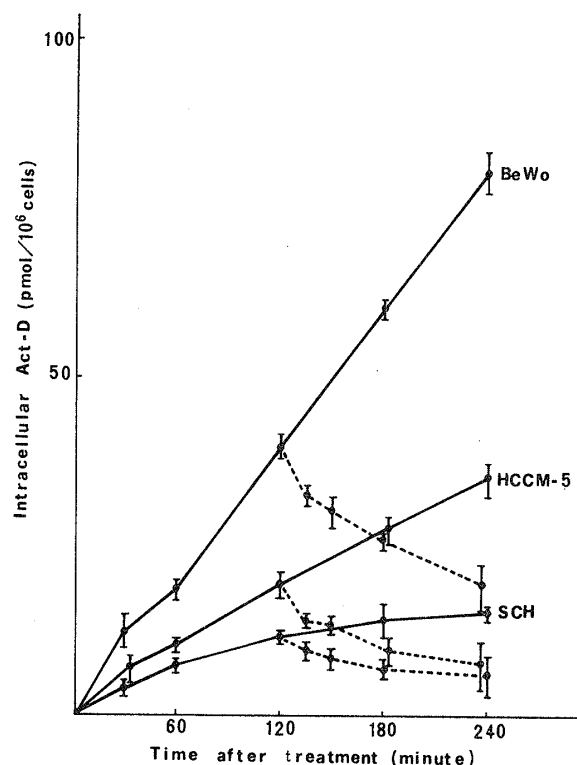
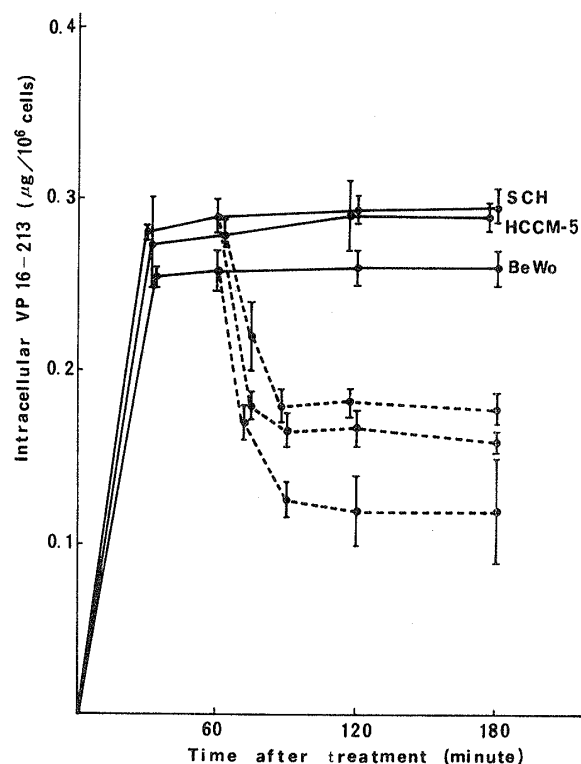
3. 生存率に及ぼす影響

$2 \times 10^{-8} \text{M}$ MTX 処理により BeWo, HCCM-5 株の生存率は経日的に抑制されたが, SCH 株では全く抑制されなかった(図6). 10^{-8}M Act-D 処理では, 3株とも感受性に差がなく生存率は経日的に抑制された(図7). 一方 VP16-213 処理では BeWo が他の2株より感受性であり, 6日目には3株とも生存率は10%以下となり差を認めなかった(図8).

以上の結果から, VP16-213の絨毛癌細胞に対する殺細胞効果は MTX, Act-D に匹敵する効果を有することが判明した。

4. 細胞内濃度の変化

^3H -MTX, ^3H -Act-D, ^3H -VP16-213の細胞内濃度の変化を図9~11に示した. MTX, VP16-213では処理後30分で細胞内薬剤濃度はプラトーに達したのに対し, Act-Dは経時的に細胞内濃度が上昇する傾向が見られた. また細胞よりの薬剤の放出も MTX, VP16-213では比較的急速であったのに対し, Act-Dでは緩慢な放出が認められた。

図10 Influx and efflux of ^3H ・Act-D図11 Influx and efflux of ^3H ・VP16-213

考 察

VP16-213は Podophyllotoxin 誘導体であり、その作用機序は DNA の 2 本鎖を切断することによ

るとされている²⁶⁾。臨床的には、小細胞肺癌、卵巣癌などの固型癌²³⁾²⁵⁾や白血病、ホジキン病⁹⁾などで有効性が報告されている。一方 Newlands et al.¹⁷⁾は、26例の絨毛癌に対し、VP16-213単剤治療により62%、EMA/CO など VP16-213を含む多剤併用療法¹⁵⁾¹⁶⁾により79~84%の寛解率を報告し、いわゆる難治性絨毛癌に対する本剤の有効性が注目されている。しかし VP16-213の絨毛性疾患に対する基礎的研究、特に従来の MTX, Act-D とその抗腫瘍効果を比較した報告はない。そこで今回 3 剤の血中濃度の変化に基づき、3 株の培養絨毛癌細胞における抗腫瘍効果を、DNA 合成の抑制、生存率の変化から比較した。

In vitro における薬剤の抗腫瘍効果を比較する場合問題となる点は、薬剤濃度及び接触時間をいかに設定するかということである。薬剤濃度は臨床使用量による最高血中濃度の1/10あるいは12時間血中濃度により決定するのが一般的である。今回の MTX, VP16-213の濃度は、実際の血中濃度測定により各々 $2 \times 10^{-8}\text{M}$, $1\mu\text{g/ml}$ とし、Act-D は Tattersall et al.²⁸⁾の報告に基づき、 10^{-8}M とした。また接触時間は血中濃度の変化により MTX, VP16-213は48時間、Act-D は連日 2 時間処理とした。

これら薬剤処理による DNA 合成の抑制、生存率の変化から、VP16-213は 3 種の培養絨毛癌細胞に対して通常の臨床使用量で、MTX, Act-D と同等あるいはそれ以上の効果のあることが判明した。

MTX, Act-D の耐性機序の一つに細胞内薬剤濃度の低下があげられている²⁾¹⁰⁾¹³⁾²⁴⁾。また Seeber²²⁾による VP16-213抵抗性株における薬剤の取り込みは感受性株の1/3との報告もある。今回 MTX, Act-D, VP16-213の細胞内取り込み、放出について比較すると、MTX, VP16-213の細胞内濃度は投与後急速に上昇し、30分以内に一定の濃度となった¹⁾²²⁾が、Act-D は時間とともにゆつくりと上昇している。またその放出も MTX, VP16-213は短時間のうちに薬剤が細胞外に放出されるのに対し、Act-D では比較的ゆつくり放出されている。このように VP16-213の薬剤動態は Act-D とは異

なり, MTX と同様な変化が確認された。

今後さらに *in vivo* や臨床上の検討を要すると思われるが, 3種の培養絨毛癌細胞で見る限り, VP16-213の抗腫瘍効果は, MTX, Act-D と同等あるいはそれ以上と考えられる。

文 献

1. 海寶てる代, 関谷宗英, 城武昇一, 高見沢裕吉: 各種絨毛癌細胞株の MTX 感受性と耐性機構. 日産婦誌, 35: 1611, 1983.
2. 松井英雄, 城武昇一, 小林 治, 関谷宗英, 高見沢裕吉: *In vitro* における培養絨毛癌細胞株の AMB の Act-D 併用による抗腫瘍効果増強に関する研究. 日産婦誌, 39: 36, 1987.
3. 大星章一, 吉田紘一, 清藤 勉, 下里幸雄, 小出勉, 佐野量造, 北岡久三: 胃悪性絨毛上皮腫細胞培養株の樹立とその *in vitro* ゴナドトロピン産生. 日癌会総会記事, 59, 1972.
4. 高見沢裕吉, 小林 治, 城武昇一, 石毛英男, 関谷宗英: 絨毛癌の再発と治療. 産婦の実際, 33: 197, 1984.
5. Bagshawe, K.D.: Treatment of trophoblastic tumors. Ann. Acad. Med., 5: 273, 1976.
6. Ball, C.R., Poynter, R.W. and Berg, H.W.: A novel method for measuring incorporation of radioactive precursors into nucleic acids and proteins of cells in monolayer culture. Analytical Biochemistry, 46: 101, 1972.
7. Berkowitz, R.S., Goldstein, D.P. and Bernstein, M.R.: Modified triple chemotherapy in the management of high risk metastatic gestational trophoblastic tumors. Gynecol. Oncol., 19: 173, 1984.
8. Hammond, C.B., Weed, J.C. and Currie, J.C.: The role of operation in the current therapy of gestational trophoblastic disease. Am. J. Obstet. Gynec., 136: 844, 1980.
9. Issel, B.F.: The podophyllotoxin derivatives VP16-213 and VM26. Cancer Chemother. Pharmacol., 7: 73, 1982.
10. Kessel, D. and Bosman, H.B.: On the characteristics of actinomycin D resistance in L5178Y cells. Cancer Res., 30: 2695, 1970.
11. Li, M.C.: Management of choriocarcinoma and related tumors of uterus and testis. Med. Clin. North Am., 45: 661, 1961.
12. Li, M.C., Hertz, R. and Spencer, D.B.: Effect of methotrexate therapy upon choriocarcinoma and chorioadenomas. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 93: 361, 1956.
13. Medoff, J., Medoff, G., Goldstein, H.N., Schlesinger, D. and Kobayashi, G.S.: Amphotericin B induced sensitivity to actinomycin D in drug-resistant HeLa cells. Cancer Res., 35: 2548, 1975.
14. Nakamoto, O.: Properties of strain cells of the uterine invasive mole and of its metastatic choriocarcinoma. Asia-Oceania J. Obst. Gynaec., 6: 177, 1980.
15. Newlands, E.S.: VP-16 in combinations for first line treatment of malignant germ-cell tumors and gestational choriocarcinoma. Seminars in Oncol., 12: 37, 1985.
16. Newlands, E.S. and Bagshawe, K.D.: Antitumor activity of the epipodophyllin derivative VP16-213 (Etoposide: NSC-141540) in gestational choriocarcinoma. Europ. J. Cancer, 16: 401, 1979.
17. Newlands, E.S. and Bagshawe, K.D.: The role of VP16-213 (Etoposide NSC-14150) in gestational choriocarcinoma. Cancer Chemother. Pharmacol., 7: 211, 1982.
18. Oku, T., Imanishi, J. and Kishida, T.: Assessment of anti-tumor cell effect of human leukocyte interferon in combination with anticancer agents by a convenient assay system in monolayer cell culture. Gann., 73: 667, 1982.
19. Pattillo, R.A. and Gey, G.O.: The establishment of a cell line of human hormone-synthesizing trophoblastic cells *in vitro*. Cancer Res., 28: 1231, 1968.
20. Ross, G.T., Stolbach, L.L. and Hertz, R.: Actinomycin-D in the treatment of methotrexate resistant trophoblastic disease in women. Cancer Res., 22: 1015, 1962.
21. Schlaerth, J.B., Morrow, C.P. and DePetrillo, A.D.: Sustained remission of choriocarcinoma with cisplatin, vinblastine and bleomycin after failure of conventional combination drug therapy. Am. J. Obst. Gynec., 136: 983, 1980.
22. Seeber, S.: Model studies of etoposide resistance. Cancer Treat. Reviews, 9: 15, 1982.
23. Sinkule, J.A., Hutson, P., Hayes, F.A., Et-cubanas, E. and Evans, W.: Pharmacokinetics of etoposide (VP16) in children and adolescents with refractory solid tumors. Cancer Res., 44: 3109, 1984.
24. Sirotinak, F.M., Kurita, S. and Hutchison, D.J.: On the nature of a transport alteration determining resistance to amethopterin in the L1210 leukemia. Cancer Res., 28: 75, 1968.
25. Slayton, R.E., Creasman, W.T., Petty, W., Bundy, B. and Blessing, J.A.: Phase II trial of

- VP-16-213 in the treatment of advanced squamous cell carcinoma of the cervix and adenocarcinoma of the ovary: A gynecologic oncology group study. *Cancer Treat. Rep.*, 63: 2089, 1979.
26. *Stähelin, H.*: Activity of a new glycosidic lignan derivative (VP16-213) related to podophyllotoxin in experimental tumors. *Eur. J. Cancer*, 9: 215, 1973.
27. *Surwit, E.A., Suciv, T.N., Schmidt, H.J. and Hammond, C.B.*: A new combination chemotherapy for resistant trophoblastic disease. *Gynecol. Oncol.*, 8: 110, 1979.
28. *Tattersall, M.H.N., Sodergren, J.E., Sengupta, S. K., Trites, D.H., Modest, E.J. and Frei, J. III*: Pharmacokinetics of actinomycin-D in patients with malignant melanoma. *Clin. Pharmacol. Therapeu.*, 17: 701, 1975.
29. *Tsuruo, T., Iida, H., Tsukagoshi, S. and Sakurai, Y.*: Overcoming of vineristine resistance on P388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. *Cancer Res.*, 41: 1967, 1981.

(No. 6106 昭61・12・13受付)