

ヒト培養細胞(HSC4)の増殖に及ぼす ビスコクラウリン型アルカロイド(セファランチン)の影響

Effect of Cepharanthine on the Growth of Human Culture Cell Lines (HSC4)

(2010年3月31日受理)

松石 嘉織 松野 瞳美 川崎 祥二
Kaori Matsuisi Hitomi Matsuno Shoji Kawasaki

Key words : 培養細胞, 増殖, 細胞周期, HSC4, セファランチン

要 旨

ヒト口腔癌HSC4細胞を使用し, 細胞動態に対するビスコクラウリン型アルカロイド(セファランチン)(CEP)の作用を検討した。

- 1 比例増殖中の細胞は倍加時間36時間で, その細胞周期分画はほぼ一定であり, G_1 期18.5時間, S期12.4時間 G_2 /M期3.1時間であった。
- 2 比例増殖中の細胞にCEPを添加し, 細胞増殖に及ぼす影響を観察した。CEP(1 μ g)では細胞増殖がゆっくりとCEP(5 μ g)では急激に抑制された。
- 3 CEP(1 μ g)の抑制を解除すると24時間後には2倍以上に細胞が増殖することが観察された。
- 4 比例増殖中の細胞にCEP(1 μ g)を添加し細胞周期の分画の変化を観察した。CEPを添加すると G_1 期分画がゆっくりと増加し, S期, G_2 /M期が減少した。
- 5 比例増殖中の細胞にCEP(5 μ g)を添加すると G_1 期分画が急激に増加し, S期, G_2 /M期が減少した。

以上のことからHSC4細胞へのCEPの作用について考察した。

はじめに

培養細胞は分裂を繰り返しながらその数を増してゆく。細胞の増殖過程は大きく分裂期と休止期の2つに分けられる。形態的に劇的な変化をする分裂期(M期)に比べて休止期は形態的には大きな変化が見られない。

しかしながら, この休止期には次の分裂のための準備, すなわちDNAやタンパク質の合成が活発に行われている。細胞分裂から次の分裂までの間を細胞周期と呼び, 分裂期を(M), 休止期のDNA合成が行われている時期をS期と呼ぶ。M期とS期との間を G_1 期, S期とM期の間を G_2 期と呼び細胞周期を G_1 期, S期, G_2 , M期と4つの期に分けられている。細胞は分裂を行うとき細胞内DNA量は, 4nから2nになる。したがって, S期ではDNAが合成され2nから4nに増加する。図1に示すようにDNA量は G_1 期で2n, G_2 期では4nとなり, S期では2nから4nの間のDNA量となる。

細胞は周期を進行する過程でいくつもの遺伝子が発現しており, また, 外からの刺激(薬剤, 紫外線, 熱, 放射線等)による損傷を自らチェックするシステムをもっており, その反応系は G_1 期, G_2 期に存在することが報告されている。

近年フローサイトメトリーの発展によりこれら細胞内の細胞あたりのDNA量を測定することができ, 得られるDNAヒストグラムから細胞周期の分画を測定し細胞動態を解析することが可能となった。すなわち, 薬剤等に対する細胞の反応が処理後どのような細胞動態を示すかを知ることができる。

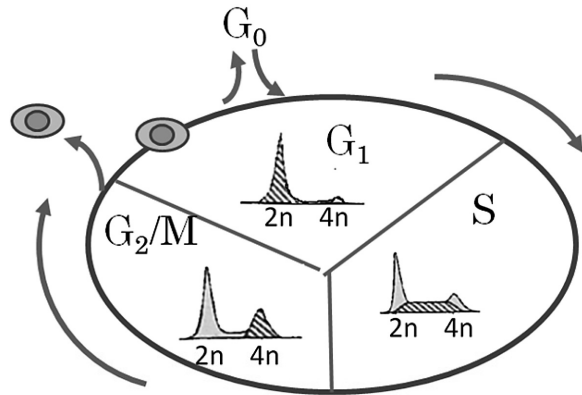


図1 細胞周期の図式化

フローサイトメトリーは蛍光物質により染色された細胞内物質を励起光により発する蛍光量を測定することにより細胞あたりの量を測定する方法であり、遺伝子発現により産生されるタンパク質や核酸(RNA, DNA)を測定することができる。

一方、タマノカズラから抽出されたセファランチン(以下CEPと略す)は、細胞膜の安定剤として知っている。その薬理作用としてK⁺イオンの透過性の阻害, NADPHの酸化酵素の阻害, ホスホリパーゼCの阻害, ホスホリパーゼA₂の阻害ヒスタミン遊離阻害, 脂質酸化の阻害, 細胞膜に存在する薬剤排泄ポンプの阻害等が報告されている。しかしながら、この薬剤の細胞動態に対する作用は明確ではない。これらの阻害作用を有するセファランチンが細胞の増殖にどのような作用をするかは興味ある問題である。

本実験ではヒト口腔癌細胞の培養細胞を使用し、その増殖曲線及び細胞動態へのCEPの影響を観察し、興味ある知見を得たので報告する。

材料と方法

細胞

使用した細胞はヒト口腔癌細胞HSC4細胞である。

培養

培養液はダルベッコ変法培地(日水製薬)にペニシリン(明治製菓), ストレプトマイシン(明治製菓)を添加し、10% 仔牛血清(Gibco)を加えたものを使用した。培養は5% CO₂+95% Airの炭酸ガス培養器(ASTEC)で培養し

た。トリプシン(Difco 1:250)は0.25%トリプシン溶液を使用した。

増殖曲線

シャーレ(Falcon 3003)に5×10⁵細胞/10cm dish, 10⁵細胞/6cm dishを播種し、24時間ごとにシャーレあたりの細胞数を血球計算盤で測定した。

セファランチン

タマノカズラから抽出されたビスコクラウリン型アルカロイド(商品名セファランチン)は化研生薬株式会社から提供を受けた。薬剤投与はCEPの使用濃度に希釈した培養液で毎日交換した。薬剤除去は無薬剤の培地で3回洗滌後新鮮培養液と交換した。

細胞分画を算出

対象群, CEP処理細胞群は24時間ごとにトリプシン処理して単一細胞を作成し、冷70%メタノール(-20℃)で固定した。その後-20℃で24時間以上保存した。DNA測定前に保存細胞懸濁液を冷PBSで3回洗滌後50µg/ml Propidium Iodide (PI) (Sigma)で染色し細胞あたりのDNAを計測した。測定はFACSキャリバー (Becton-Dickinson)で測定し、得られたDNAヒストグラムより細胞分画を算出した。図3からHSC4細胞の倍加時間は36時間が得られ、それを基にそれぞれの期の時間を求めるとG₁期18.5時間, S期12.4時間, G₂/M期3.1時間が得られた。

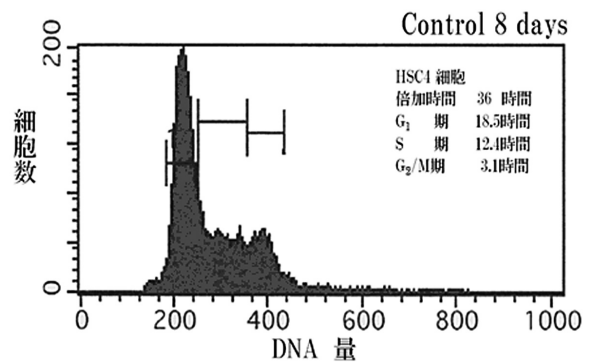


図2 HSC4細胞のDNAヒストグラム

図2はHSC4細胞の移植後8日の比例増殖期細胞のDNAヒストグラムで、この図からG₁, S, G₂/Mの細胞分画を算出した。

結 果

1 細胞動態に及ぼすCEPの影響(図3)

HSC4細胞は 10^5 個/6cmシャーレ、 5×10^5 個/10cmシャーレを播種し、24時間毎にシャーレあたりの細胞数を計測し増殖状態を観察した。播種後約24~48時間のラグ後細胞は増殖しはじめる。倍加時間36時間で 10^5 個/6cmシャーレの場合は播種後5日にはプラトーになった(図示していない)。 5×10^5 個/10cmシャーレでは播種後8日でも増殖を示した(図3)。播種後48時間にCEP 5 μ g/ml, 1 μ g/mlを添加すると5 μ g/mlでは増殖が抑制された。CEP 1 μ g/mlでは添加後3日には細胞増殖が抑制された。

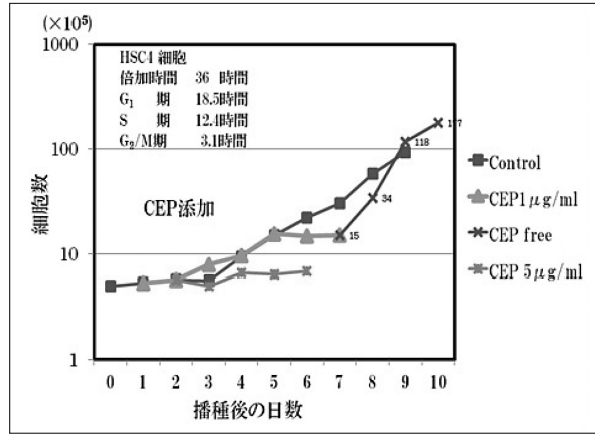


図3 HSC4細胞の増殖に及ぼすCEPの影響

HSC4細胞を播種後24時間ごとにシャーレあたりの細胞数を測定した。

このCEP(1 μ g/ml)処理で増殖しなくなった細胞群からCEPを除去すると除去後24時間には急激に増加し細胞数が2倍以上に増加した。除去後48時間には対象群と同じ細胞数になった。この急激な増殖を示す曲線から倍加時間を求めると16.8時間となった。

2 比例増殖期細胞の細胞周期の変動

図4は、播種後1から8日の対象群の細胞分画の変化を示している。G₁期、S期、G₂/M期の分画は大きな変動はなかった。S期は35%前後を維持していた。

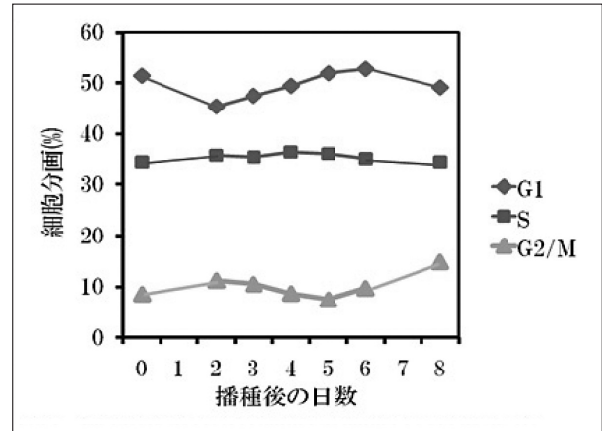


図4 播種後のHSC4細胞分画の変化

HSC4細胞を播種後24時間ごとにエタノール固定後PIにて染色後フローサイトメーターにて得られたDNAヒストグラムから細胞分画を算出した。

3 CEP(1 μ g)添加後のHSC4細胞の細胞分画の変化

図5は、CEP(1 μ g)添加後のHSC4細胞の細胞分画の変化を示す。CEP添加後G₁期が徐々に増加し、S期、G₂/M期は徐々に減少した。CEP添加後5日にはG₁期細胞の分画が66%と高値を示した。

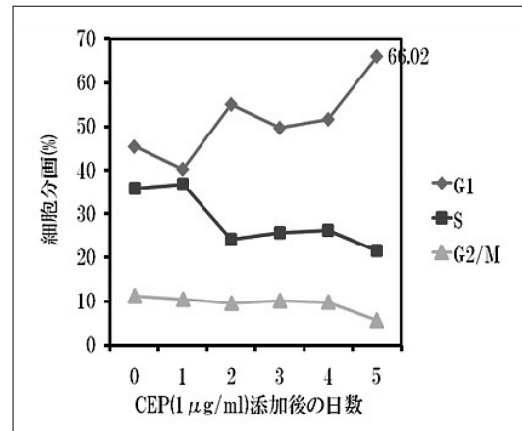


図5 CEP(1 μ g)添加後のHSC4細胞の細胞分画の変化

HSC4細胞を播種後48時間にCEP(1 μ g/ml)添加後24時間ごとに細胞を固定後フローサイトメーターにて細胞分画を求めた。

4 CEP(1 μ g/ml)を除去後の細胞分画の変化

図6は、CEP(1 μ g/ml)を5日間処理後、培養液交換にてCEPを除去し、その後の細胞分画の変化を観察した。CEP(1 μ g/ml)を除去したことにより、24時間後に

はG₁期の細胞が減少し、S期細胞の分画が増加していた。その後、細胞の分画は一定な状態になった。

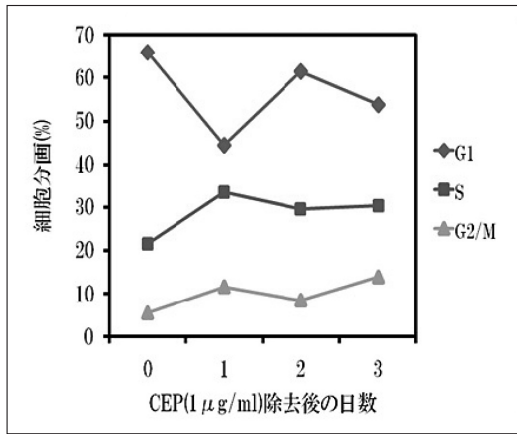


図6 CEP (1 µg/ml)を除去後のHSC4細胞の細胞分画の変化
 比例増殖中のHSC4細胞をCEP (1 µg/ml)で5日間処理し、処理後24時間ごとの細胞分画を求めた。

5 CEP (5 µg)添加後の細胞分画の変化

図7は、CEP (5 µg)添加後の細胞分画の変化を示す。CEPの添加後にはG₁期が急激に増加し、処理後3日には79%に達した。S期細胞、G₂期細胞の分画は減少した。

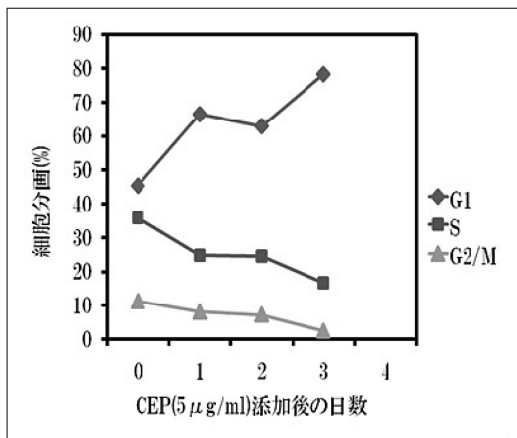


図7 CEP (5 µg)添加後のHSC4細胞の細胞分画の変化
 HSC4細胞を播種後2日目にCEP (5 µg/ml)を添加後24時間ごとの細胞分画を求めた。

考 察

セファランチン(CEP)の薬理作用として細胞膜の安定化に作用したり、細胞膜に存在する酵素の阻害や多剤耐性細胞の薬剤排泄ポンプの阻害等が報告されている。しかしながら、この薬剤を持続的に投与することによる細胞動態に対する影響は明確ではない。

比例増殖中のHSC4細胞の増殖はCEPを添加すると5 µg/mlの濃度では1日後から抑制され、また、CEP (1 µg/ml)の処理でも細胞増殖が徐々に抑制され、添加後4日には増殖は見られなくなった(図3)。したがって、CEPは細胞増殖を抑制する作用があることが明らかとなった。

CEPは細胞増殖を抑制する作用が見られることから、細胞分画のどの時期に作用するのかを検討した。G₁、S、G₂/Mの分画はコントロールではほぼ同じ割合であるが(図4)、CEP (5 µg/ml)では、添加後急激にS期、G₂/M期細胞の分画が減少をし、投与後3日目には79%にも達した(図7)。CEP (1 µg/ml)では比較的ゆっくりとG₁期分画が増加し、S、G₂/M期分画が減少した(図5)。このことは、この薬剤により、細胞の周期移行に必要な反応(遺伝子の発現)がこの薬剤で阻害され、進行がG₁期で止まり、G₁期に集積することを示している。

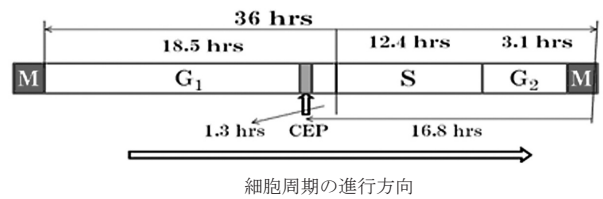


図8 セファランチンの細胞胞体に及ぼす作用機点
 HSC4細胞の倍加時間は36時間であるが、セファランチンを投与するとDNA合成前1.3時間のG₁期に集積する。

一方、CEP (1 µg/ml)の処理で細胞の増殖が抑制される薬剤を培養液から取り除くと、24時間後には2倍以上の細胞数となり(図3)、G₁期に集まっていた細胞は急速にS期、G₂/M期に進行したことを示している。CEPを取り除いた後の細胞の増殖曲線部分から倍加時間を求めると16.8時間となりS期、G₂/M期の時間が同じであるとすると、16.8時間からS期、G₂/M期の時間を差し

引くと、細胞はDNA合成1.3時間前に停止していたことになる(図8)。

したがって、DNA合成約1.3時間前に発現する代謝(遺伝子)を明確にすることによりとCEPの作用機構がより明確になると考えられる。

謝 辞

本研究を進めるにあたり、フローサイトメータ(FACSキャリバー)の技術指導をしていただいた岡山大学医学部共同実験室磯本幸成技官に感謝いたします。

参 考 文 献

- 1 Eric J. Hall, 細胞, 組織及び腫瘍の動態, 放射線生物学(浦野宗保訳) pp229-254, 篠原出版, 1995
- 2 <http://www.bc-cytometry.com>: 細胞周期分析
- 3 白石則之, 他: 医学と生物学, 98(3), 141, 1979
- 4 松野 剛, 他: 医学と薬学, 21(5), 889, 1989
- 4 タマサキツヅラフジ抽出アルカロイド 組成・性状, pp4, 化研生薬株式会社
- 5 KAWASAKI S et al. Recent aspects of elucidating the cellular basis of thermochemotherapy, Thermochemotherapy for neoplasia, inflammation, and pain, pp 424-432, Springer (Ed. by KOSAKA M. et al.), 2001.

