

温熱感受性・温熱耐性に対するセファランチンの影響

宇田 光伸^{*1}, 赤木 清^{*1}, Chang W. SONG^{*2}, 田中 敬正^{*1}

EFFECT OF CEPHARANTHIN ON THERMOSENSITIVITY AND THERMOTOLERANCE

Mitsunobu UDA^{*1}, Kiyoshi AKAGI^{*1}, Chang W. SONG^{*2}
and Yoshimasa TANAKA^{*1}

(Received 21 August 1989, accepted 15 December 1989)

Abstract It is a well-known fact that sublethal heating of cells results in development of transient and non-heritable resistance to subsequent heating. This phenomenon is called thermotolerance. The exact mechanism of its induction or its development is not yet understood. Identifying the inhibitors of thermotolerance induction or thermotolerance development may be helpful in delineating the mechanism of thermotolerance, and the clinical use of hyperthermia. Cepharanthin, a membrane active drug, was tested in the present study. At a concentration of 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, this drug caused slight change in the slope of the survival curve (Do) of SCK cells heated one time at 44°C. The presence of this drug during heat conditioning (1st heating) or in the interval between the 1st and 2nd heating had little effect on the response of cells to the 2nd heating. On the other hand, the presence of cepharanthin during the 2nd heating significantly reduced the Do of cell survival for the 2nd heating ($\text{Do}=28.5$ min). Cepharanthin at a dose of 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ also enhanced the cell killing effect of the 2nd heating of thermotolerant SCK cells, when it was administered during the 2nd heating ($\text{Do}=46.8$ min). Low extra cellular pH ($\text{pHe}=6.6$) during the 2nd heating reduced the Do of cell survival of thermotolerant cells ($\text{Do}=45.8$ min). Cepharanthin at a dose of 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, added during the 2nd heating in low pHe , significantly enhanced the cell killing effect of the 2nd heating ($\text{Do}=29.4$ min).

Key words: Thermotolerance, Thermosensitivity, Cepharanthin

はじめに

癌の温熱療法は、放射線療法・化学療法と併用され、臨床的に多くの有効例が報告されている。温熱療法は癌治療の新しい手段として期待されている。しかし、一度温熱処理を受けた細胞は次の温熱処理に対して、一過性に抵抗性を示す事が明らかとなり¹⁻⁴⁾、温熱耐性(Thermotolerance)と呼ばれている。この現象は温熱療

法の臨床応用上の1つの難点である。

温熱耐性獲得・発現のメカニズムについては不明な点が多く、現在考えられているものの1つには Heat shock proteins (HSPs) の関与と、もう1つは細胞膜に作用点が存在すると考えられている。

Konings は細胞膜に作用する局所麻酔薬プロカインが温熱耐性の誘導を阻止すると報告している⁵⁾。この温熱耐性の誘導阻止の作用点として細胞膜の関与が大きいと考えられる。同様に

*1 関西医科大学 放射線科学教室 (〒570 大阪府守口市文園町1)

Department of Radiology, Kansai Medical University, 1, Fumizono-cho, Moriguchi-shi, Osaka 570, Japan.

*2 ミネソタ大学 放射線生物学教室 Department of Therapeutic Radiology, Radiation Biology Section, University of Minnesota, Medical School.

細胞膜への影響には細胞内外の pH が大きく作用するとの報告もある⁶⁻¹⁰。温熱耐性の獲得・発現を阻止する薬剤を見い出すことにより今後の癌温熱療法上、治癒の向上が期待できる。今回われわれは SCK 細胞を用いて温熱耐性を誘導し、膜作用物質の 1 つであるセファランチン (Cepharanthin) 及び pH が温熱耐性の獲得・発現に与える影響について検討した。

対象および実験方法

①細胞: A/J mouse に自然発生した乳癌細胞である SCK 細胞¹¹ を用いた。培地は RPMI 培養液 (GIBCO) を用い、これに Calf Serum を 10% 添加して使用した。培養条件は、 $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 in air とした。細胞は組織培養用のプラスチック・フラスコ (Lux 5305, Miles Laboratories, Inc.) を用い単層培養した。2-3 日間隔で継代培養を行い、実験には指数増殖期の細胞を用いた。0.25% トリプシン (Difco Laboratory, Detroit, MI) 処理後 1×10^2 - 1×10^4 個の細胞をフラスコに播種し、細胞の静着を待って実験に用いた。

②加温方法: 恒温槽 (Thermomix 1480, B. Braun Co., West Germany) を用い、設定温度に対し $\pm 0.02^{\circ}\text{C}$ の精度に保った。

温熱感受性の評価: 単独加温による生存率曲線は、 41°C (30, 60, 90, 120 分)、 42°C (30, 60, 90, 120 分)、 43°C (30, 60, 90, 120 分)、 44°C (15, 30, 45, 60, 75, 90 分)、 45°C (10, 20, 30, 40 分) の加温により求めた。

③温熱耐性の誘導: 43°C 30 分加温 (1st heating) 後 37°C で 5 時間培養 (interval period) して誘導し、2 次加温 (2nd heating) は 44°C で行なった。

④セファランチン: Cepharanthin (Bisbenzylisoquinoline Alkaloids) は化研生薬 (株) より提供を受けた。その構造式を Fig. 1 に示す。セファランチンは 10% Calf Serum を添加した RPMI 1640 で希釈し、培養液中の最終濃度が $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ または $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ となる様に調整した。セファランチンの除去にはフラスコ中の培養液を 2 回交換することで行なった。

⑤温熱感受性、温熱耐性に対する評価方法: セ

ファランチンの影響を調べる為に薬剤の投与時期は温熱耐性を誘導する期間 (1st heating 時)、温熱耐性を獲得する期間 (interval period の間: 5 時間のうち後半 4 時間)、温熱耐性が発現する期間 (2nd heating 時) の 3 つの投与時期で行ないコロニー法を用いた生存率でその影響を調べた。

⑥ pH の温熱感受性、温熱耐性への影響: 2nd heating 中の培養液の pH (pHe) は 7.4 と 6.6 について検討した。4 ml の培養液の入った Lux 5305 フラスコに 20 ml の CO_2 を注入して pHe を 6.6 に調整した。セファランチン $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ をそれぞれの pHe の条件下で 2nd heating 時に投与した場合の生存率曲線を求めた。

⑦コロニー形成能: 37°C で 7-10 日間培養し、コ

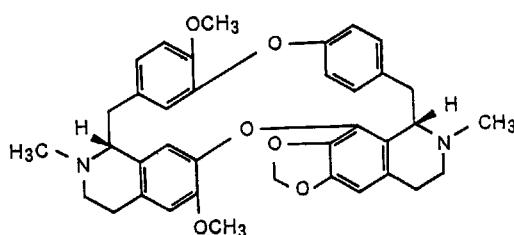


Fig. 1. The structure of cepharanthine.

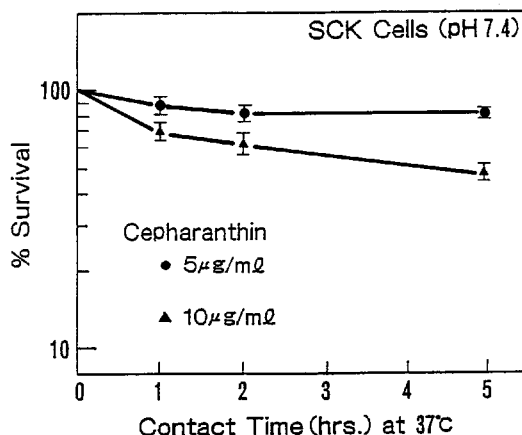


Fig. 2. Cytotoxicity of cepharanthin on SCK cells. Cells were incubated at 37°C for 2 hrs. with cepharanthin ($5 \mu\text{g}/\text{ml}$ or $10 \mu\text{g}/\text{ml}$) in pHe 7.4. After treatment, cells were cultured and colonies were counted. P. E. = 0.85. Mean $\pm$ S. E. of 5 experiments are shown.

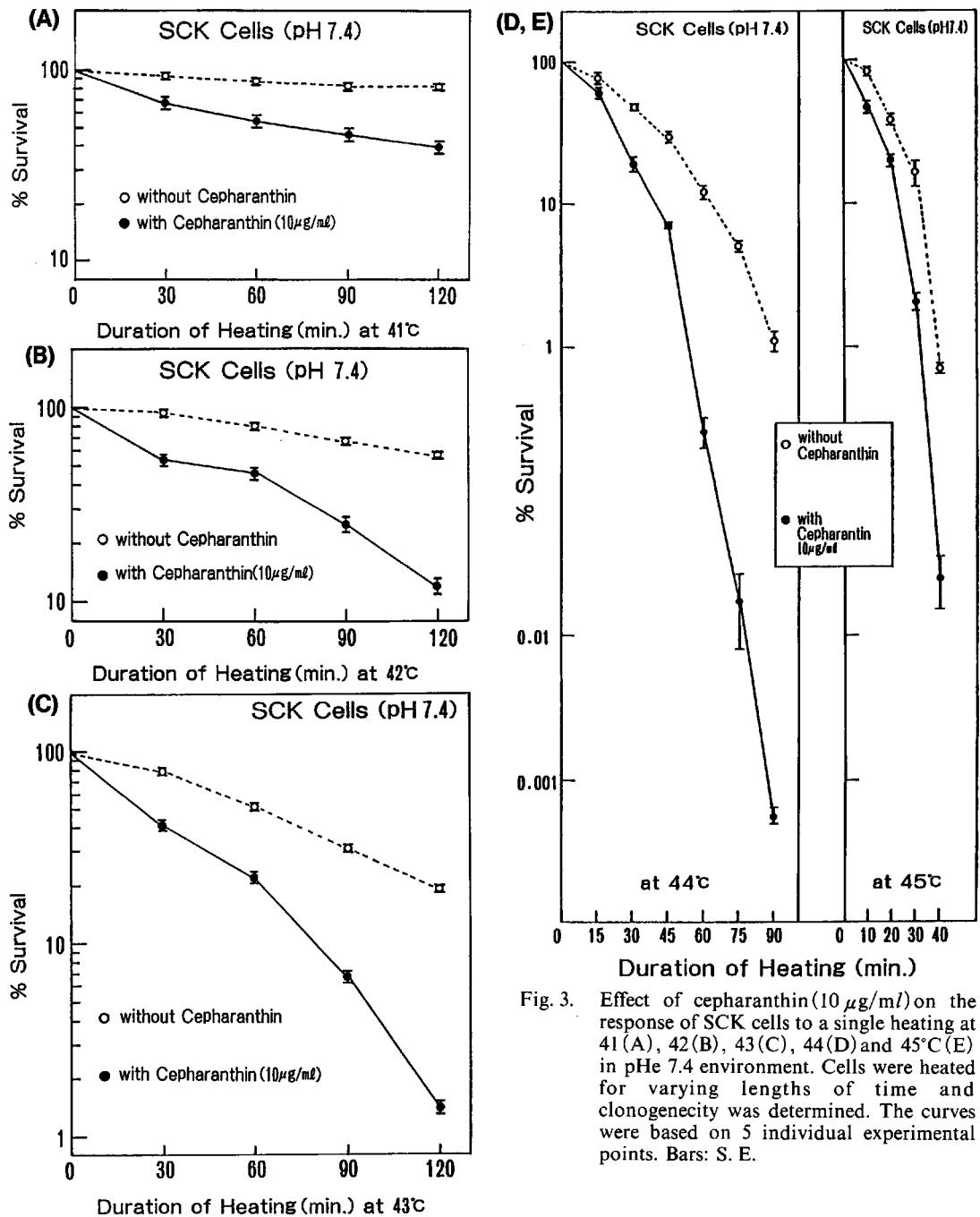


Fig. 3. Effect of cepharanthin (10 µg/ml) on the response of SCK cells to a single heating at 41 (A), 42 (B), 43 (C), 44 (D) and 45°C (E) in pH 7.4 environment. Cells were heated for varying lengths of time and clonogenicity was determined. The curves were based on 5 individual experimental points. Bars: S. E.

ロニーが肉眼で観察可能となった時点でクリスタルバイオレット・エタノール溶液で固定染色した。生存率の判定はコロニー法を用いた。生存率曲線から Do 値を求め温熱感受性、温熱耐性への影響について検討した。

結 果

①セファランチンの毒性

37°C の培養 (pHe=7.4) でセファランチン 5 µg/ml を 5 時間作用させた時の生存率は約 80%, 10 µg/ml の場合は 2 時間で 60%, 5 時間

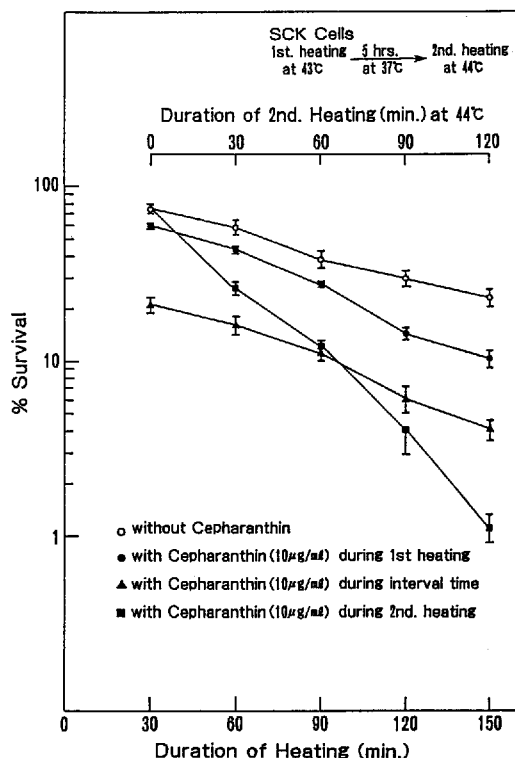


Fig. 4. Effect of cepharanthin ($10 \mu\text{g/ml}$) on thermotolerance. Mean $\pm$ S. E. of 5 experiments are shown.

- : Thermotolerance was induced by incubation for 5 hrs. at 37°C after 1st heating at 43°C 30 min.
- : Cepharanthin was added only during 1st heating at 43°C for 30 min. The cells were washed and incubated 5 hrs. at 37°C before 2nd heating.
- ▲ : The cells were incubated with cepharanthin in pH 7.4 during interval period. The cells were washed and then reheated at 44°C in pH 7.4.
- : Addition of drug was performed immediately before test heating.

で 50%の生存率を示した (Fig. 2).

② 温熱感受性へのセファランチンの影響

$10 \mu\text{g/ml}$ のセファランチンを 41, 42, 43, 44 および 45°C の単独加温 (pHe=7.4) 時に投与を行なった場合の生存率曲線を示す (Fig. 3). セファランチンを投与すると生存率曲線の Do 値が, 41°C 加温で 678.5 分から 179.0 分, 42°C 加温で 242.1 分から 61.9 分, 43°C 加温で 63.9 分から 26.4 分, 44°C 加温で 16.3 分から 5.6 分

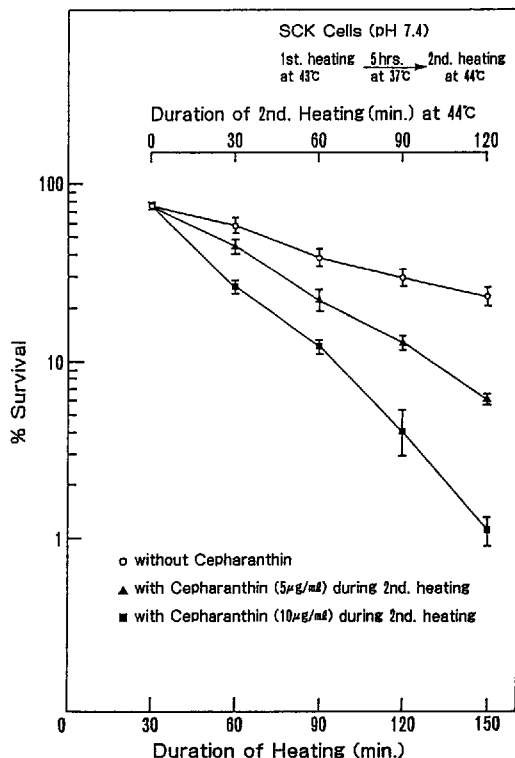


Fig. 5. Hyperthermic cell survival curve of thermotolerant cells heated at 44°C in pH 7.4 with cepharanthin ($5 \mu\text{g/ml}$). An average of 5 experiments with S. E. are shown.

と減少し, SCK 細胞の温熱感受性を増感した。 45°C 加温では温熱単独の Do 値は 4.9 分, セファランチンを投与しても 3.0 分と有意な差を認めなかった。

③ 温熱耐性に対するセファランチンの影響

温熱耐性は 43°C 30 分加温後 37°C で 5 時間培養して誘導し, 2 次加温は 44°C で行なった。

1) セファランチンの投与時期: 温熱単独の生存率曲線 ($\text{Do}=97.5$ 分) に比較して, セファランチン $10 \mu\text{g/ml}$ を 1st heating 時に投与した場合の生存率曲線の Do は 60.6 分, interval time の間に投与したときの Do は 64.6 分と有意な差を認めなかった。しかし 2nd heating (pHe=7.4) 時に投与した場合の生存率曲線の Do は 28.5 分であり, 温熱耐性を獲得した細胞に対して 44°C の 2 次加温では生存率を減少させセファランチンは温熱耐性の発現を抑制した (Fig. 4)。

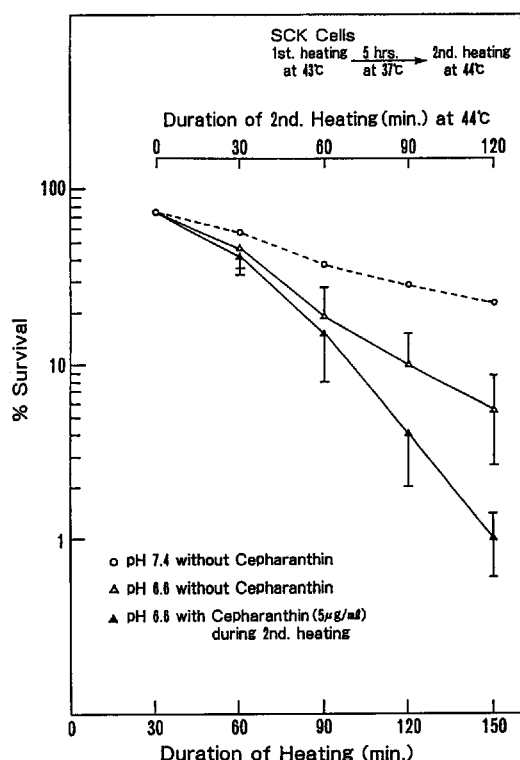


Fig. 6. Effect of cepharanthin (5 $\mu\text{g/ml}$) on the response of thermotolerant SCK cells to the 2nd heating in pHe 6.6. Addition of the drug and control of pHe was performed immediately before 2nd heating. Bars: S. E.

2) セファランチンの投与量: 培養液中の最終濃度 5 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ での温熱耐性への影響を調べた。投与時期は2nd heating (pHe=7.4) 時で行った。5 $\mu\text{g/ml}$ 濃度でも Fig. 5 の▲で示すように Do が 46.8 分と、セファランチンを投与しない場合の Do 値 (97.5 分) と比較して小さくなり、温熱耐性を獲得した SCK 細胞に対して、44°C 2 次加温では生存率を減少させた。

3) pH の影響: 温熱耐性を獲得した細胞に対して 44°C の 2 次加温での生存率曲線は pHe (細胞外 pH) = 7.4 の場合で Do が 97.5 分, pHe = 6.6 の場合 45.8 分であった。Fig. 6 の▲で示すようにセファランチンを投与しない場合 (Fig. 6 の△) に比べ Do は 29.4 分と小さくなり、low pHe の条件下でもセファランチンは温熱耐性を獲得した SCK 細胞の 2 次加温に対する生存率を減少させた。

考 察

一度亜致死的な温熱処理を受けた細胞・組織は次の温熱処理に対して、一過性に抵抗性を示す。この温熱耐性の現象は哺乳動物細胞に共通してみられ、組織レベルでも発現することが知られている。温熱耐性獲得・発現のメカニズムは明らかでないが、温熱耐性を修飾する因子については種々の報告がある。1 つは Heat Shock Proteins (HSPs) に関連して、温熱耐性の発現とタンパク質、DNA、RNA の合成率の時間的相関などに関する報告であり^{12,13)}、もう 1 つは、細胞環境 pH⁶⁻¹⁰⁾、ポリアミン¹⁴⁾、プロカイン¹⁵⁾、D₂O¹⁶⁾ など細胞膜に作用すると考えられるものについての報告である。

Henle と Leeper は蛋白合成阻害剤であるサイクロヘキサミドが温熱耐性の誘導を抑え、一方、DNA・RNA 合成阻害剤は温熱耐性の誘導を阻止しなかったと報告している¹⁷⁾。Landry らはモーリス肝癌細胞においてサイクロヘキサミドで蛋白の合成を抑えても温熱耐性が発現することを示した¹⁸⁾。大塚らはサイクロヘキサミドの温熱耐性発現阻止効果には細胞間で差があることを示した¹⁹⁾。温熱耐性の出現と Heat Shock Proteins の合成率の時間経過が相関する^{12,13)} ことから、HSPs が温熱耐性発現に関わる 1 つの要因であるとする報告が多いが、温熱耐性発現のメカニズムと HSPs の関連については現在のところ明らかでない。

Yatvin らは、温熱の細胞致死の最大の要因は細胞膜の流動性の変化であるとし¹⁵⁾、Gerner らはスベルミンなどのポリアミンが CHO 細胞の熱感受性を高め、この効果は細胞膜のレベルで作用することを報告している¹⁴⁾。

Konings は細胞膜に作用して局所麻酔薬の作用を発現するプロカインが温熱耐性の誘導を阻止すると報告している⁹⁾。温熱処理の細胞膜に及ぼす影響について、温熱処理が細胞膜の透過性・Na⁺/K⁺ポンプの活性を変化させる²⁰⁾、等の報告があり温熱の細胞致死効果の作用点として細胞膜の関与が大きいと考えられる。以上から膜作用物質が細胞膜を介して温熱耐性の誘導・

獲得・発現を阻止する可能性がある。

今回、われわれは SCK 細胞を用い、41-45°C 加温と分割加温による温熱耐性へのセファランチンの影響について検討した。セファランチンは、タマサキツツラフジ (*Stephania cepharanthahayata minispermaceae*) から抽出、精製されたアルカロイド (Bisbenzylisoquinoline Alkaloids) である。細胞膜に作用してその細胞質側に偏在するフォスファチジルセリンと結合し、間接的に能動的排出の機能をもつ膜蛋白質の活性を阻害するなどの報告がある²¹⁾。今回 SCK 細胞での検討では、41-44°C の温度ではセファランチンを投与することで SCK 細胞の温熱感受性を増感するが、45°C での加温ではセファランチンによる増感効果は認められなかった。この原因には 45°C では温熱自体の殺細胞効果が 41, 42, 43, 44°C に比べて十分に大きいため、セファランチンによる増感効果が認められないと考えられる。

Fig. 4 は温熱耐性に対するセファランチンの影響をその投与時期から検討した結果を示す。温熱単独の生存率曲線 (Do=97.5 分) に比較して、セファランチン 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を 1st heating 時に投与した場合の生存率曲線の Do は 60.6 分 interval time の間に投与したときの Do は 64.6 分と有意な差を認めなかった。しかし 2nd heating (pHe=7.4) 時に投与した場合の生存率曲線の Do は 28.5 分であり、セファランチンは温熱耐性を獲得した細胞に対して 44°C の 2 次加温で生存率を減少させた。このようにセファランチンは温熱耐性の誘導・獲得は阻止しなかったが、温熱耐性を獲得した細胞において 44°C 加温の細胞致死効果を増強した。しかし、44°C の単独加温時でセファランチンは既に温熱増感効果を示しているため、温熱耐性を獲得した細胞を 2 次加温した時の生存率を減少させても、必ずしもセファランチンが誘導・獲得された温熱耐性の発現を阻止したとは結論できない。しかし、この現象について以下の可能性が考えられる。① 1 次加温とその後の 37°C での培養の間に何らかの物質が産生され (温熱耐性の誘導)、これが温熱に対して防護的に働くことにより温

熱耐性が発現する。温熱耐性は一過性であるのはこの物質が時間と共に分解されるからと考えられる。1 次加温とその後の 37°C での培養の間に産生され 2 次加温時に細胞の温熱抵抗性を高める物質の作用機序をセファランチンが阻止している可能性がある。②セファランチンが温熱の作用点に直接働き、細胞致死効果を高めた。③セファランチンの抗腫瘍効果が温熱により増強された。以上の点に付いては今後検討が必要である。

2 次加温時にセファランチン 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を投与すると、培養液の pH (pHe) が 7.4, 6.6 のいずれの場合でも温熱耐性を獲得した細胞に対する温熱の殺細胞効果は増強された。セファランチン 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ は臨床的に使用可能で癌温熱療法での併用で制癌効果増強が期待できる。

文 献

- 1) Dewey, W. C., Hopwood, L. E., Sapareto, S. A. *et al.*: Cellular responses to combinations of hyperthermia and radiation. *Radiol.* **123**: 463-474, 1977.
- 2) Nielsen, O. S. Overgaard, J.: Influence of Time and Temperature on the Kinetics of Thermotolerance in L1A2 Cells in Vitro. *Cancer Res.* **42**: 4190-4196, 1982.
- 3) Nielsen, O. S., Henle, K. J., Overgaard, J.: Arrhenius Analysis of survival curves from thermotolerant and step-down heated L1A2 cells in vitro. *Radiat. Res.* **91**: 468-482, 1982.
- 4) Majima, H., Gerweck, L. E.: Kinetics of thermotolerance decay in Chinese Hamster Ovary cells. *Cancer Res.* **43**: 2673-2677, 1983.
- 5) Konings, A. W. J.: Development of thermotolerance in mouse fibroblast LM cells with modified membranes and after procaine treatment. *Cancer Res.* **45**: 2016-2019, 1985.
- 6) Gerweck, L. E., Dahlberg, W. K., Greco, B.: Effect of pH on single or fractionated heat treatment at 42-45°C. *Cancer Res.* **43**: 1163-1167, 1983.
- 7) Goldin, E. M., Leeper, D. B.: The effect of low pH on thermotolerance induction using fractionated 45°C hyperthermia. *Radiat. Res.* **85**: 472-479, 1981.
- 8) Nielsen, O. S., Overgaard, J.: Effect of extracellular pH on thermotolerance and recovery of

- hyperthermic damage in vitro. *Cancer Res.* **39**: 2772-2778, 1979.
- 9) Gerweck, L. E.: Modification of cell lethality at elevated temperatures-The pH effect I. *Radiat. Res.* **70**: 224-235, 1977.
 - 10) Miyakoshi, J., Oda, W., Hirata, M. *et al.*: Effects of amiloride on thermosensitivity of Chinese hamster cells under neutral and acidic pH. *Cancer Res.* **46**: 1840-1843, 1986.
 - 11) Rhee, J. G., Schuman, V. L., Song, C. W. *et al.*: Difference in the thermotolerance of mouse mammary carcinoma cells in vivo and in vitro. *Cancer Res.* **47**: 2571-2575, 1987.
 - 12) Landry, J., Bernier, D., Chretien, P. *et al.*: Synthesis and degradation of heat shock proteins during development and decay of thermotolerance. *Cancer Res.* **42**: 2457-2461, 1982.
 - 13) Li, G. C., Werb, Z.: Correlation between synthesis of heat shock proteins and development of thermotolerance in chinese hamster fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **79**: 3218-3222, 1982.
 - 14) Gerner, E. W., Cress, A. E., Stickney, D. G. *et al.*: Factors regulating membrane permeability alter thermed resistance. *Annals New York Acad. Sci.* **335**: 215-233, 1980.
 - 15) Yatvin, M. B.: The influence of membrane lipid composition and procaine on hyperthermic death of cells. *Int. J. Radiat. Biol.* **32**: 513-521, 1977.
 - 16) Sideris, E. G., Mukherjee R., Vomvovanni V. *et al.*: Effect of deuterium water on the mitotic cycle, the deoxyribonucleic acid stability, and the frequency of radiation-induced chromosome aberrations in barley. *Radiat. Res.* **61**: 457-467, 1975.
 - 17) Henle, K. J., Leeper, D. B.: Modification of the heat response and thermotolerance by cycloheximide, hyproxyurea, and lucanthone in CHO cells. *Radiat. Res.* **90**: 339-347, 1982.
 - 18) Landry, J., Chretien, P.: Relationship between hyperthermia-induced heatshock proteins and thermotolerance in Morris hepatoma cells. *Can. J. Biochem. Cell Biol.* **61**: 428-437, 1983.
 - 19) Ohtsuka, K., Furuya, M., Nitta, K. *et al.*: Effect of Cycloheximide on development of thermotolerance and the synthesis of 68-kilodalton Heat Shock Protein in Chinese Hamster V79 and Mouse L Cells In Vitro. *J. Radiat. Res.* **27**, 1986.
 - 20) Boonstra, J., Schamhart, D., Laat, S. *et al.*: Analysis of K⁺ and Na⁺ transport and intracellular contents during and after heat shock and their role in protein synthesis in rat hepatoma cells. *Cancer Res.* **44**: 955, 1984.
 - 21) Shiraishi, N., Akiyama, S., Nakagawa, M. *et al.*: Effect of Bisbenzylisoquinoline (Biscoclaurine) Alkaloids on multi-drug resistance in KB human cancer cells. *Cancer Res.* **47**: 2413-2416, 1987.

要旨：温熱耐性獲得・発現を阻止する薬剤を見い出すことにより今後の癌温熱療法上、治癒の向上が期待できる。今回われわれは、SCK細胞を用いて温熱耐性を誘導し、膜作用物質の1つである Cepharanthin (Bisbenzylisoquinoline Alkaloids) が温熱耐性に与える影響について検討した。10 $\mu\text{g/ml}$ のセファランチンを 41, 42, 43, 44 および 45°C の単独加温 (細胞外 pH (pHe) = 7.4) 時に投与すると生存率曲線の Do 値が、41°C 加温で 678.5 分から 179.0 分、42°C 加温で 242.1 分から 61.9 分、43°C 加温で 63.9 分から 26.4 分、44°C 加温で 16.3 分から 5.6 分と減少し、SCK 細胞の温熱感受性を増感した。45°C 加温では温熱単独で 4.9 分、セファランチンを投与しても 3.0 分と有意な差を認めなかった。温熱耐性は 43°C 30 分の加温 (1st heating) 後 37°C で 5 時間培養 (interval period) して誘導した。2 次加温 (2nd heating) は 44°C で行った。セファランチン 10 $\mu\text{g/ml}$ を 1st heating 時に投与した場合の生存率曲線の Do は 60.6 分、interval time の間に投与したときの Do は 64.6 分を示した。2nd heating 時に投与した場合の生存率曲線の Do は 28.5 分であり、温熱耐性を獲得した細胞の 44°C の 2 次加温に対する生存率を減少させた。培養液中のセファランチンの最終濃度を 5 $\mu\text{g/ml}$ とし 2nd heating 時に投与した場合にも生存率曲線の Do は 46.8 分を示し、温熱耐性を獲得した細胞の 44°C の 2 次加温に対する生存率を減少させた。2nd heating 時の細胞外 pH を 6.6 とした場合の生存率曲線の Do は 45.8 分を示し、2 次加温の温熱耐性細胞に対する殺細胞効果を増強した。セファランチン 5 $\mu\text{g/ml}$ を細胞外 pH が 6.6 の条件下で 2nd heating 時に投与した場合の生存率曲線の Do は 29.4 分を示し low pHe の条件下でもセファランチンは温熱耐性を獲得した SCK 細胞の 2 次加温に対する生存率を減少させた。