

Title	HeLa S3細胞に対する放射線とEtoposideの併用効果
Author(s)	窪田, 宣夫; 池上, 匡; 渡井, 喜一 他
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1988, 48(10), p. 1276-1282
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/18839">https://hdl.handle.net/11094/18839</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

## HeLa S3細胞に対する放射線と Etoposide の併用効果

横浜市立大学医学部放射線医学教室

窪田 宜夫 池上 匡 渡井 喜一  
箕 正兄 松井 謙吾

(昭和63年6月14日受付特別掲載)

(昭和63年8月5日最終原稿受付)

### Effect of Combined Treatment of HeLa S3 Cells with Radiation and Etoposide on Cell Survival

Nobuo Kubota, Tadashi Ikegami, Kiichi Watai,  
Masae Kakehi and Kengo Matsui

Department of Radiology, Yokohama City University School of Medicine

---

Research Code No. : 402

---

Key Words : Potentiation of radiation cytotoxicity, Etoposide,  
HeLa S3

---

Etoposide, a semisynthetic derivative of podophyllotoxin, is an active cytotoxic agent. In this paper, radiation sensitivity of HeLa S3 cells was evaluated with and without etoposide. Exponentially growing monolayer cells were incubated with etoposide at 2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  for 1 hour immediately after irradiation. The combination of radiation and etoposide showed a significant enhancement in cell killing as compared with radiation alone. The difference in surviving fraction is principally due to the decrease of the shoulder of the cell survival curve. When etoposide was combined with radiation at the different time intervals in exponentially growing cells, a significant enhancement of cell killing was found immediately before and after radiation, and at 6 hours after radiation.

When plateau phase cells were incubated with etoposide at 2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  for 1 hour immediately after radiation, no enhancement of cell killing was observed. These results are discussed in connection with the cellular repair and cell cycle kinetics.

#### I. はじめに

Etoposide は、植物 podophyllum から抽出した podophyllotoxin の半合成誘導体である<sup>1)</sup>。臨床的には小細胞肺癌に最も有効な薬剤の1つであり<sup>2)</sup>、また cisplatin との併用でよく用いられている<sup>3,4)</sup>。その他に本剤は睾丸腫瘍、悪性リンパ腫、白血病などに有効な制癌剤である<sup>5,6)</sup>。その作用機序の主体は etoposide がトポイソメラーゼ II に作用し、DNA の2本鎖切断を引き起こすことであると推測される<sup>7)</sup>。トポイソメラーゼ II は ATP 依存性に DNA 上に一過性の2本鎖切断を生じ、他

方の2本鎖DNAを通して再結合し、弛緩したDNA鎖にスーパーコイルを導入したり、DNAに結び目(knot)を形成するなど、DNAの構造変換を行う酵素である<sup>8)</sup>。DNAのこのようなトポロジーの変化は、細胞内で営まれるDNAの複製、転写、組み換え等のいわゆる遺伝子機能の発現のために重要であることが、認められるようになってきた<sup>9,10)</sup>。Etoposide はこのようなトポイソメラーゼ II に結合することにより、DNAの切断状態を保ち、結果的にDNA2本鎖切断を誘起し、殺細胞効果を発揮するものと考えられる。

これまでetoposideはcisplatin<sup>11)</sup>及びcyclophosphamide<sup>12)</sup>との併用による有効性が、それぞれマウスP388白血病とL1210白血病を用いて認められている。しかし、放射線とetoposideの併用効果を検討した基礎的な報告は現在まで、ほとんど無いのが現状である。我々は放射線治療でのetoposideの併用の有効性を検討する一連の研究の一つとして、ヒト子宮頸癌由来の培養細胞HeLa S3を用いて、放射線とetoposideの併用効果とその併用スケジュールの依存性をin vitroで調べた。さらに、plateau phaseのHeLa S3細胞を使い、放射線照射で誘発されるslow typeのPotentially lethal damageのrepair (PLDR)<sup>13)</sup>に及ぼすetoposideの影響についても検討したので報告する。

## II. 材料と方法

### 1. 細胞

本実験には我々の研究室で、週2回の継代で維持されているヒト子宮頸癌由来のHeLa S3細胞を用いた。

### 2. 培養条件

使用した培養液は、20mMのHEPES(Sigma), 8mMのNaHCO<sub>3</sub>, 10%の牛胎児血清(Flow), 及びペニシリン(50U/ml)とストレプトマイシン(50 µg/ml)を加えたαMEM (Flow)である。継代細胞及び実験細胞はともに37°C, 2%炭酸ガス, 98%空気を含むCO<sub>2</sub>インキュベーター中で培養した。対数増殖期にある細胞の実験には、T25フラスコ(Costar)当たり2×10<sup>5</sup>個の細胞を播種し、48時間後に放射線照射ないしは薬剤処理を行った。プラトー期にある細胞の実験には、T25フラスコ当たり5×10<sup>5</sup>個の細胞を播種し、3日目に培養液を新鮮な培地に変換し、さらに4日目と5日目に1%の牛胎児血清を含む新鮮培地に変換し、6日目に放射線照射ないしは薬剤処理を行った。Fig. 1はT25フラスコ当たり5×10<sup>5</sup>播種後の細胞増殖曲線を示す。細胞は3日頃から過密状態となり、5日ではほぼプラトー期に達した。

### 3. 放射線照射と薬剤処理

放射線照射は、<sup>137</sup>Cs 照射装置(ガンマーセル40, カナダ原子力公社)を使用した。細胞は照射直前までCO<sub>2</sub>インキュベーター中で37°Cに保たれ、照

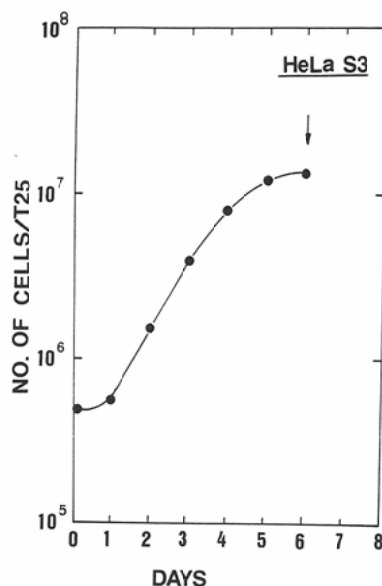


Fig. 1 Growth curve of HeLa S3 cells. Cells were refed with normal medium on day 3, and with 1% FBS medium on day 4 and day 5. The arrow indicates the time at which cells were used for irradiation studies.

射中のみ室温下におかれた。照射線量率は<sup>137</sup>Csガンマー線で約140.7cGy/minであった。

Ettoposide(日本化薬)は使用直前に培養液で所定の濃度に希釈し、実験に用いた。

### 4. 細胞生残率の測定

細胞生残率を測定する細胞は、放射線照射ないしは薬剤処理直後、0.05%トリプシンと0.02% EDTAを含むDulbecco(-)PBSで細胞分散を行い、single cell suspensionとした。ただしPotentially lethal DamageのRepair (PLDR)を調べる実験では、照射後、所定の時間インキュベーターを行い、その後トリプシン処理を行った。そして自動細胞計数装置(東亜医用電子)で細胞数をカウント後、100mmのシャーレ(Costar)に適当数を播種し、12日間CO<sub>2</sub>インキュベーターで培養した。シャーレのコロニーはホルマリンで固定し、クリスタル・ヴァイオレットで染色後、50コ以上の細胞から成るものを1コを生残細胞由来として生存率を算定した。今回の実験では未処理のコントロールは常に80%以上のコロニー形成率が得ら

れた。各実験は少なくとも2回以上繰り返し、その平均を表示した。

### 5. Flow cytometry

放射線照射又は薬剤処理後の細胞周期の進行の変化は以前に報告した方法<sup>14)</sup>で細胞を固定、染色し、Flow cytometry でDNA量を測定することにより求めた。

## III. 結 果

### 1. Etoposide の殺細胞効果

Activeに増殖している対数増殖期の細胞で、etoposideの単独の投与量と細胞生存率の関係をFig. 2に示す。投与時間は37°C、1時間及び2時間である。1時間処理の場合はetoposideの濃度の高いところで、効果はやや弱まり、生残率曲線は2相性の傾向を示した。2時間処理の場合は1時間処理に比べ、殺細胞効果はより大きく、この薬が濃度及び処理時間に依存して効果の発現するtypeであると考えられる。Fig. 3は1時間処理のetoposideの単独の効果を対数増殖期とプラトー期で比較したものである。プラトー期の細胞に対するetoposideの効果は、対数増殖期の細胞に比べて、はるかに小さく、この薬の効果は細胞の増殖状態により、大きく左右される。

### 2. 放射線と Etoposide の併用効果

対数増殖期にある細胞を用いて、放射線とetoposideの殺細胞効果に対する併用効果を調べた(Fig. 4)。Etoposideは放射線照射直後に2.5 $\mu$ g/mlの1時間処理を行った。放射線照射とetoposideの併用の生残率曲線を放射線単独のそれと比較を容易にするために、etoposide単独の細胞生残率の0.13を1.0に補正したのがFig. 4のシンボル無しの実線である。両者の比較から、etoposideの併用により、細胞生存率曲線上、放射線による細胞致死の増強効果が認められた。放射線単独と放射線etoposide併用のD<sub>0</sub>はそれぞれ186.2cGyと168.6cGy、D<sub>q</sub>は208.9cGyと32.1cGyであった。Etoposideの併用による致死増強効果は、主としてD<sub>q</sub>の減少による肩の消失によっていた。

次に放射線とetoposideの併用の順序、及び両者のインターバルの殺細胞効果に対する影響を調べた(Fig. 5)。放射線は5Gy、etoposideは2.5 $\mu$ g/

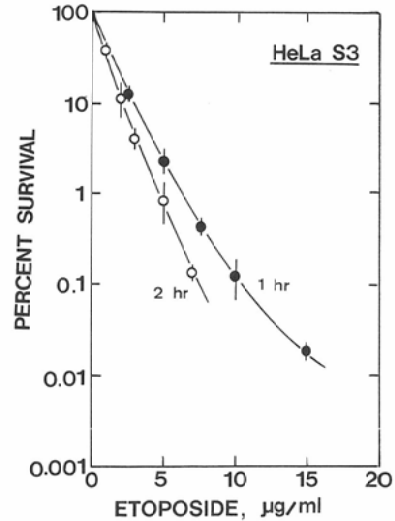


Fig. 2 Cell survival of log phase HeLa S3 cells after 1 hour and 2 hours exposure to etoposide at 37°C. Each point represents the mean and SE of two or three separate experiments.

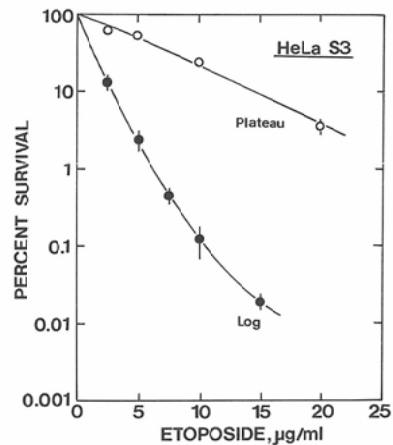


Fig. 3 Cell survival of actively growing and plateau phase cells after 1 hour exposure to etoposide. Each point represents the mean and SE of two or three separate experiments.

mlの1時間処理とした。Fig. 5の横軸の0点は、放射線照射直後にetoposide処理、0点より左は最初にetoposide処理し、インターバルにおいて放射線照射、0点より右側は放射線照射後にインターバルにおいてetoposide処理の場合の生残率を示す。点線は放射線とetoposideが相加的に働いた場合の生残率を示す。Fig. 5より両者の有効

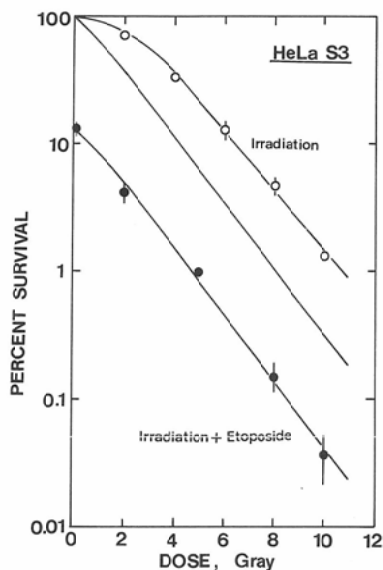


Fig. 4 Radiosensitization of log phase cells by etoposide. Cells were irradiated immediately before 1 hour exposure to etoposide at  $2.5\mu\text{g/ml}$ . Survival curve of radiation plus etoposide is corrected for cell killing by drug alone (solid line without symbols). Terminal exponential portions of the curves were fitted by linear regression analysis to obtain the values of  $D_0$  and  $D_q$ . Each point represents the mean and SE of three separate experiments.

な併用スケジュールは、放射線照射前後、及び照射後 6 時間目の etoposide 投与である。放射線と etoposide の併用スケジュールの違いによる併用効果の差異を細胞周期の進行に対する影響から検討するために、5Gy 照射と etoposide 処理後 3 時間と 6 時間の DNA 量のヒストグラムを flow cyto-

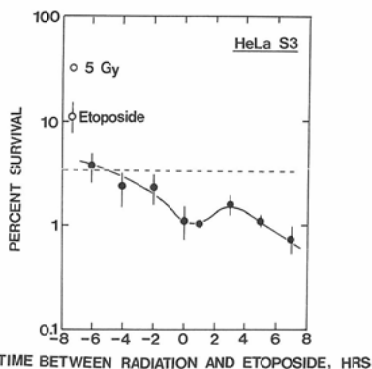
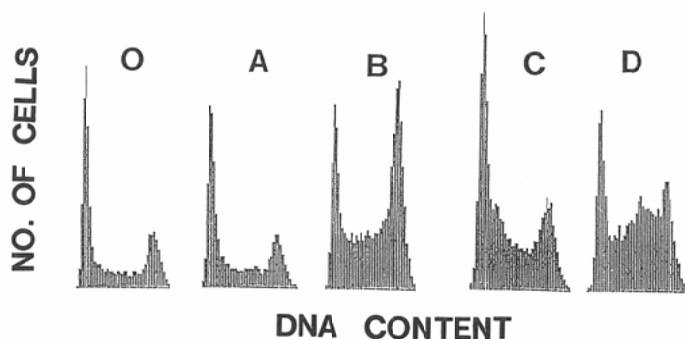


Fig. 5 Cell survival of log phase cells as a function of interval time between etoposide and radiation. Cells were treated with etoposide at  $2.5\mu\text{g/ml}$  for 1 hour and irradiated with  $^{137}\text{Cs}$  gamma rays of 5Gy. Dotted line shows the additive level of cell killing by etoposide and irradiation. Each point represents the mean and SE of two or three separate experiments.



	Go/G1	S	G2/M
O Control	46.9	27.6	25.5
A 5 Gy → 3 hrs	39.9	33.9	26.1
B 5 Gy → 6 hrs	28.8	30.9	40.3
C Etoposide → 3 hrs	32.2	40.9	26.9
D Etoposide → 6 hrs	20.4	43.4	36.2

Fig. 6 DNA histograms of cells at 3 and 6 hours after exposure to 5Gy irradiation or etoposide at  $2.5\mu\text{g/ml}$  for 1 hour.

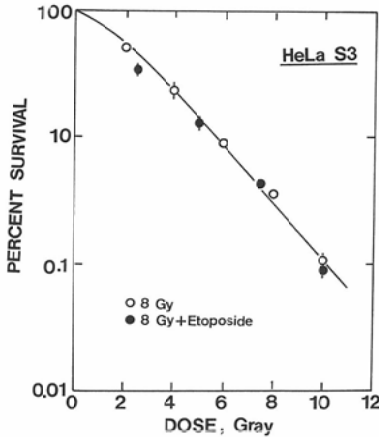


Fig. 7 Cell survival of plateau phase cells after irradiation alone and irradiation immediately before etoposide at  $2.5\mu\text{g}/\text{ml}$  for 1 hour. Cells were trypsinized 8 hours after irradiation in both treatments. Survival curve of radiation plus etoposide is corrected for cell killing by drug. Each point represents the mean and SE of two or three separate experiments.

metry で得た (Fig. 6). 5Gy 照射後 6 時間では, S期細胞が30.9%,  $G_2M$  期細胞が40.3%となり, DNA 合成の遅延及び  $G_2$  block が観察された. Etoposide 処理後 6 時間では, S期細胞が43.4%,  $G_2M$  期細胞が36.2%となり, 放射線と類似した細胞周期の進行の阻害がみられた.

### 3. プラト一期の細胞における放射線と etoposide の併用

プラト一期細胞でも放射線と etoposide の併用効果を調べた (Fig. 7). Etoposide は対数増殖期の細胞の場合と同じく, 放射線照射直後に  $2.5\mu\text{g}/\text{ml}$ , 1 時間処理とした. プラト一期の細胞では放射線照射後に PLDR が起こることが知られている. そこで放射線照射単独と放射線照射直後 etoposide 処理のそれぞれの細胞生存率曲線を, 照射後 8 時間目にトリプシン処理をする delayed plating により求めた. プラト一期の細胞では対数増殖期の細胞の場合とは異なり, 放射線直後の etoposide 処理は生存率曲線に何らの変化ももたらさなかった.

Fig. 7 より, etoposide は PLDR に影響していないと推測されるが, それを確かめるために 8Gy

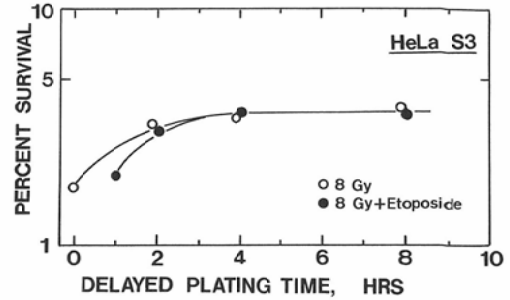


Fig. 8 Effect of etoposide on the repair of potentially lethal damage after 8Gy irradiation in plateau phase cells. Cells were treated with etoposide at  $2.5\mu\text{g}/\text{ml}$  for 1 hour immediately after irradiation. Cell survival in the repair kinetics curve of irradiation plus etoposide is corrected for cell killing by drug. Each point represents the average of two experiments.

照射後の PLDR の回復動態を, 8Gy 照射直後 etoposide 処理の場合と比較した (Fig. 8). 両者は照射後 8 時間目では生存率は同一となり, この条件では etoposide は PLDR には影響を与えていないことが観察された.

## IV. 考 察

Etoposide の対数増殖期にある細胞の殺細胞効果は濃度の増加に従って効果が弱まる 2 相性の傾向を示したが (Fig. 2), この 2 相性の殺細胞効果は P388 などの白血病細胞でも観察されており<sup>15)</sup>, また我々は HeLa S3 細胞以外にもラットのヘパトーマ, ヒトの結腸癌由来の培養細胞でも認めている.

放射線と etoposide の併用に関する今回の検討では, 対数増殖期細胞においては, 放射線と etoposide の  $2.5\mu\text{g}/\text{ml}$ , 1 時間処理の併用は, 放射線の生存率曲線上, 明らかに致死増強効果が観察された (Fig. 4). そして, それは主として Dq の減少による肩の消失に帰因していた. 2Gy 照射での細胞生存率は放射線照射単独で 73%, 放射線照射直後の etoposide 処理で 38% と有意に減少した. このことは臨床で通常 1 回の治療線量  $1.8\sim 2.0\text{Gy}$  に etoposide を併用することにより, 優れた併用効果が期待できることを示している. 佐々木<sup>16)</sup>は一般に悪性腫瘍細胞の 2Gy での生存率は  $0.4\sim 0.8$

の範囲に入るが、この差は治療コースの約30回の照射の後の最終的な生残率が $10^{-12}$ ~ $10^{-3}$ となるために、約9桁の差に増幅されると述べている。そのため、etoposideは細胞生残率曲線で肩が大きく表われると考えられる腫瘍に対しては放射線との併用は有益であろうと考えられる。

今回の我々の観察した対数増殖期細胞での低線量域での放射線と etoposide の併用での有効性の原因としては次の2つの事が考えられる。即ち1つは放射線で誘発されるSublethal damage(SLD)<sup>17)</sup>の repair を etoposide が阻害するという可能性と、2つ目は放射線に抵抗性が高い細胞周期の late S期の細胞を etoposide が殺しているという可能性である<sup>18)19)</sup>。まず、etoposideがSLDの repair を阻害しているがどうかを正確に知るには、同調細胞で調べることが必要であろう。今回は我々は同調細胞を使っての実験は行っていないが、プラト一期の細胞では放射線と etoposide の併用の生残率曲線は放射線単独とほぼ同一であったことから、etoposide が放射線の SLD の repair を阻害している可能性は少ないと考えられる。一方、小幡ら<sup>20)</sup>は HeLa S3細胞を用いて、etoposide の殺細胞効果の細胞周期依存性を調べ、late S期、G<sub>2</sub>M 期細胞は etoposide に対する感受性が高く、G<sub>1</sub>期、early S 期細胞は抵抗性であると報告している。対数増殖期の細胞での放射線照射直後の etoposide 処理により、細胞生残率曲線上、細胞致死増強効果の得られた理由としては、放射線抵抗性の late S期の細胞が etoposide により不活化されたためと考えられる。また Fig. 5 にみられるように、放射線照射後6時間目での etoposide 処理の併用効果の高い理由としては、5Gy 照射で生き残った放射線抵抗性の G<sub>1</sub>期、late S 期の細胞がそれぞれ etoposide に感受性の高い late S 期、G<sub>2</sub>期へ移行したためと考えられる (Fig. 6)。

プラト一期にある細胞では、放射線照射後の delayed plating により、PLD の repair が起こることが知られており、一般にこのような repair は slow type の PLDR と呼ばれている。そこで我々はプラト一期の HeLa S3細胞に放射線で誘発される slow type の PLDR を etoposide が阻害す

るかどうかを調べた。Fig. 8 は8Gy 照射単独と8Gy 照射直後に etoposide 2.5 $\mu$ g/ml, 1時間処理をした場合の PLD の修復の動態を調べたものである。Etoposide 処理中の1時間は PLDR がおさえられているようであるが、8時間後の両群の生残率は等しく、etoposide は今回の条件では、PLD を不可逆的に lethal damage に固定することはなさそうである。このことは、放射線照射により誘発される PLD の DNA レベルの損傷の修復に対しては、etoposide によるトポイソメラーゼ II の阻害は最終的に PLD を lethal damage に固定するようには働いていないと考えられる。

## V. 結 語

HeLa S3細胞を使って、放射線と etoposide の併用効果を調べ、次の結果を得た。

1) 対数増殖期にある細胞では、放射線照射直後に etoposide 2.5 $\mu$ g/ml, 1時間処理を併用すると、主として生残率曲線の肩の減少による増強致死効果が観察された。

2) 放射線と etoposide の投与スケジュールの検討では、放射線照射前後、および照射後6時間目の etoposide 投与で優れた殺細胞効果がみられた。

3) プラト一期の細胞では、8Gy 照射直後の etoposide 2.5 $\mu$ g/ml, 1時間処理では、slow type の potentially lethal damage の repair を阻害することはできなかった。

本実験に御協力をいただいた池上クリスチーナ氏、及び Etoposide を提供いただいた日本化薬(株)に感謝いたします。本論文の要旨は日本医学放射線学会第27回生物部会で発表した。

## 文 献

- 1) Keller-Juslén C, Kuhn M, Von Wartburg A, et al: Synthesis and antimetabolic activity of glycosidic lignan derivatives related to podophyllotoxin. *J Med Chem* 14: 936-940, 1971
- 2) Tucker RD, Ferguson A, Van Wye C, et al: Chemotherapy of small cell carcinoma of lung with VP16-213. *Cancer* 41: 1710-1714, 1978
- 3) Dhingra HM, Valdivieso M, Booser DJ, et al: Chemotherapy for advanced adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung with etoposide and cisplatin. *Cancer Treat Rep* 68: 671-673, 1984

- 4) Longeval E, Klastersky J: Combination chemotherapy with cisplatin and etoposide in bronchogenic squamous carcinoma. *Cancer* 50: 2751—2756, 1982
- 5) Issel BF: The podophyllotoxin derivatives VP16-213 and VM26. *Cancer Chemother Pharmacol* 7: 73—80, 1982
- 6) Cavalli F: VP-16-213 (etoposide) A critical review of its activity. *Cancer Chemother Pharmacol* 7: 81—85, 1982
- 7) Long BH, Musial ST, Brattain MG: Single and double-strand DNA breakage and repair in human lung adenocarcinoma cells exposed to etoposide and teniposide. *Cancer Res* 45: 3106—3112, 1985
- 8) 酒井一夫: DNA Topoisomerases. *放射線生物研究* 17: 13—26, 1982
- 9) 藤田 浩: 抗癌剤の薬理動態—ポドフィロトキシン誘導体, *Pharma Medica*, 4: 136—148, 1986
- 10) 柳沼克幸, 小池克郎: トポイソメラーゼ, 蛋白質核酸酵素, 28: 298—305
- 11) Schabel FM, Trader MW, Laster WR, et al: Cis-Dichlorodiammine platinum (II): Combination chemotherapy and cross-resistance studies with tumors of mice. *Cancer Treat Rep* 63: 1459—1473, 1979
- 12) Dombrowsky P, Nissen NI: Combination chemotherapy with 4-demethyletoposide and 9-(4,6-O-ethylphenyl)podophyllotoxin-B-D-glucopyranoside, VP16-213 (NSC141540) in L1210 leukemia. *Eur J Cancer* 12: 181—188, 1976
- 13) Hahn GM, Little JB: Plateau-phase cultures of mammalian cells: An in vitro model for human cancer. *Radiat Res Quar* 8: 39—83, 1972
- 14) 窪田宜夫: HeLa 細胞の cell cycle progression に対する hyperthermia と放射線の影響, *日本医放会誌*, 42: 188—199, 1982
- 15) 高橋克俊, 岩渕 実: Etoposide のマウス白血病 P388 細胞に対する殺細胞作用様式, *癌と化学療法*, 12: 2190—2195, 1985
- 16) 佐々木武仁: 腫瘍進展及び幹細胞不均一性の腫瘍放射線抵抗性への関与, *癌の臨床*, 33: 1560—1569, 1987
- 17) Elkind MM, Sutton H: Radiation response of mammalian cells grown in culture. I. Repair of X-ray damage in surviving chinese hamster cells. *Radiat Res* 13: 556—593, 1960
- 18) Terashima T, Tolmach LJ: Changes in X-ray sensitivity of HeLa cells during the division cycle. *Nature* 190: 1210—1211, 1961
- 19) Sinclair WK: Cell cycle dependence of the lethal radiation response in mammalian cells. *Current Topics Radiat Res Q* 7: 264—285, 1972
- 20) 小幡貞男, 宮本忠昭, 榎木 茂, 山口 豊: VP16 (Etoposide) の HeLaS3 細胞に対する効果, *日本癌学会総会記事 (第45回)*, 355, 1986