岡山医学会雑誌　第113巻
April 2001, pp. 1—16

原　著

Adriamycin 耐性ヒト膀胱癌培養細胞株の樹立と耐性機序に関する研究

明　比　直　樹

キーワード：adriamycin resistance, human bladder cancer cell line, multidrug resistance

緒　言

癌化学療法中に癌細胞が抗癌剤に対して抵抗性となる，いわゆる耐性化現象は癌化学療法において重大な問題となっている．Adriamycin（ADM）は膀胱癌の化学療法において有効な薬剤の一つであり，表在性膀胱癌に対しては再発予防の目的で膀胱腔内注入療法が行われ[1]，また進行膀胱癌に対しては M-VAC(methotrexate, vinblastin, adriamycin and cisplatin)療法[2]などの多剤併用療法における主たる薬剤のひとつとして全身化学療法あるいは単独または併用での動脈内注入療法が[3]行われている．しかし，抗癌剤が奏効する症例においても経過中に抵抗性を示す場合があり，また構造も作用機序も全く異なる他の抗癌剤にも耐性を示す症例もあり臨床上問題となっている．

また，種々のヒト細胞癌より樹立された ADM 耐性細胞においてもこのような多剤耐性が確認されており，その耐性機序の解明が急務となっている．最初，細胞膜に存在するポンプ機構の P-glycoprotein（Pgp）[4]による classical MDR（multidrug resistance)が中心となって研究され，多剤耐性獲得機構の解明が飛躍的に進んだが，その後 Pgp のまったく関与しない多剤耐性，すなわち atypical MDR も多くの細胞で認められさまざまな耐性機構が報告されてきている．特に Cole らによって ADM 耐性肺小細胞癌株 H69AR から分離，発見された multidrug resistance-associated protein(MRP)[5)6)]や DNA の高次構造変換を触媒する重要な DNA 代謝酵素である Topoisomerase（Topo）の関与が多くの施設から報告されている[7)8)]．また，薬剤の解毒機構に関るグルタチオン（GSH）や glutathion-S-transferase（GST）などの GSH 関連酵素，GSH 抱合された物質を細胞外に排出するポンプ（GS-X pump）がさまざまな抗癌剤耐性細胞において単独あるいは相互に関係しながら関与していると報告されているが[9)10)]，その関連の度合いは細胞や抗癌剤で異なり詳細ははっきりしていない．また GS-X pump として MRP の関与も強く示唆されているが今後さらに検討を要すると思われる．また抗癌剤の細胞内分布の変化が耐性化を引き起こしている可能性も指摘されており，その原因として MRP も含めて lung resistance related protein (LRP)[11)12)]など種々の細胞内輸送蛋白質の変化や細胞内 pH の変化[13)]などいろいろな機序が考えられているが，再分布の様式も報告によって異なり[14-16)]，この分野でもさらなる検討が必要と思われる．

今回，このような耐性機序を解明する目的で，ADM 耐性ヒト膀胱癌培養細胞株 T-24/ADM を樹立し，その生物学的特性，生化学的特性を検討した．

（平成12年6月23日受理）
岡山大学医学部泌尿器科学教室
指導：公文裕巳教授（岡山大学医学部泌尿器科学講座）
論文請求先：岡山大学医学部泌尿器科学教室

材料と方法

1）細胞および ADM 耐性細胞の樹立

今回使用した細胞は，1970年に Bubenik ら[17]により Sweden で初代培養，その後 Czechoslovakia で樹立株化されたヒト膀胱癌培養細胞株T-24であり，1979年12月に日本医科大学附属第一病院泌尿器科中神義三教授より提供された．T-24細胞の donor は82歳の女性であり膀胱移行上皮癌 grade Ⅲである．岡山大学での培養方法は10% bovine serum 添加 Eagle's MEM（日水製薬，東京）を培養液として用い，pH は $NaHCO_3$を加え約7.2になるように調節した．培養プラスチックシャーレ(3002 tissue culture dish，Falcon Co. USA）を用い開放系とし，37℃，5% CO_2下で静置培養を行った．継代は0.2% trypsin および0.04% EDTA の等量混合液にて週1回行った．耐性細胞の樹立は，培養液に ADM を添加することにより行った．ADM は 1×10^{-9}Mより開始し，濃度を漸増した．

2）制癌剤感受性試験

制癌剤感受性試験はコロニー形成法を用いた．Dish 内に semiconfluent monolayer に発育している細胞に PBS を加え細胞層を洗浄した後，0.2% trypsin および0.04% EDTA の等量混合液を加え，pipetting を行い single cell suspension とした．これを前述の培養液にて希釈し，生細胞数400個/mlの細胞浮遊液を作製した．これを予め培養液2.5mlを入れた3002 tissue culture dish に，0.5mlずつ分注し，200個/dish とした．37℃，5% CO_2下で24時間培養した後，培養液を捨て，各濃度の薬剤を加えた培養液で2時間（あるいは24時間）同様に培養し薬剤に接触させた．その後培養液を捨て，Hanks 液にて2回洗浄し，あらたに培養液を3mlを加え incubate した．10～12日目に培養液を捨て，メタノールにて固定しギムザ染色して乾燥させた後，細胞数30個以上よりなるコロニー数を算定した．薬剤無添加培養液のコロニー数をコントロールとして relative plating efficiency を各濃度別に計算し（各濃度3枚の dish を用い平均値を算出），これを片対数グラフにプロットしグラフの曲線から50%コントロールに相当する濃度を求め LD 50とした．実験はそれぞれの薬剤について3―4回行った．

制癌剤感受性試験に使用した抗癌剤は制癌抗生物質，植物由来制癌剤，代謝拮抗剤，植物アルカロイド，金属錯体化合物であり，制癌抗生物質としては，anthracycline 系の ADM およびその誘導体である terarubicin（THP），epirubicin（EPI）と mitomycinC (MMC)，bleomycin (BLM)，植物由来制癌剤としては，植物アルカロイドであり cyclophosphamide の活性体である 4-hydroperoxycyclophosphamide，ifosphamide の活性体である 4-hydroperoxyifosfamide，etoposide(VP-16)，および camptotecin 誘導体で CPT-11の活性体である SN-38を使用した．また代謝拮抗剤としては 5-fluorouracil（5-FU）および methotrexate（MTX），植物アルカロイドとして vinblastine(VLB)，vincristine (VCR)，vindesine (VDS)，白金錯体化合物として CDDP を使用した．薬剤接触時間は2時間としたが，代謝拮抗剤は24時間とした．

3）Doubling time 測定

感受性試験に用いた control のプラスチックシャーレ上のコロニーを無作為に50個取り出し，それぞれの細胞数を count した．細胞数と incubation time から doubling time を算出した．

4）細胞内への ADM 取り込み・排出

対数増殖期にあるT-24，およびT-24/ADMに1，5，10μg/mlの濃度に調整した ADM 添加培養液を接触させ，それぞれ30，60，90，120，150，180分後に PBS にて2回洗浄，0.2% trypsin および0.04% EDTA の等量混合液にて処理し，1,000rpm，3分間遠心後 cold PBS にて細胞浮遊液とし0℃を保ち，flow cytometry（FCM）にて細胞内の ADM 量を測定した．FCM は EPICS-750を使用し，488nm アルゴンレーザーで励起し，530nm 以上の蛍光量を15,000個の細胞で測定し，細胞1個あたりの平均を求め，forward light scatter の平均値で除し相対的細胞内 ADM 量とした．

排出については，5μg/mlの濃度に調整した ADM

添加培養液を接触させT-24, およびT-24/ADMそれぞれの細胞内ADM量がほぼ等しくなった時点(T-24；60分, T-24/ADM；120分) でPBSにて2回洗浄後ADM無添加培養液に変更し，上記と同様にFCMを使って細胞内のADM量を30, 60分後に測定した.

5）ADMの細胞内分布

T-24, T-24/ADMそれぞれの細胞をglass bottom microwells (Mat Tek Co.) に継代し，3－6日後に$3\times10^{-1}\mu g/ml$濃度のADM添加培養液を加えて，40分，120分のincubation後にPBSにて洗浄し，4℃のHanks'BSSを加え，共焦点走査レーザー顕微鏡 (Olympus LSM-GB 200) で観察した. また，細胞からの排出をみるためにADM添加培養液で40分，120分incubation後PBSにて洗浄し，ADM無添加培養液にて40分，120分incubationを行い，培養液を4℃のHanks'BSSに変えたものを同様に観察した.

6）細胞内還元型グルタチオン(GSH)，酸化型グルタチオン (GSSG) 量

GSHおよびGSSGは，Burchillら[18]の方法によって測定した. すなわち，細胞を10%トリクロル酢酸/0.02% HCl+0.25% TritonX-100, bovine serum albumin (BSA) 中で撹拌・氷中放置した後，遠心し上清を得た. これを2回繰り返し，等量のエーテルで5回抽出してトリクロル酢酸を除去した. これを5mM EDTA, 0.1Mリン酸緩衝液pH 7.5で20倍に希釈 (試料100μl) し，試料を2つに分けた. 一方の試料に，1.18mg/5－5'dithio-bis-(2-nitrobenzoicacid) (DTNB) solution (SIGMA D 8130) 0.1ml, 10U/mlのglutathione reductase solution (SIGMA G4751) 0.1ml, 1mg/mlのNADPH solution (SIGMA N6505) 0.1ml, リン酸緩衝液0.15mlを加えた. 室温にて412nmにおける吸光度を5分間測定し，既知量のGSHより得られる標準曲線からGSH量を求めた. また，もう一方の試料に0.04 M N-methylmaleimideを加え，室温で60分間incubateした. 次いで10回エーテル抽出した後，上記測定法にてGSSG量を測定した.

7）細胞内グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) 活性，GST-π量

GST活性はHabig[19]らの方法で測定した. すなわち，細胞にリン酸緩衝液を加えて凍結・融解を繰り返した後，遠心し上清を得た. これを試料として，30mM 1-chloro-2, 4-dinitrobenzene (CDNB) solution 0.1ml, 30mM GSH solution 0.1ml, 0.11 M KPO_4 buffer 3.0mlを加え，室温にて340nmにおける吸光度を5分間測定し，GST量を算出した.

細胞内GST-π量は，GST-π・EIAキット (大日本製薬) を使用して測定した. すなわち，上記の上清または標準GST-π溶液50μlとperoxidase標識抗GST-πマウスモノクローナル抗体300μlおよび抗GST-πマウスモノクローナル抗体を結合したポリスチレンボール1個を混合し37℃，60分間静置した後，反応液を除去し，洗浄液にて2回ボールを洗浄. つぎにボールを新しい試験管に移し，酵素基質液500μlを加え30分間静置させた後反応液を2ml加え混合後，492nmにおける吸光度を測定，標準曲線から検体のGST-π濃度を測定した.

8）細胞内メタロチオネィン (MT) 量

a）細胞上清の採取

細胞をPBSで3回洗った後，50mM Tris-HCl (pH 8.6) を加え，cell scraperにて細胞を集めた. これをsonicator (HEAT SYSTEMS, Models W-220) にて30秒間処理後，4℃にて20,000Gで30分間遠心分離し，その上清を1分間沸騰水中で加熱処理した後，再び4℃にて20,000Gで30分間遠心分離し，その上清を得た.

b）^{125}I-Tyr-MTの調製およびMTのラジオイムノアッセイ

清水ら[20]の方法に従って，二重カップリング試薬Mmaleimido-benzoyl-N-hydroxy-succimide (MBS) を用いて，ラット肝MT-2を化学修飾し，この化学修飾されたTyr-MT-2をクロラミンT法により^{125}Iで標識化した. また，MTの定量は，池井ら[21]の方法に準じてラジオイムノアッセイにて行った. 標準希釈液としては0.25% BSA, 10mM EDTA-2Naおよび0.01% NaN_3を含有する0.05Mリン酸

緩衝液 pH 7.4を用いた．ガラス試験管（10×75mm）に標準希釈液200μl，抗 MT 血清（希釈液にて20,000倍に希釈したもの）100μl，標準試料または検体100μl および^{125}I-Tyr-MT-2（約10,000 cpm）100μl を入れ，4℃で48時間反応させた．反応後，抗ウサギ IgG ヤギ血清（400倍希釈）100μl，ウサギ血清（40倍希釈）100μl および12.5%ポリエチレングリコール200μl を添加した．室温にて30分間反応後，反応混合物を 4℃にて，30分間，3000rpm で遠心分離し，上清と沈澱を傾斜にて分離後，両者の放射活性をガンマカウンターで測定した．

9）P-glycoprotein の検出

細胞を single suspension とした後，P-glycoprotein に対する monoclonal 抗体である MRK-16（東京大学医学部応用微生物研究所鶴尾隆先生より提供）で氷中に30分間 suspend し，つぎに FITC 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体にて同様に30分間 suspend，517nm の波長を FCM にて測定した．また positive control として ADM 耐性の small cell lung cancer cell line である SBC-3/ADM（岡山大学第二内科より提供）[22]を使用した．

10）Topoisomerase（Topo）活性の測定

a）Crude nuclear extract

細胞を PBS にて2回洗浄後，cell scraper にて集め遠心し，その pellet を PBS（−）+10mM $MgCl_2$/0.35% TritonX 1 mlにて氷中で10分間 suspend し，vortex 後，1000 g，10分間遠心を行い pellet を得た．この pellet に 1×Nuclear extraction buffer（1 M Tris-HCl（pH 7.5）20μl，5 M NaCl 70μl，14M 2-Mercaptoethanol 10μl，10mg/ml BSA（DNAase free）5 μl，ddH_2O 895μl）を加え氷中で30分間 suspend，1,2000 g で5分間遠心後上清をとり crude nuclear extract とした．

b）DNA topoisomerase assay（I．II）

上記方法で得た，crude nuclear extract の蛋白濃度を Bio-Rad protein assay kit にて測定し，各細胞間で蛋白量を合わせた後，1×nuclear extraction buffer で2倍ずつ段階希釈した．ddH_2O 14μl，5×reaction buffer（5×Topo I buffer；1 M Tris-HCl（pH 8.0）50μl，5 M NaCl 100μl，0.5M EDTA（pH 8.0）10μl，ddH_2O 840μl，5×Topo II buffer；1 M Tris-HCl（pH 8.0）250μl，2 M KCl 300μl，1 M Mg_2Cl_2 50μl，1 M DTT 2.5μl，0.5 M EDTA 5 μl，0.1M ATP 25μl，10mg/ml BSA（DNAse free）352.5μl）4 μl，0.5μg/μl substrate DNA（Topo I：pBR 322 form I，Topo II：kinetoplast DNA；岡山大学病態分子生物学筒井研助教授より提供）を mix し，これに2倍ずつ段階希釈した sample 1 μl を加え50℃，40分間 incubation 後，SDS，proteinasc K を加え反応を停止させた．反応溶液12μl を0.8% agarose/TBE gel に apply し，50V，90分間電気泳動し，ethidium bromide を添加後 UV 下に写真撮影を行った．

11）MRP（multidrug resistance-associated protein）のウエスタンブロット法による検出

T-24およびT-24/ADM を培地上で PBS にて3回 wash し，10mlの PBS を加え cell scraper で細胞を回収した．800rpm，5分間の遠沈で回収された細胞を，lysis buffer［62.5mM Tris-HCl，pH 6.8；0.25M sucrose；2% sodium dodecyl sulfate（SDS）；1.25% 2-mercaptoethanol；1 u/ml Aprotinin（Boehringer Mannheim）；1 mM 4-（2-aminoelthyl）-benzenesulfonyl fluoride，hydrochloride（Pefabloc SC，Boehringer Mannheim）］中で pipetting し，95℃で15分間 incubate 後，10000rpm，20℃，10分間の遠沈後の上清を cell lysate とした．この lysate を Coomassie plus Protein Assay Reagent（Pierce）でタンパク質定量し，その30μgタンパクを6% SDS-PAGE で分離した．ニトロセルロース膜に blotting 後，10%正常ウマ血清と5% skin milk を含む TBS（10mM Tris-HCl，pH 7.6，150mM Nacl）で2時間ブロッキングし，1% gelatin を含む TTBS（20mM Tris-HCl，pH 7.5，500mM Nacl，0.05% Tween-20）溶液で希釈した抗 MRP 抗体（rat monoclonal antibody，clone：MRPr 1）と37℃で1時間反応させた．Horseradish Peroxidase の conjugate された抗ラット IgG 抗体を1% gelatin を含む TTBS

で希釈し，25℃で30分間反応させた後，ECL 法(enhanced chemiluminescence)により発色させた．

また，統計学的検討は student's t test により行った．

結　　果

1）ADM 耐性細胞の樹立

ADM を添加した培養液で継代培養し（18ヶ月間）その濃度を漸増することにより 2×10^{-7}Mの濃度においても増殖する ADM 耐性株T-24/ADM を樹立した．なお，以下の実験成績は ADM 無添加培養液で1ヶ月間継代培養した後のものである．

2）制癌剤感受性試験

T-24，T-24/ADM の ADM に対する dose response curve は Fig. 1のごとくで，それぞれの細胞の LD 50はT-24 0.2±0.06μg/ml，T-24/ADM 7.1±0.45μg/mlで ADM 耐性株は親株に対して34.9倍の耐性度を示した．おなじ anthracycline 系で ADM の誘導体である EPI, THP にもそれぞれ185.7倍，26.4倍と交差耐性を示した．また，VCR，VP-16，VDS，SN-38にもそれぞれ420，24.9，20.7，4.8倍と交差耐性を示したが，MMC，BLM，4-hydroperoxycyclophosphamide，4-hydroperoxyifosphamide，5-FU，VLB，CDDP にはそれぞれ0.9，0.93，1.13，1.26，1.13，1.5，0.97倍と親株と耐性株間で差がなかった．また，MTX の相対的耐性度は0.19倍であり collateral sensitivity を示した．（Table 1）

3）生物学的特性

Doubling time はT-24 27.3時間，T-24/ADM 26.6時間でほとんど差を認めず，plating efficiency はT-24 71.2%，T-24/ADM 82.0%で耐性株がやや高値であった（Table 2）．

4）細胞内への ADM の取り込み・排出

各種濃度の ADM をT-24と接触させた場合の60，120，180分後の細胞内 ADM 濃度は，1μg/mlではそれぞれ0.078，0.138，0.170，5μg/mlでは0.244，0.444，0.662，10μg/mlでは0.398，0.900，1.096であり，ADM 濃度に依存して細胞内への ADM の取り込みが増加した．また耐性株T-24/ADM につい

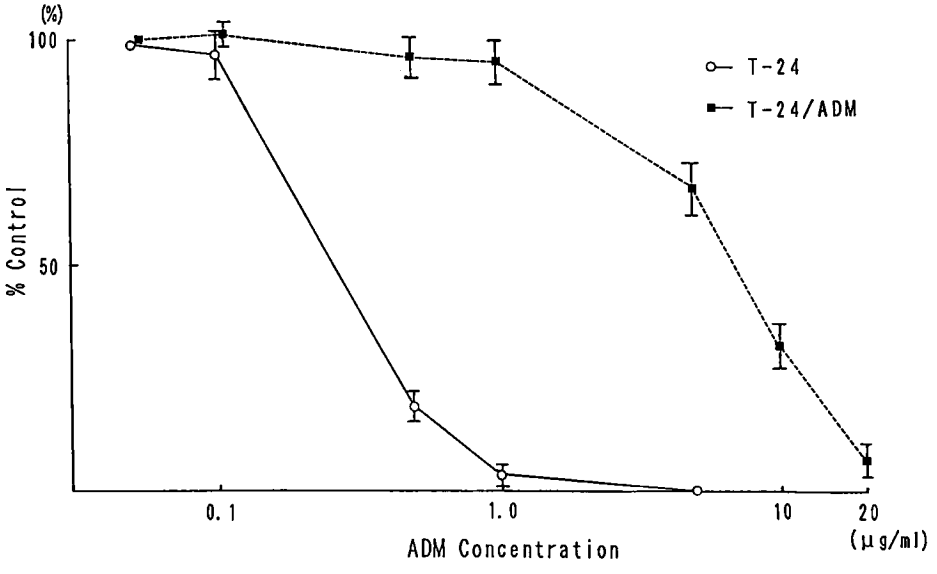


Fig. 1　Dose Response Curves for ADM
Dose-response curves for ADM in T-24 and T-24/ADM. Cells were exposed to various concentrations of ADM for 2 hours and plating efficiency was measured by colony formation assay. Bars : Mean±standard deviation (SD).

Table 1 ID 50 and Resistance Ratio

Drugs	ID 50 (μg/ml)		Relative Resistance
	T-24	T-24/ADM	
ADM	0.2 ±0.06	7.1 ±0.45	34.9
EPI	0.14±0.06	26 ±7	185.7
THP	0.06±0.04	1.65±0.15	26.4
MMC	0.23±0.01	0.21±0.01	0.9
BLM	4.23±1.50	3.93±0.70	0.93
CPM	2.3 ±0.56	2.6 ±0.53	1.13
IFO	5.7 ±0.42	7.2 ±0.99	1.26
MTX (24 hrs)	0.87±0.17	0.17±0.08	0.19
5-FU (24 hrs)	1.14±0.26	1.29±0.12	1.13
VLB	2.9 ±0.3	4.4 ±2.4	1.5
VDS	0.41±0.29	8.5 ±1.52	20.7
VCR	0.25±0.07	105 ±7.07	420
CDDP	0.53±0.01	0.52±0.08	0.97
VP-16	3.85±0.50	96 ±2.83	24.9
SN-38	0.05±0.01	0.24±0.08	4.8

Table 2 Biological Characteristics

Parameter	T-24	T-24/ADM
Doubling Time (hrs)	27.3	26.6
Plating Efficiency (%)	71.2	82.0

Table 3 Biochemical Characteristics

Parameter[a]	T-24	T-24/ADM
GSH (nmol/4×10⁶cells)	7.09±0.82	6.91±1.43
GSSG (nmol/4×10⁶cells)	0.04±0.01	0.06±0.03
GST (μmol/min/mg protein)	0.06±0.01	0.08±0.03
GST-π (μg/mg protein)	2.60±0.3	4.41±0.2 [b]
MT (μg/mg protein)	1.77±0.09	2.02±0.27

[a]Mean±SD
[b]Significantly different (P<0.01) from the T-24 cells

ては60, 120, 180分後の細胞内 ADM 濃度は，1 μg/mlではそれぞれ0.059, 0.088, 0.088, 5 μg/mlでは0.160, 0.233, 0.267, 10μg/mlでは0.232, 0.336, 0.458と親株と同様に ADM 濃度の増加にともなって細胞内への ADM 取り込みは増加した．しかし，親株に比べ各 ADM 濃度において取り込みが35—60%減少していた．(Fig. 2)

一方，ADM 無添加培養液に変更直前の細胞内 ADM 濃度を100%とすると30, 60分後には T-24ではそれぞれ73, 58%，T-24/ADM では56, 48%であり，短時間で排出が耐性株でやや亢進していた．

5) ADM の細胞内分布

共焦点走査レーザー顕微鏡による ADM の細胞内分布の検討では，ADM 添加培養液を加えた後，時間の経過とともにT-24, T-24/ADM とも細胞内への ADM の蓄積の増加が見られたが，T-24に比べT-24/ADM で蓄積がやや悪かった．また ADM 無添加培養液に変えて120分 incubation を行なったところ，細胞質の顆粒状分布については両者間で大きな差はなかったが，ADM の核内分布はT-24/ADM は親株に比較して明らかに減少していた．(Fig. 3)

6) 生化学的特性

細胞内 GSH は，T-24 7.09nmol/4×10⁶cells, T-24/ADM 6.91nmol/4×10⁶cells, 細胞内 GSSG は，T-24 0.04nmol/4×10⁶cells, T-24/ADM 0.06 nmol/4×10⁶cells と GSH, GSSG とも親株，耐性株間で差を認めなかった．細胞内 GST 活性は，T-24 0.06μmol/min/mg protein, T-24/ADM 0.08 μmol/min/mg protein, 細胞内 GST-π 量はT-24 2.60μg/mg protein, T-24/ADM 4.41μg/mg protein と GST 活性，GST-π 量とも親株に比し耐性株でやや上昇しており，とくに GST-π 量は約1.7倍に増加しており統計学的に有意差を認めた．また細胞内の MT 量はT-24 1.77μg/mg protein, T-24/ADM 2.02μg/mg protein と耐性株でやや増加していた．(Table 3)

7) P-glycoprotein の発現の有無

FCM による P-glycoprotein の発現の検討では，Fig. 4のごとく positive control である ADM 耐性 small cell lung cancer cell line SBC-3/ADM で明らかな発現が認められたが，T-24, T-24/ADM では過剰発現は認められなかった．

8) Topoisomerase 活性

pBR 322, kinetoplast DNA を使った

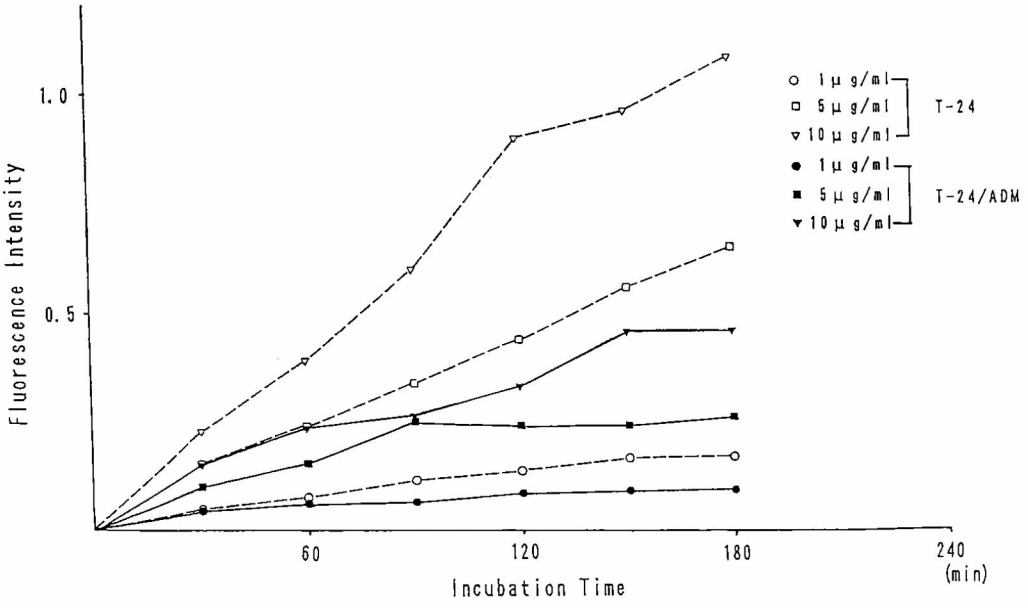
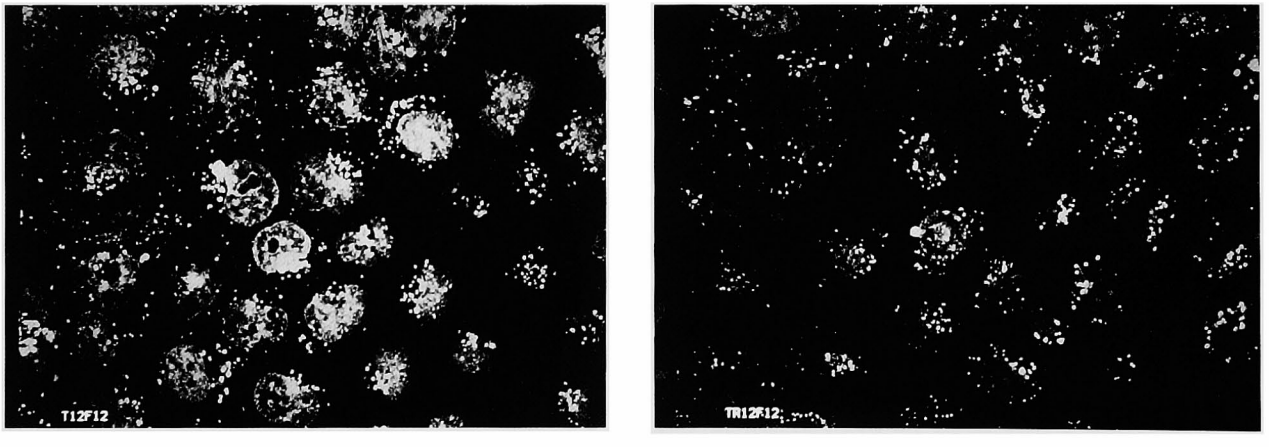


Fig. 2 Flow Cytometric Analysis ADM-Uptake
A flow cytometric analysis on ADM-uptake in T-24 and T-24/ADM under various concentrations of ADM (1, 5, 10μg/ml).



(a) T-24 (b) T-24/ADM

Fig. 3 Analysis of Intracellular Distribution of ADM
Analysis of intracellular distribution of ADM by laser confocal fluorescence imaging microscopy in (a) T-24 and (b) T-24/ADM after 2 hours treatment with 3×10^{-1}μg/ml ADM following 2 hours incubation with drug-free medium.

Topoisomerase 活性の検討では，T-24，T-24/ADM とも Topoisomerase I 活性は明らかな差はなく，Topoisomerase II 活性はT-24に比しT-24/ADM で約1/2に低下していた．(Fig. 5)

9) MRP の発現の有無

ウエスタンブロット法による MRP の検討では，T-24では発現がほとんど認められなかったが，T-24/ADM では親株に比べ多く認めた．

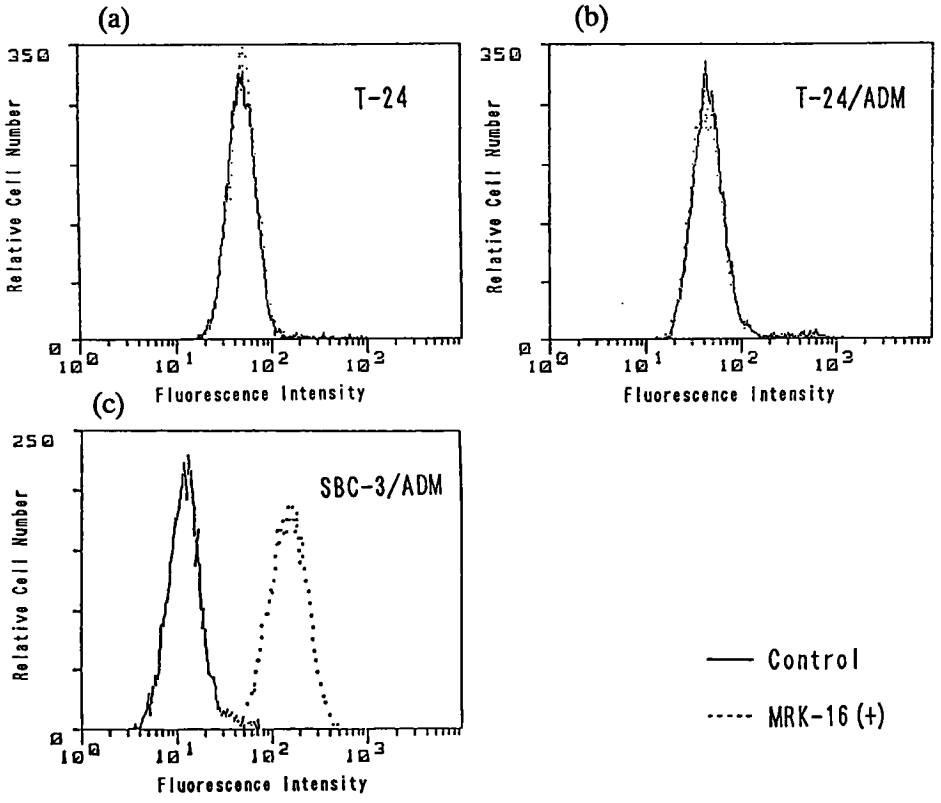


Fig. 4 Histogram Stained with MRK-16
A flow cytometric analysis of the P-glycoprotein expression in T-24 (a) and T-24/ADM (b), and in SBC-3/ADM (c) as positive control.

考　　察

ヒト膀胱癌培養細胞株T-24に ADM を持続接触させ，2×10^{-7}Mの濃度においても増殖する ADM 耐性株T-24/ADM を樹立した．耐性細胞樹立の指標について明確なものはないが，今回の耐性細胞は親株に比べ高度の耐性度を示し，また ADM 非添加の培養液中にて6ヶ月以上継代維持しているにもかかわらず，耐性度にまったく変化がみられないことより stable な耐性株と思われた．

コロニー形成法を用いた制癌剤感受性試験では，T-24/ADM はT-24に比べ34.9倍の耐性を示した．また同じ anthracycline 系で ADM の誘導体である EPI, THP にも交差耐性を示したが，植物アルカロイドである VCR, VDS, VP-16, SN-38といった構造も作用機序も全く異なる抗癌剤にも交差耐性を示しており，多剤耐性を示していた．また興味深いことに，MTX については耐性度で0.19倍と collateral sensitivity を示していた．ADM 耐性細胞で MTX に対して collateral sensitivity を示した報告は散見されるにすぎないが，Matsuo ら[23]は ADM 耐性肺小細胞癌株 SBC-3/ADM-100が MTX を含む葉酸拮抗剤に対して collateral sensitivity を示すとともに，親株に比べ耐性株で新しい葉酸拮抗剤 TNP-351 の細胞内への取り込みの増加と蓄積の増加が認められたと報告している．また，Herman ら[24]は ADM 耐性 Chinese hamster ovary (CHO) cell で MTX の collateral sensitivity を示すとともに，その機序として細胞内への MTX の取り込みの増加と排出の減少，dihydrofolate reductase の減少を挙げており，T-24/ADM においても今後検討を要すると思われた．

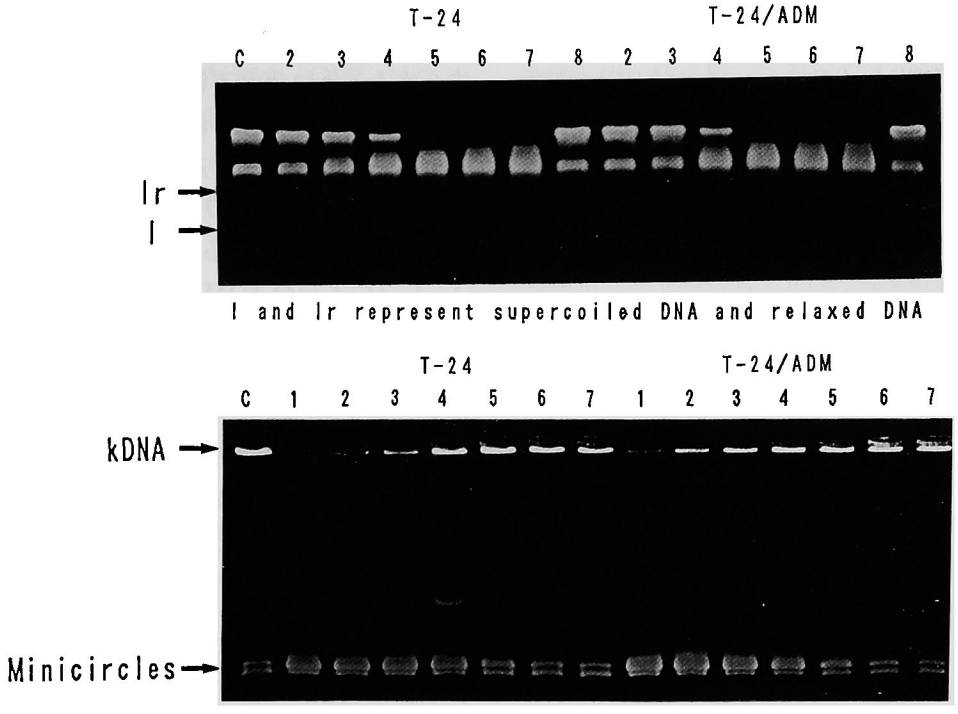


Fig. 5 Topoisomerase I and II Activities
Topoisomerase activities in the nuclear extracts of T-24 and T-24/ADM. (a) Topoisomerase I as measured by the relaxation assay with supercoiled pBR 322 DNA. (b) Topoisomerase II as measured by the decatenation assay with kinetoplast DNA. The extract protein amounts were as follows ; C no extracts protein, 1 ; 2 μg, 2 ; 1 μg, 3 ; 0.5μg, 4 ; 0.25μg, 5 ; 0.125μg, 6 ; 0.06μg, 7 ; 0.03μg, 8 ; 0.015μg

薬剤耐性の機序としては，1）細胞膜変化，薬剤の膜輸送機構の変化による細胞内薬剤蓄積量の低下，2）薬剤の活性化経路の不活化，不活化する解毒機構の活性化など薬剤代謝酵素の変化，3）細胞内薬剤分布の変化，4）細胞内標的酵素量の変化またはその変異，5）核内の変化，DNA 修復酵素の変化等があげられる．

今回のT-24/ADM については，FCM による細胞膜の解析では，細胞膜に存在するポンプ機構で多剤耐性に関係すると言われている P-glycoprotein (Pgp)[4]の過剰発現は認められなかったが，細胞内への ADM の取り込みの低下および排出の亢進がみられ，このことが ADM 耐性さらには多剤耐性の一つの要因になっているものと考えられた．

このような細胞内の薬剤蓄積量の低下に起因し，Pgp の関与しない多剤耐性の機序については，1）膜に存在する cytosine arabinoside, methotrexate, nitrogen mustard, CDDP, cyclophosphomide などに対する transport 系の量的な減少，ないし，膜の透過性の低下など細胞膜の変化による薬剤の取り込みの低下，および，2）薬剤の排出や細胞内薬剤分布の変化に関与する Pgp とは異なる膜輸送体の存在が考えられる[25]．1）について，ADM は VP-16 と同じように transport carrier が存在しないと考えられているが，実際には耐性機序の一つとして取り込み量の低下が認められている．Ramu ら[26)27]は，ADM 耐性P388株と親株について，ADM は受動的に細胞内に拡散するがその比は明らかに耐性株で低く，耐性株での plasma membrane 中の lipid 含量が高かったと報告している．また，Mountford ら[28]は VLB 耐性細胞とその親株について plasma membrane 中の neutral lipid 含量を調べたところ，耐

性株で上昇しており，薬剤の浸透性の低下が耐性化をもたらしたとしている．2）については，P-糖蛋白質と同様に ATP binding cassette（ABC）膜輸送蛋白質のスーパーファミリーに属する MRP[5)6)]が発見され，種々の多剤耐性(ADM, VCR, VP-16など）細胞株や臨床上の癌組織でその発現が確認されてきている[29)30)31)]．今回のT-24/ADM についてもMRP の発現が確認されておりこれが耐性の一つの要因になったと思われるが，多剤耐性に関与する未知の ABC スーパーファミリーの可能性も含めて今後の検討を要する．

薬剤代謝酵素の変化については，P-450などの薬物活性化酵素（Phase I 酵素）の活性低下，あるいは薬剤を不活化する解毒系酵素（Phase II酵素）の活性上昇が耐性機序として考えられる．

L-γ-glutamyl-L-cysteinyl-glycine のトリペプチドの構造をもつグルタチオン（GSH）は細胞において触媒的な働き，輸送，還元プロセスに関与する細胞成分であり，毒性物質の解毒に携わる．GSH の抗癌剤耐性の機構としては 1）melphalan, chlorambucil といったアルキル化剤を GSH 抱合により不活化する，2）CDDP, melphalan のように DNA 鎖間と架橋をおこす薬剤と結合することにより DNA 架橋形成を阻害する，3）ラジカルが抗癌作用に関係する ADM, MMC といった薬剤に対してラジカルを消去する，4）GSH 抱合体として MRP も含めて細胞膜における薬剤輸送のポンプの基質として働くことが考えられている[9)10)]．

また GSH 抱合を触媒する glutathion-S-transferase（GST）はさまざまな抗癌剤や発癌剤を含む外因性有機化合物を GSH 抱合するほか，ビリルビン，ステロイド，ホルモンなどと直接結合したり，脂質や核酸の過酸化脂質を還元するといった多機能蛋白質である．この isozyme の中で胎盤や肺を除いて正常組織にはほとんどみられない GST-π が各種悪性腫瘍組織で認められ，また GST-π が増加している腫瘍細胞はある種の抗癌剤に対して耐性を示すことが多い．GST，特に GST-π の抗癌剤耐性に関与する機序としては GSH ともに作用することが多く，1）melphalan, chlorambucil といったアルキル化剤を直接または薬剤の中間代謝活性体を GSH 抱合することにより不活化する，2）抗癌剤に直接結合することにより不活化する，3）GST のペルオキシダーゼ作用により過酸化水素，過酸化脂質を還元する，4）過酸化 DNA を減少させ，DNA を修復すると考えられている．今回の検討では細胞内 GSH は，T-24, T-24/ADM の両者間で差はなかったが，GST 活性，GST-π 量については親株に比し耐性株で上昇しており，とくに GST-π 量は約1.7倍の値を示しており多剤耐性の一因となった可能性がある．

また，他の解毒系酵素としてビスマス等，重金属によって誘導合成される金属結合蛋白質，MT が重金属やアルキル化剤と高い親和性を持ち，それらの毒性を軽減し[32)33)]，またスーパーオキサイドラジカル（O2-）やハイドロキシルラジカル（·OH）などのフリーラジカルを除去する能力を有する[34)35)]ことが報告されている．また，現在，重金属化合物である白金錯体のほかに種々のアルキル化剤やフリーラジカル生成活性を有する化合物が抗癌剤として使われているが，腫瘍組織中で MT の合成が誘導されれば，これらの抗癌剤に対して多剤耐性を獲得する可能性も考えられる．また実際にカドミウム(Cd)や CDDP 耐性細胞において MT が上昇しているとの報告もあり[36-40)]，また腫瘍組織内で MT を誘導合成することを確かめた亜鉛化合物を担癌マウスに前投与すると，ADM の抗腫瘍性が顕著に抑制されるとの報告もある[39)]が，今回の検討では耐性株で細胞内 MT 量がやや増加していたがあまり差は認められなかった．

DNA Topoisomerase（Topo）は DNA の複製，転写などの DNA 代謝に際して，高次構造変換を触媒する重要な DNA 代謝酵素で，I と II があり両者とも DNA 鎖と複合体を形成し DNA 鎖の切断，再結合を行う．Topo I は DNA の単鎖切断を行うのに対して，Topo II は ATP 存在下で反応が行われ，Topo 阻害剤は Topo 蛋白質と DNA の複合体に結合し，安定化させることにより切断された DNA の再結合を阻害すると考えられている．Topo I および Topo II 阻害剤への耐性獲得の機序としては，1）

Topo I および Topo II の発現レベルの低下[7)41-43)], 2）遺伝子内の突然変異によるアミノ酸変化による質的な構造変化[44-48)], 3）VP-16や CPT-11など Topo I, Topo II 阻害剤の細胞内蓄積量の低下[49)50)]が生じることに起因すると考えられているが，高濃度の耐性を獲得するためには単一ではなく複数の耐性機序が作用することも報告されている[41)49)]. 今回の制癌剤感受制試験では Topo II 阻害剤である VP-16および Topo I 阻害剤で CPT-11の活性体である SN-38において耐性株は親株に対してそれぞれ26.9倍3.6倍と交叉耐性を示したがとくに VP-16で顕著であった. Topo I 活性については親株と耐性株で活性に変化はなく，他の耐性機序がおこっている可能性もある. また，Topo II 活性は親株に比し耐性株で約2倍の活性低下が認められ，このことが VP-16に対し耐性を示す一因と考えられるが, 耐性度を考慮すると Topo II 活性の低下[42)51)52)]以外に，Topo II 量の低下[51)53)], Topo II 阻害剤の細胞内蓄積量の低下[50)53)]など他の耐性機序が作用している可能性も十分あると考えられた.

ADM の細胞内分布の検討では，ADM 添加培養液を加えた後，時間の経過とともにT-24, T-24/ADM とも細胞内への ADM の蓄積の増加が見られたが，T-24に比べT-24/ADM で蓄積が悪く，また ADM 無添加培養液に変更後，ADM の核内への分布は親株に比較して耐性株で明らかに少なくなっていた. Hindenburg ら[14)]は daunomycin (DNR) の細胞内分布を digitized video microscopy を使用して Pgp の発現していない anthracycline-resistant HL-60 cell line で調べているが，親株では DNR が核，細胞質に一様に分布するのに対して，耐性株では大部分の DNR は最初，Golgi 装置に取り込まれ，次に徐々に lysozome や mitochondria あるいは細胞外に移行していたと報告した. 同様に, Willingham ら[15)]も drug-resistant KB cell を使った同様な実験で耐性株では核内への取り込みがなく, 大部分の DNR は Golgi 装置と lysozome に分布していたと報告している. Marquardt ら[16)]も Pgp の発現していない ADM-resistant HL-60 cell における DNR の取り込みをcell fractionation technique を使用して調べたところ，最初 DNR は親株，耐性株とも核に蓄積されるが, 排出相では親株では DNR が核に保持されるのに対して，耐性株では速やかに核より離れていたと報告している. 薬剤の細胞内分布の変化をきたす原因として Ouar ら[13)]は細胞質 pH の違いを指摘しており，又，Scheper, Scheffer ら[11)12)]は Pgp とは異なり，ER あるいは Golgi 装置など一連の exocytotic compartment として細胞質内の membrane に存在し，Pgp と同様に ATP-dependent に有害物質を排出する機能を持った LRP (lung resistance related protein) と名付けられた transporter protein を同定し報告している. また，MRP が過剰に発現している細胞では細胞内への薬剤の蓄積は多くの場合減少しているが，薬剤の耐性度に比べて軽微であり，また変化のないものも報告されている. さらに Pgp が過剰に発現している細胞と比べて薬剤の細胞外への排出はそれほど顕著ではなく[54)]，また MRP が細胞膜だけでなく，細胞質内 (小胞体) に局在しているとの報告もある. したがって今回のT-24/ADM も含めて, ABC スーパーファミリーなど輸送蛋白質の変化が抗癌剤の細胞内分布を変化させ，標的分子に到達できないために耐性化を引き起こしている可能性もあると考えられた.

今回のT-24/ADM における耐性機序としては1）細胞内への ADM の取り込みの低下および排出の亢進に伴う，蓄積の低下 (MRP の過剰発現も含めて) 2）ADM の細胞内分布の変化，特に ADM の核内への分布の減少 3）Topoisomerase II 活性の低下 4）細胞質内の GST-π 量の増加があげられ，その関わりの程度については特に1)—3）の関与が強いと思われるが判然としない. ADM に対して耐性度の異なるT-24/ADM を作成し，耐性度別に上記因子を検討することによりさらに詳細な情報が得られると思われる.

今後は，この耐性細胞を使用し ADM 耐性機序の解明をさらに進めていくとともに，多剤耐性膀胱癌に対する化学療法選択のモデルとして臨床に応用していきたい.

結 論

ADM 耐性機序を解明する目的で，ADM 耐性ヒト膀胱癌培養細胞株T-24/ADM を樹立し，生物学的，生化学的特性を比較検討した．

1）ADM 耐性ヒト膀胱癌培養細胞株T-24/ADM は親株に対し34.9倍の ADM 耐性度を示した．

2）両株とも doubling time にほとんど差を認めなかったが，Plating efficiency はT-24/ADM が親株に比し若干上昇していた．

3）制癌剤感受性試験による検討では Anthracycline 系薬剤で ADM の誘導体である EPI，THP に交差耐性を示していたが，それ以外に VCR，VDS，VP-16，SN-38にも交差耐性を示し，多剤耐性となっていた．また，MTX には collateral sensitivity を示した．

4）T-24/ADM では細胞内への ADM の取り込みの低下および排出の亢進が認められ，蓄積は親株に比し約1/2に低下していた．

5）耐性株と親株で ADM の細胞内分布に差が見られ，特に ADM の核内への分布がT-24/ADM で明らかに少なくなっていた．

6）細胞質内の GST-π 量についてT-24/ADM で軽度増加していた．

7）T-24/ADM で Topoisomerase II活性の低下が認められた．

8）T-24/ADM でMRP の過剰発現が認められた．

稿を終えるにあたり，御指導，御校閲を賜った恩師大森弘之名誉教授，および公文裕巳教授に深謝いたします．さらに貴重な御助言・御指導を賜った津島知靖助教授，本実験を御指導・御協力いただいた那須保友講師，三原浩一郎先生，井上高明先生，渡辺昌実先生に深謝いたします．最後に，T-24細胞を御提供くださいました日本医科大学中神義三教授，SBC3/ADM を御提供いただいた岡山大学第2内科原田実根教授，pBR322，kinetoplast DNA を御提供くださいました岡山大学病態分子生物学筒井研助教授，MRK-16を御提供いただいた東京大学分子細胞生物研究所鶴尾隆先生，メタロチオネイン測定にご協力いただいた大塚アッセイ研究所，実験に御協力いただいた梅井幸江嬢，原淵尚子嬢に謝意を表します．

文 献

1）津島知靖，大森弘之：表在性膀胱癌に対する抗癌剤再発予防注入療法 — Randomized Trial による共同研究の長期 Follow-up 成績 — 日泌尿会誌 (1992) **83**巻，8号，1314—1321.

2）Sternberg CN, Yagoda A, Scher HI, Watson RC, Herr HW, Morse MJ, Sogani PC, Vaughon ED, Bander N, Weiselberg LR, Geller N, Hellander PS, Lippermen R, Fair WR and Whitmore WF：M-VAC (methotrexate, vinblastine, doxo-rubicin and cisplatin) for advanced transitional cell carcinoma of the urethelium. J. Urol. (1988) **139**, 461—469.

3）Mitsuhata N, Seki M, Matsumura Y and Ohmori H：Intra-arterial infusion chemotherapy in combination with angiotensin II for advanced bladder cancer J. Urol. (1986) **136**, 580—585.

4）植田和光，駒野 徹：多剤耐性の分子機構：薬剤耐性の分子機構，鶴尾 隆編，羊土社，東京 (1994) 20—31.

5）Cole SPC, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC, Stewart AJ, Kurz EU, Duncan AMV and Deeley RG：Overexpression of a transporter gene in multidrug-resistant human lung cancer cell line. Science (1992) **258**, 1650—1654.

6）Keppler D, Leier I, Jedlitschky G and Konig J：ATP-dependent transport of glutathione-S-conjugates by the multidrug resistance protein MRP 1 and its apical isoform MRP 2. ChemicoBiological Interactions (1998) 111—112, 153—161.

7）Wiseman LR, Douglas J and Snow K：Human leukemic T cell lines, selected for their resistance to adriamycin or amasacrine have decreased topoisomerase II gene expression, protein levels and enzyme activity The International Symposium on DNA topoisomerase in Chemotherapy, **110**, 1991.

8）Kim W, Kakehi Y and Yoshida O：Multifactorial involvement of multidrug resistance protein, DNA topoisomerase II and glutathione/glutathione-S-transferase in non P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in human bladder cancer cells.

9）新津洋司郎，高橋康雄：グルタチオン系と耐性：薬剤耐性の分子機構，鶴尾 隆編，羊土社，東京 (1994) pp. 87—98.

10）Zhang K, Mack P and Wong KP：Glutathione-related mechanisms in cellular resistance to antican-

cer drugs (Review) Int. Nat. J. Oncology (1998) **12**, 871—882.

11) Scheper RJ, Broxterman HJ, Scheffer GL, Meijer CJML and Pinedo HM : Drug transporter proteins in clinical multidrug resistance. Clinica. Chimica. Acta. (1992) **206**, 25—32.

12) Scheffer GL, Wijngaard PLJ, Flens MJ, Izquierdo MA, Slovak ML, Pinedo HM, Meijer CJLM, Clevers HC and Scheper RJ : The drug resistance related protein LRP is a major vault protein. Nat. Med. (1995) **1**, 578—582.

13) Ouar Z, Lacave R, Bens M and Vandewalle A : Mechanisms of altered sequestration and efflux of chemotherapeutic drugs by multidrug-resistant cells. Cell Biology and Toxicology (1999) **15**, 91—100.

14) Hindenburg AA : Intracellular distribution and pharmacokinetics of daunorubicin in anthracycline-senstive and resistant HL-60 cells. Cancer Res. (1989) **49**, 4607—4614.

15) Willingham MC, Cornwell MM, Cardarelli CO, Gottesman MM and Pastan I : Single cell analysis of daunomycin uptake and efflux in multidrug-resistant and -sensitive KB cells : effect of verapamil and other drugs. Cancer Res. (1986) **46**, 5941—5946.

16) Marquardt D and Center MS : Drug transport mechanism in HL 60 cells isolated for resistance to adriamycin : Evidence for nuclear drug accumulation and redistribution in resistant cells, Cancer Res. (1992) **52**, 3157—3163.

17) Bubenik J, Baresova M, Viklicky V, Jakoubkova J, Sainerova H and Donner J : Established cell line of urinary bladder carcinoma (T 24) containing tumor-specific antigen. Int. J. Cancer (1973) **11**, 765—773.

18) Burchill BR, Oliver JM, Pearson CB, LeinBach ED and Berlin RD : Microtuble dynamics and glutathione metabolism in phagocytizing human polymorphonuclear leukocytes. J. cell Biol. (1978) **76**, 439—447.

19) Habig WH, Pabst MJ and Jakoby WB : Glutathione S-transferase. J. Bio. Chem. (1974) **249**, 7130—7139.

20) 清水文夫：メタロチオネインの化学修飾. 生化学 (1984) **56**, 804.

21) 池井暢浩，小平　司，清水文夫，中島克行，遠山千春，斎藤　寛，木村正巳，小滝規子：新しいメタロチオネインのラジオイムノアッセイ. 臨床検査 (1989) **33**, 215—219.

22) Kiura K, Ohnoshi T, Tabata M, Shibayama T and Kimura I : Establishment of an Adriamycin-resistant subline of human small cell lung cancer showing multifactorial mechanism of resistance. Acta. Med. Okayama (1993) **47**, 191—197.

23) Matsuo K, Kiura K, Ueoka H, Tabata M, Shibayama T, Matsumura T, Takigawa N, Hiraki S and Harada M : Growth inhibitory effects of antifolates against an adriamycin-resistant human small cell lung cancer cell line. Acta. Med. Okayama (1997) **51**(3), 121—127.

24) Herman TS, Cress AE and Gerner EW : Collateral sensitivity to methotrexate in cells resistant to adriamycin. Cancer Res. (1979) **39**, 1937—1942.

25) List AF : Non-P-glycoprotein drug export mechanisms of multidrug resistance. Seminars in Hematology (1997) Vol, **34**, No, 4, Suppl. **5**, 20—24.

26) Ramu A, Pollard HB and Rosario LM : Doxorubicin resistance in P388 ieukemia evidence for reduced drug influx. Int. J. Cancer (1989) **44**, 539—547.

27) Ramu A, Glaubiger D, Magrath IT and Joshi A : Plasma membrane lipld structural order in doxorubicin sensitive and resistant P388 cells. Cancer Res. (1983) **43**, 5533—5537.

28) Mountford CE and Wright LC : Organization of lipids in the plasma membranes of malignant and stimulated cells : a new model. Trends Biochemical Science (1988) **13**, 172—177.

29) Alexander D, Yamamoto T, Kato S and Kasai S : Histopathological assessment of multidrug resistance in gastric cancer : Expression of P-glycoprotein, multidrug resistance-associated protein and lung-resistance protein. Jpn. J. Surg. (1999) **29**, 401—406.

30) Aszalos A and Ross DD : Biochemical and clinical aspects of efflux pump related resistance to anticancer drugs. Anticancer Res. (1998) **18**, 2937—2944.

31) Grant CE, Valdimarsson G, Hipfner DR, Almquist KC, Cole SPC and Deeley RG : Overexpression of multidrug resistance-associated protein (MRP) increases resistance to natural product drugs. Cancer Res. (1994) **54**, 357—361.

32) Endresen L, Bakka A and Regstad HE : Increased

resistance to chlorambucil in cultured cells with a high concentration of cytoplasmic metallothionein. Cancer Res. (1983) **43**, 2918—2926.

33) Hiratsuka A, Kawashima K and Watabe T : Detoxication of ultimate carcinogens by rat liver zinc-metallothionein. J. Hyg. Chem. (1986) **32**, P. 10

34) Shiraishi N, Utsumi K, Morimoto S : Inhibition of nitroblue tetrazolium reduction by metallothionein. Physiol. Chem. Phys. (1982) **14**, 533—537.

35) Thornalley PJ and Vasak M : Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress. Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydrogen radicals. Biochim. Biophys. Acta. (1985) **827**, 36—44.

36) Andrews PA, Murphy MP and Howell SB : Meta llothionein-mediated cisplatin resistance in human ovarian carcinoma cells Cancer Chemother Pharmacol. (1987) **19**, 149—154.

37) Bakka A, Endresen L, Johnsen ABS, Edminson PD and Rugstad HE : Resistance against cis-Diammine dichloroplatinum in cultured cells with a high content of metallothionein. Toxicology and applied Pharmacology (1981) **61**, 215—226.

38) Endresen L, Schjerven L and Rugstad HE : Tumors from a cell strain with a high content of metallothionein show enhanced resistance against cis-diamminedichloroplatinum. Acta. Pharmacol. et Toxicol. (1984) **55**, 183—187.

39) 井村伸正, 永沼 章, 佐藤雅彦：抗癌剤耐性とメタロチオネイン. 癌と化学療法, **16**(3)PART-II (1989)599—604.

40) 越智淳三：Cis-diamminedichloroplatinum 耐性ヒト膀胱癌培養細胞株の樹立とその特性. 日泌尿会誌 (1991) **82**巻7号, 1045—1052.

41) Madelaine I, Prost S, Naudin A, Riou G, Lavelle F and Riou JF : Sequential modifications of topoisomerase I activity in a camptothecin-resistant cell line established by progressive adaptation. Biochem. Pharmacol. (1993) **45**, 339—348.

42) Ferguson PJ, Fisher MH, Stephenson J, Li D, Zhou B and Cheng Y : Combined modalities of resistance in etoposide-resistant human KB cell lines. Cancer Res. (1988) **48** : 5956—5964.

43) Andoh T, Nishizawa M, Hida T : Human small cell lung carcinoma cell resistant to VP-16 have decreased expression of topoisomerase II gene. The International Symposium on DNA topoisomerase in Chemotherapy, **106**, 1991.

44) Andoh T, Ishii K, Suzuki Y, Ikegami Y, Kusunoki Y, Takemoto Y and Okada K : Characterization of mammalian mutant with a camptothecin-resistant DNA topoisomerase I. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1987) **84**, 5565—5569.

45) Tamura H, Kohchi C, Yamada R, Ikeda T, Koiwai O, Patterson E, Keene JD, Okada K, Kjeldsen E, Nishikawa K and Andoh T : Molecular cloning of a cDNA of a camptothecin-resistant human DNA topoisomerase I and identification of mutation sites. Nucl. Acids Res. (1991) **19**, 69—75.

46) Tanizawa A, Bertrands R, Kohlhagen G, Tabuchi A, Jenkins J and Pommier Y : Cloning of chinese hamster DNA topoisomerase I cDNA and identification of a single point mutation responsible for camptothecin resistance. J. Biol. chem. (1993) **268**, 25463—25468.

47) Hinds M, Deisseroth K, Mayes J, Altschuler E, Jansen R, Ledley F and Zwelling LA : Identification of a point mutation in the topoisomerase II gene from a human leukemia cell line containing an amsacrine resistant form of topoisomerase II. Cancer Res. (1991) **51**, 4729—4731.

48) Lee M, Wang JC, Beran MMB : A point mutation in the 170 kD form of human DNA topoisomerase II confers amsacrine resistance in human acute myeloid leukkemia. The International Symposium on DNA topoisomerase in Chemotherapy. **109**, 1991.

49) Matsuo K, Kohno K, Takano H, Sato S, Kiue A and Kuwano M : Reduction of drug accumulation and DNA topoisomerase II activity in acquired teniposide-resistant human cancer KB cell lines. Cancer Res. (1990) **50**, 5819—5824.

50) Koike K, Abe T, Hisano T, Kubo T, Wada M, Kohno K and Kuwano M : Overexpression of multidrug resistance protein gene in human cancer cell lines selected for drug resistance to epipodophyllotoxins. Jpn. J. Cancer Res. (1996) **87**, 765—772.

51) Deffie AM, Batra JK and Goldenberg GJ : Direct correlation between DNA topoisomerase II activity and cytotoxicity in adriamycin-sensitive and -resistant P388 leukemia cell lines. Cancer Res.

(1989) **49**, 58—62.

52) Drake FH, Zimmerman JP, McCabe FL, Bartus HF, Per SR, Sullivan DM, Ross WE, Mattern MR, Johnson RK, Crooke ST and Mirabelli CK : Purification of topoisomerase II from amsacrine-resistant P388 leukemia cells. J. Biol. Chem. (1987) **262**, 16739—16747.

53) Hoban PR, Robson CN, Davies SM, Hall AG, Cattan AR, Hickson ID and Harris AL : Reduced topoisomerase II and elevated α class glutathione S-transferase expression in a multidrug resistant CHO cell line highly cross-resistant to Mitomycin C. Biochemical Pharmacology (1992) Vol. 43, No. 4, 685—693.

54) Cole SPC and Deeley RG : Multidrug resistance mediated by the ATP-binding cassette transporter protein MRP. BioEssays. (1998) **20**, 931—940.

Establishment of an adriamycin-resistant human bladder cancer cell line (T-24/ADM) and analysis of the mechanism of resistance

Naoki AKEBI

Department of Urology,

Okayama University Medical School

(Director: Prof. H. Kumon)

A human bladder cancer cell line resistant to adriamycin (ADM), T-24/ADM was established in vitro by exposing T-24 parent cells to a progressively higher concentration of the drug over an 18 month period. The T-24/ADM was 34.9 times more resistant to ADM than the T-24 parent. The T-24/ADM exhibited cross resistance to ADM derivatives, vinca alkaloid (vindesine, vincristine), etoposide and SN-38, but collateral sensitivity to methotrexate. The biological and biochemical characteristics of T-24/ADM were examined in terms of ADM-resistance.

Although a flow cytometric analysis showed that Pglycoprotein is not expressed on the T-24/ADM cells, lower accumalation of the drug caused by decreased uptake and increased active efflux were observed. The cellular level of glutathione-S-transferase π was 1.8-fold higher than the parent cells and the activity of nuclear extracts of DNA topoisomerase II for T-24/ADM assayed by decatenation of kinetoplast DNA was lower, about one-half that of the T-24 parent. Confocal laser microscopy revealed the difference in intracellular distribution of ADM in T-24/ADM; in particular, the accumulation of the drug in the nucleus decreased. Additionally western blot analysis showed an enhanced expression of multidrug resistance-associated protein (MRP) in the T-24/ADM cells.

This resistant cell may be used as an experimental system to elucidate the mechanism of ADM resistance and also as a model for developing new chemotherapeutic strategies against multi-drug resistant bladder cancer.