

動物モデルにおける亜ヒ酸の抗腫瘍効果

鬼頭万里子 松本健司^{*1} 和田尚子^{*1} 二ツ川章二^{*2}
世良耕一郎^{*3} 野沢義則^{*1} 赤尾幸博^{*1}

(財)応用生化学研究所

505-0116 岐阜県可児郡御嵩町八木記念パーク

*1 (財)岐阜県国際バイオ研究所

504-0838 岐阜県各務原市那加不動丘 1-1

*2 (社)日本アイソトープ協会滝沢研究所

020-0173 岩手県岩手郡滝沢村滝沢字留が森 348-1

*3 岩手医科大学サイクロロンセンター

020-0173 岩手県岩手郡滝沢村滝沢字留が森 348-58

1 はじめに

ヒ素化合物は古くから毒物として知られる一方、薬としても用いられてきた。中国漢方では乾癩、リウマチ、梅毒の治療や歯髄疾病の失活剤として、また、西洋医学では、ペニシリンが登場するまで梅毒の治療に使われており、トリパノソーマ病に対しては今日でも使用されている。ところで、癌治療における all-trans 型レチノイン酸(ATRA)療法の有効性はよく知られている。ATRA 療法を受けた急性前骨髄性白血病(APL)患者の多くが寛解状態となる(1,2)が、その後再発し死に至ることが多い。1970 年代に亜ヒ酸が、難治性となった ATRA 耐性急性前骨髄性白血病患者に対して著効であることが中国で報告され(3, 4)、1997 年には亜ヒ酸は、ATRA 療法後再発した APL 患者に血中濃度として 2 μ M 以下の低濃度投与によって著しい効果を示すことが報告された(5,6,7,8)。それ以来、主に造血器腫瘍における亜ヒ酸による細胞死の分子機構の研究が活発になされ、ATRA が APL 細胞に分化を誘導(9)するのに対し、亜ヒ酸は主にアポトーシスを誘導(10) することが示された。

我々は、固形腫瘍に亜ヒ酸の適用を拓げるために、薬物抵抗性を示す肝癌への治療を目的として、これまでに低濃度の亜ヒ酸が in vitro において肝癌細胞株に対し抗腫瘍効果を示すこと、グルタチオン合成酵素阻害剤である buthionine-sulfoximine (BSO)の併用により相乗的な細胞死を誘導すること、さらに、それらの肝癌細胞株に対する殺細胞効果は正常肝細胞株に比べて高いことを報告した(11)。そこで、本研究では、ヒト肝癌細胞を皮下に移植したヌードマウスへの亜ヒ酸単独あるいは BSO との併用による治療効果を静脈投与および腫瘍内投与の両者から検討し、臨床応用への可能性を探った。

2 材料および方法

2.1 材料

亜ヒ酸と BSO は Sigma (St. Louis, MO) より購入した。亜ヒ酸は水酸化ナトリウム水溶液に溶解後最終濃度として 2 mg/ml のトリス緩衝生理食塩水(TBS)に調製した。4種の肝癌細胞株 HLE, HLF, HuH7 および HepG2 は 10% (v/v) ウシ胎仔血清を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)により培養した。

2.2 動物実験

BALB/c ノードマウス(5週齢♂、日本クレア)を 2 週間予備飼育し、HuH7 細胞(1×10^6)を皮下に移植した。2 週間後ぐらいから腫瘍が確認されはじめ、腫瘍サイズが 0.05 cm^3 になった時点でノードマウスを4群に分けた。トリス緩衝生理食塩水を尾静脈投与したコントロール群(I 群, n=9)、BSO の腹腔内投与群(II 群, n=9)、亜ヒ酸の尾静脈投与(III 群, n=11)、および亜ヒ酸と BSO の併用処理群(IV 群, n=11)に分けた。また、腫瘍内投与は、移植した腫瘍が 1.0 cm^3 以上に成長した時点から投与を開始した。

亜ヒ酸静注投与は、亜ヒ酸を尾静脈から $200 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ (7-6.5 mg/kg)、また、BSO は腹腔内に $1 \text{ mg}/100 \mu\text{l}$ (35-33 mg/kg)、いずれも週 3 回隔日に計 13 回投与をおこなった。腫瘍内投与は、亜ヒ酸を $100 \mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ (3.5-3.2 mg/kg)の量を週に 3 回投与した。

2.3 組織学的検討

腫瘍は切除後、10%ホルムアルデヒド緩衝液に入れ固定し、パラフィン切片の Hematoxylin-Eosin (H&E) 染色により病理学的検討を行った。また、terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) 法(和光純薬)によりアポトーシスの検出を行った。

2.4 Particle induced X-ray emission (PIXE)によるヒ素の臓器分布の定量

PIXE による測定は、ニツ川らの方法に準じて行った(12)。尾静脈投与 13 回を終えた後、エーテル麻酔下においてマウスから血液を採取し、肝臓、腎臓、脳および腫瘍を摘出した。臓器と腫瘍の一部を 105° で乾燥し恒量とした。50 mg の乾燥試料とその 1 mg に対し $1 \mu\text{l}$ の割合で原子吸光分析用インジウム標準(1000 ppm)をテフロン製熱分解容器中に入れ、分析用濃硝酸1ml を加え、電子レンジで湿式灰化した。また、血液サンプルは血液容量の2倍の水酸化ナトリウム溶液(1N)を加え、 80° で加熱し、 $10 \mu\text{l}$ に対してインジウム標準液を $1 \mu\text{l}$ 加えた。これら試料をターゲットフィルムに滴下し十分乾燥後、PIXE 分析サンプルとした。測定は、小型サイクロトロン(MYC-1750 島津製作所)、Si(Li)検出器(ORTEC 製、エネルギー分解能 5.9 MeV)およびPIXE解析プログラム(SAPIX Ver.3)を使用し、内部標準試料のスペクトル強度と比較して臓器は乾燥重量当たり、血液は血液容量当たりのヒ素(As)含有量を決定した。

2.5 組織内還元型グルタチオン (GSH) の定量

還元型グルタチオンは GSH Assay Kit (Calbiochem, San Diego, CA)により測定した。組織を 5% メタリン酸 中でテフロンホモジナイザーによりホモジネイトし、遠心($3000 \times g$ 10 分間)後の上清をサンプルとした。タンパク量の測定は Bradford 法により定量した。GSH 量は 1 mg タンパク質当たりの n mol として表示した。

2.6 統計解析

StatView software (SAS Institute Inc.)を用い、分散分析の Fisher's PLSD により解析した。

3 結果と考察

4種の肝癌細胞株(HLE, HLF, HuH7 および HepG2)をヌードマウスの皮下に移植し、生着率を調べた。その結果、生着率が高く、かつ培養細胞系において亜ヒ酸による抗腫瘍効果が比較的高いHuH7を亜ヒ酸のin vivo系に採用した。

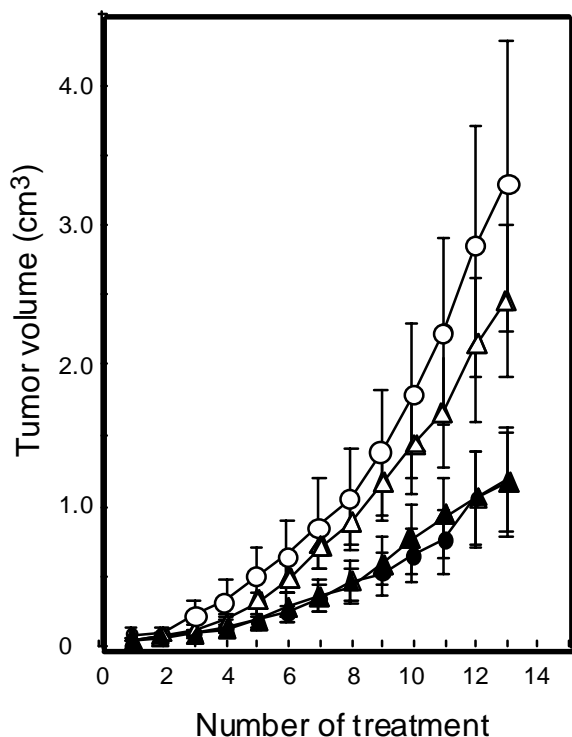


Fig. 1. Effect of ATO on the tumor growth of human hepatocellular carcinoma cell line HuH7 in BALB/c nude mice. ○, control; ●, ATO alone; △, BSO alone; ▲, ATO plus BSO. Data are means of respective numbers of animals per group. Bars, SE.

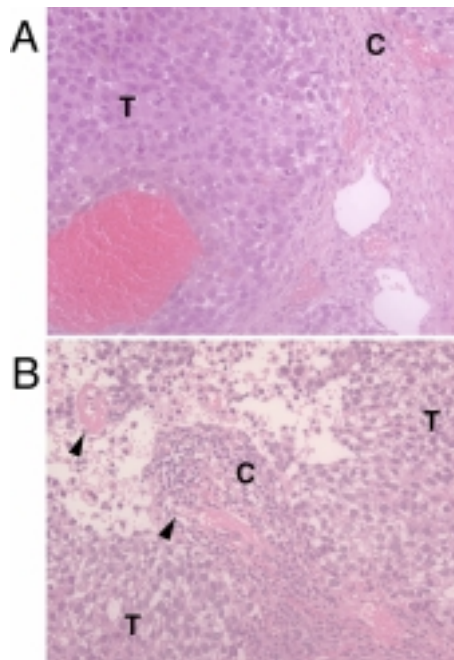


Fig. 2. Pathological features of the xenograft tumor in a representative mouse after intravenous injections of ATO. A, tumor stained with H&E before ATO-treatment; B, after the treatment. T, tumor; C, connective tissue. The blood vessels affected by ATO are indicated by arrow heads. The magnification is x100.

亜ヒ酸の尾静脈投与により腫瘍の増殖は明らかに抑制された。亜ヒ酸投与群の腫瘍の大きさはコントロール群の半分以下であった。亜ヒ酸とBSOとの併用群は、亜ヒ酸単独群とほぼ同様な増殖抑制効果を示した(Fig. 1)。

腫瘍組織のH&E染色では未治療コントロール(Fig. 2-A)に見られるように、腫瘍領域は、結合組織により分画され、結合組織領域には多くの血管が観察された。亜ヒ酸による効果の認められた症例では、多くの腫瘍細胞は膨化し、島状になった腫瘍領域から脱離していくのが観察された。また、Fig. 2-Bの矢印で示したような血管形成不全が認められ、破綻した血管周囲に多くの赤血球が観察された。亜ヒ酸の尾静脈投与後の血中におけるヒ素の残存量をPIXEにより検討した。亜ヒ酸200 μ gを尾静脈投与後10分、1時間、6時間および48時間の血中濃度をヒ素量として表1に示した。

Table 1 Arsenic concentration in blood after intravenous-As₂O₃-injection

Time	As (μg/ml) mean ± SD	n
10 min	27.20 ± 5.26	10
1 h	14.01 ± 2.97	8
6 h	12.64 ± 1.83	10
48 h	2.52 ± 1.98	7
48 h*	3.13 ± 1.33	3

*: after 13 times injection

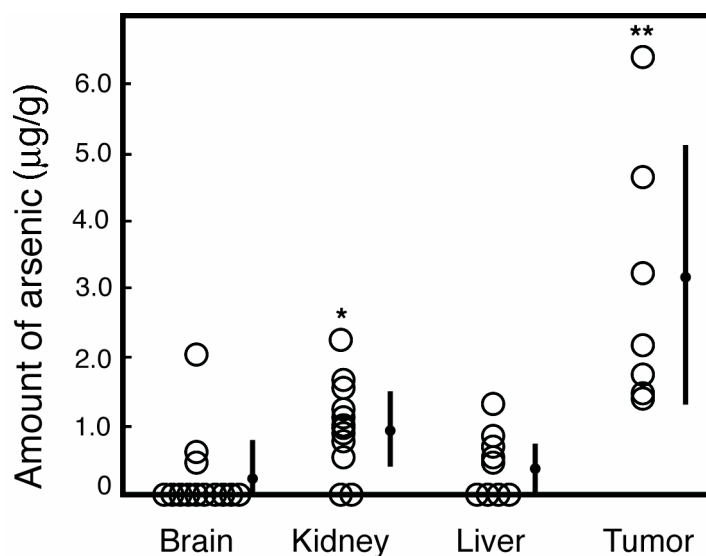


Fig. 3. The amounts of arsenic determined by PIXE analysis in various tissues after the intravenous-ATO treatment. Data are means of values of each sample.

それぞれ 27.20, 14.01, 12.64 そして 2.52 μg/ml であった。また、13 回尾静脈投与後の亜ヒ酸群は 48 時間後にヒ素濃度として 3.13 μg/ml であった。これらの結果から、48 時間後においても亜ヒ酸が血中に維持されていることが明らかとなった。さらに、臓器および腫瘍へのヒ素の取り込み量を PIXE により測定した結果 (Fig. 3)、脳、肝臓、および腎臓では蓄積量は 1ppm 以下であるが、臓器間に選択性が認められ、腎臓は脳にくらべて有意に上昇していた。さらに、亜ヒ酸投与群有効例では腫瘍への蓄積量は、腎臓と比較しても有意に多いことが確認された。これは先に示した病理を考え合わせると、出血壊死により投与した亜ヒ酸が漏れ出た結果と考えられる。

尾静脈最終投与(13回目)の 48 時間後の腫瘍組織における還元型グルタチオン量を、測定した (Fig. 4)。すでに報告しているように、培養肝癌細胞系においては、還元型グルタチオン量は、BSO 単独処理ではコントロールに比べ低下し、亜ヒ酸単独処理では代償性と思われる増加傾向を示すものの、BSO と亜ヒ酸との併用では著しい減少を示した(1)。これに対し、今回の動物モデル実験では、コントロール群(32.1 ng/g)にくらべ BSO 投与群(28.1 ng/g)では有意な低下は認められず、亜ヒ酸単独および亜ヒ酸と BSO との併用群の両者では、やや高い値(As; 41.8 ng/g, As+BSO; 41.0 ng/g)を示した。腫瘍内グルタチオン量の結果は、

今回の BSO の投与方法あるいは投与量では腫瘍内の還元型グルタチオン量を低下させるのに充分でなく、そのため腫瘍増殖抑制効果が認められなかったと考えられる。

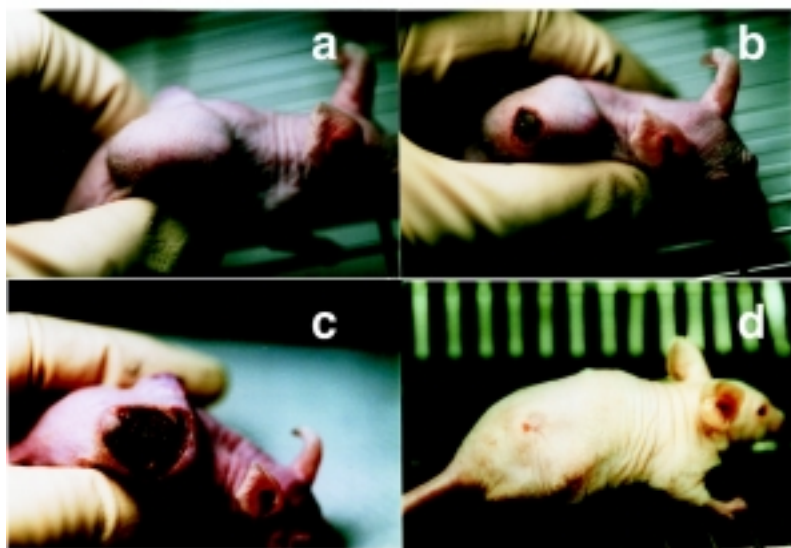


Fig. 4. Gross morphological changes in the xenograft tumor of a representative mouse treated with intratumor injections of ATO. Macroscopic features in time course during the treatment: a, before treatment; b, for 2 weeks after the start of treatment; c, for 4 weeks; d, for 6 weeks.

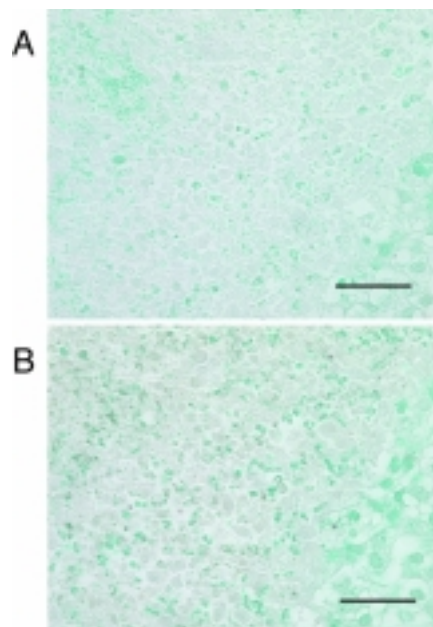


Fig. 5. *In situ* TUNEL assay of the xenograft tumor in a representative mouse after the treatment with intratumor-ATO. A, the control; B, after the treatment for 2 weeks. Bar, 50 μ m.

亜硝酸の腫瘍内投与では投与を開始して 1-2 週間で腫瘍表面に黒い痂皮が出現し(Fig. 5b)、時間が経過するにつれて痂皮は硬くなり、6-7 週間後には退縮し、ついで剥離した (Fig. 5c, d)。このような腫瘍の著しい退縮あるいは消失は 22 例中 13 例 (59%) において観察された。一方、トリス生理食塩水を投与したコントロールではいずれも腫瘍は増大した。病理所見では出血を伴う腫瘍中央部の壊死がしばしば観察され、腫瘍組織における血管中の赤血球のうっ滞像および血管外への漏出が見られた。また、TUNEL assay によりその領域の一部に陽性核を持つ腫瘍細胞が観察され、細胞死は壊死のみならずアポトーシスによることが確認された(Fig. 6)。Fig. 5 にみられる出血壊死像は、Meth-A を皮内移植した Balb/c マウスへの腹腔投与した Lewらの結果と酷似している(13)。彼らは腫瘍内血管の破綻によるものと考えており、我々の今回の腫瘍内および尾静脈投与から得られた結果と一致する。

以上の結果から、ATO はヌードマウスに移植した肝癌細胞腫 HuH7 に対し静注投与あるいは腫瘍内投与によって出血性壊死をもたらす一方、アポトーシスによる細胞死を誘導し、さらに、腫瘍増殖に伴う血管新生の阻害により肝癌細胞腫の増殖抑制あるいは消失をもたらすことが示唆された。

4 結論

亜ヒ酸は、すでに難治性の急性前骨髄性白血病に対し使用されており、良好な成績を収めている。私たちは、固形腫瘍にも適用を拡げるため、肝癌に対する効果を動物モデルにより検討した。ヌードマウスにヒト肝癌細胞 HuH7 を皮下移植し、亜ヒ酸の静注および腫瘍内投与を行った。静注投与では腫瘍の大きさは、未治療群に比べ半分以下に退縮した。病理所見から亜ヒ酸の抗腫瘍効果は、癌細胞自身に対する殺細胞効果に加え、血管新生の破綻によるためと考えられた。さらにヒ素の集積が、PIXE の測定から腫瘍組織に集積していることが明らかとなり、亜ヒ酸が腫瘍血管になんらかの障害を与えている可能性が考えられた。腫瘍内投与では約60%のマウスに腫瘍の著しい退縮あるいは消失を観察した。

これら動物実験の結果は、亜ヒ酸がアポトーシスの誘導、腫瘍血管新生の阻止を含む多様な作用を有していることを示しており、今後血液腫瘍のみならず固形腫瘍の治療にも有用な薬剤となることが示唆された。

文献

1. Huang, M. E., Ye, Y. C., Chen, S.R., Chai, J. R., Lu, J.X., Zhao, L., Gu, L. J., and Wang, Z. Y. Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood*, 72: 567-572, 1988.
2. Kakizuka, A., Miller, W. H. Jr., Umesono, K., Warrell, R. P. Jr., Frankel, S. R., Murty, V. V., Dmitrovsky, E., and Evans, R. M. Chromosomal translocation t(15;17) in human acute promyelocytic leukemia fuses RAR alpha with a novel putative transcription factor, PML. *Cell*, 66: 663-674, 1991.
3. Sun, H. D., Ma, L., Hu, X. C., and Zhang, T. D. Ai-Lin 1 treated 32 cases of acute promyelocytic leukemia. *Chin. J. Comb. Trad. Chin. Med. West. Med.*, 12: 170-172, 1992.
4. Zhang, P., Wang, S. Y., and Hu, X. H. Arsenic trioxide treated 72 cases of acute promyelocytic leukemia. *Chin. J. Hematol.*, 17: 58-62, 1996.
5. Shen, Z. X., Chen, G. Q., Ni J. H., Li, X. S., Xiong, S. M., Qiu, Q. Y., Zhu, J., Tang, W., Sun, G. L., Yang, K. Q., Chen, Y., Zhou, L., Fang, Z. W., Wang, Y. T., Ma, J., Zhang, P., Zhang, T. D., Chen, S. J., Chen, Z., and Wang, Z. Y. Use of arsenic trioxide (As₂O₃) in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL): II. Clinical efficacy and pharmacokinetics in relapsed patients. *Blood*, 89: 3354-3360, 1997.
6. Soignet, S. L., Maslak, P., Wang, Z. G., Jhanwar, S., Calleja, E., Dardashti, L. J., Corso, D., DeBlasio, A., Gabrilove, J., Scheinberg, D. A., Pandolfi, P. P., and Warrell, R. P. Jr. Complete remission after treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide. *N. Engl. J. Med.*, 339: 1341-1348, 1998.
7. Niu, C., Yan, H., Sun, H. P., Liu, J-X., Gu, B. W., Su, X-Y., Cao, Q., Waxman, S., Chen, Z., Chen, S. J., Shen, Z. X., and Wang, Z. Y. Treatment of de novo and relapsed acute promyelocytic leukemia patients with arsenic trioxide. *Blood*, 92: 678a, 1998.
8. Niu, C., Yan, H., Yu, T., Sun, H. P., Liu, J. X., Li, X. S., Wu, W., Zhang, F. Q., Chen, Y., Zhou, L., Li, J. M., Zeng, X. Y., Yang, R. R., Yuan, M. M., Ren, M. Y., Gu, F. Y., Cao, Q., Gu, B. W., Su, X. Y., Chen, G. Q., Xiong, S. M., Zhang, T., Waxman, S., Wang, Z. Y., Chen, S. J. et al. Studies on treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide: remission induction, follow-up, and molecular monitoring in 11 newly diagnosed and 47 relapsed acute promyelocytic leukemia patients. *Blood*, 94: 3315-3324, 1999.
9. Degos, L., Dombret, H., Chomienne, C., Daniel, M. T., Miclea, J. M., Chastang, C., Castaigne, S., and Fenaux, P. All-trans-retinoic acid as a differentiating agent in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood*, 85:2643-2653, 1995.
10. Chen, G. Q., Shi, X. G., Tang, W., Xiong, S. M., Zhu, J., Cai, X., Han, Z. G., Ni J. H., Shi, G. Y., Jia, P. M., Liu, M. M., He, K. L., Niu, C., Ma, J., Zhang, P., Zhang, T. D., Paul, P., Naoe, T., Kitamura, K., Miller, W., Waxman, S., Wang, Z. Y., de The, H.,

Chen, S. J., and Chen, Z. Use of arsenic trioxide (As_2O_3) in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL): I. As_2O_3 exerts dose-dependent dual effects on APL cells. *Blood*, 89: 3345-3353, 1997.

11. Kito, M., Akao, Y., Ohishi, N., Yagi, K., and Nozawa, Y. Arsenic trioxide-induced apoptosis and its enhancement by buthionine sulfoximine in hepatocellular carcinoma cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 291: 861-867, 2002.
12. Futatsugawa, S., Hatakeyama, S., Saitou, Y., and Sera, K. Improvement of experimental procedure of various samples in PIXE analysis. *Nuc. Instr. Meth. Phys. Res., B* 109/110: 113-120, 1996.
13. Lew, Y. S., Brown, S. L., Griffin, R. J., Song, C. W., and Kim, J. H. Arsenic trioxide causes selective necrosis in solid murine tumors by vascular shutdown. *Cancer Res.*, 59: 6033-6037, 1999.