

1106 抗癌剤効果予測の精度向上を目指した^{99m}Tc 製剤の癌細胞排泄機序の解明

大西 一幸

(指導教員：川井 恵一教授，小林 正和助教)

要旨：P 糖タンパクと呼ばれている Multiple drug resistance 1(MDR1)や Multidrug resistance-associated protein 1(MRP1)などの排泄型薬物トランスポーターが過剰発現している癌細胞では，これらのトランスポーターにより抗癌剤が癌細胞外に排泄され，その効果が低下する．これまでに^{99m}Tc 標識 2-methoxyisobutylisonitrile (^{99m}Tc-MIBI)や^{99m}Tc 標識 tetrofosmin (^{99m}Tc-TF)の細胞外排泄にはMDR1 と MRP1 が関与していると報告されており，臨床核医学検査では，これら両^{99m}Tc 製剤の癌細胞集積性から，抗癌剤の投与前にその効果予測が行われている．しかし，癌細胞にはMDR1 と MRP1 以外にも様々な種類の排泄型薬物トランスポーターが発現していることから，これらのトランスポーターの関与も明らかにする必要がある．本研究では，単一の排泄型薬物トランスポーターを個々に発現させた6種類のベシクルを用いて^{99m}Tc-MIBI, ^{99m}Tc-TFの排泄機序を検討した．その結果，両^{99m}Tc 製剤とも，報告通りMDR1 と MRP1 による輸送を確認したが，^{99m}Tc-TF ではこれらに加え，MRP2 および Bile salt export pump (BSEP)が関与していることを初めて明らかにした．また，これらの排泄型薬物トランスポーターの発現が確認されているヒト由来癌細胞 H441 と DU145 においても，BSEP は^{99m}Tc-TF の排泄にのみ関与しており，両^{99m}Tc 製剤の排泄機序が異なることが確認できた．したがって，抗癌剤の排泄機序を踏まえ，^{99m}Tc 製剤を使い分けることにより，抗癌剤効果予測の精度が向上すると考えられた．

I. はじめに

癌の治療法の1つとして抗癌剤を用いた化学療法があるが，癌細胞が抗癌剤に対して抵抗性を示すといった薬物耐性は，現代の医療現場で深刻な問題となっている^{1), 2)}．その原因は，抗癌剤を癌細胞外へ排泄する薬物トランスポーターが癌細胞膜上に過剰発現し，細胞内に取り込まれた抗癌剤がこの排泄型薬物トランスポーターにより細胞外へ排泄され，抗癌剤の癌治療効果が低くなるからである．この薬物耐性に関わる主な排泄型薬物トランスポーターはP 糖タンパクと呼ばれる Multiple drug resistance 1 (MDR1)と Multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1)であり，現在，臨床核医学検査では，^{99m}Tc 標識 2-methoxyisobutylisonitrile (^{99m}Tc-MIBI)や^{99m}Tc 標識 tetrofosmin (^{99m}Tc-TF) の癌細胞からの排泄にはこれまでMDR1 と MRP1 が関与していると報告されており^{3), 4)}，これら両^{99m}Tc 製剤を利用して抗癌剤投与前に，その効果予測を行うことが可能である．しかし，癌細胞にはMDR1 と MRP1 以外にも様々な種類の薬物トランスポーターが存在していることから，これらの排泄型トランスポーターの関与も明らかにする必要がある．本研究では両^{99m}Tc 製剤と主な6種類の単一の薬物トランスポーター(MDR1, MRP1, MRP2, MRP4, Bile salt export pump (BSEP), Breast cancer resistance protein (BCRP))を個々に発現させたベシクルを用いて排泄型薬物トランスポーターについて検討した．

II. 排泄型薬物トランスポーター発現ベシクルを用いた検討

A) 実験材料と方法

^{99m}Tc -MIBI は富士フィルム RI ファーマ, ^{99m}Tc -TF は日本メジフィジックスから購入し, ABC トランスポーターベシクルおよびベシクル専用試薬キットは GenoMembrane 社から購入して使用した. 実験前夜に, 膜フィルタを Mops-Tris 緩衝液(400mM)に浸しておくとともに, 1.5ml チューブに, 6 種類の薬物トランスポーター発現ベシクル(MDR1, MRP1, MRP2, MRP4, BSEP, BCRP)が 0.05 mg/10 μl となるように分注した. 実験当日には, 薬液を 1.5ml チューブ内に以下のように調整した. Adenosine triphosphate (ATP)または adenosine monophosphate (AMP)溶液をそれぞれ 20.0 μl とし, ^{99m}Tc -MIBI または ^{99m}Tc -TF を 10.0 μl ずつ加えた(約 3.7kBq/ μl). これらに Mops-Tris 緩衝液(50 mM)を 0.5 μl 加えた後, MRP 系のベシクルに投与する薬液には glutathione 溶液, MRP 系以外の薬液には Mops-Tris 緩衝液(50 mM)を 0.5 μl 加えた. したがって, 分注したベシクルあたり 31.0 μl の薬液を準備した. 分注したベシクルに Mops-Tris 緩衝液(50 mM)を 9.0 μl 加え, 37 度で 5 分間プレインキュベーションを行った. 次に, ATP あるいは AMP 溶液を加えた ^{99m}Tc 製剤を含む薬液を 31 μl 加え, タッピングした後, 37 度でインキュベーションさせた. 3 分後に, Mops-Tris 緩衝液(400mM)を 1 ml 加えて反応を停止した. その後, あらかじめ用意していた膜フィルタに濾過し, Mops-Tris 緩衝液(400mM)で 2 回洗浄した. その膜フィルタを試験管に入れ, ガンマカウンタで測定した. また, 解析結果は, タンパク 1 mg あたりに含まれた薬液量として算出した.

B) 結果と考察

ベシクルに対する ^{99m}Tc -MIBI および ^{99m}Tc -TF の集積をそれぞれ Figure.1, 2 に示す. この実験系において, ATP 存在下における ^{99m}Tc 製剤のベシクル内への集積が, AMP 存在下での集積と比べて, 有意に増加した場合に, そのベシクルに発現させた薬物トランスポーターが ^{99m}Tc 製剤の排泄機序に関与していることを示す. ^{99m}Tc -MIBI では, MDR1 および MRP1 発現ベシクルにおいて, ATP 存在下の集積が AMP 存在下の集積と比べて有意に増加した. 一方, ^{99m}Tc -TF では, MDR1, MRP1, MRP2 および BSEP において有意に増加した. これらの結果より, ^{99m}Tc -MIBI の排泄機序には MDR1 と MRP1, ^{99m}Tc -TF の排泄機序には MDR1, MRP1, MRP2 および BSEP の関与が確認された. 特に, ^{99m}Tc -TF の排泄に MRP2 と BSEP が関与していることが今回初めて明らかとなった.

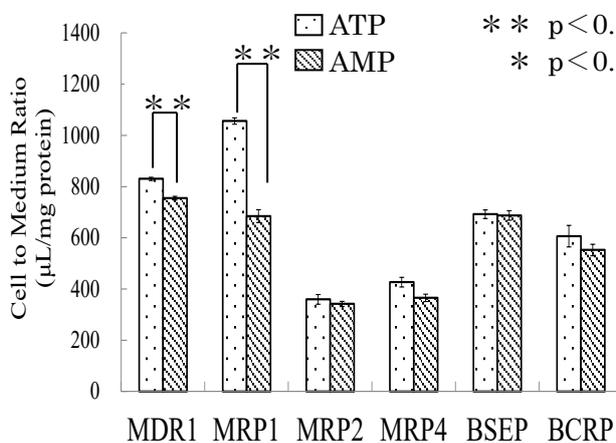


Figure.1 ^{99m}Tc -MIBI の集積率

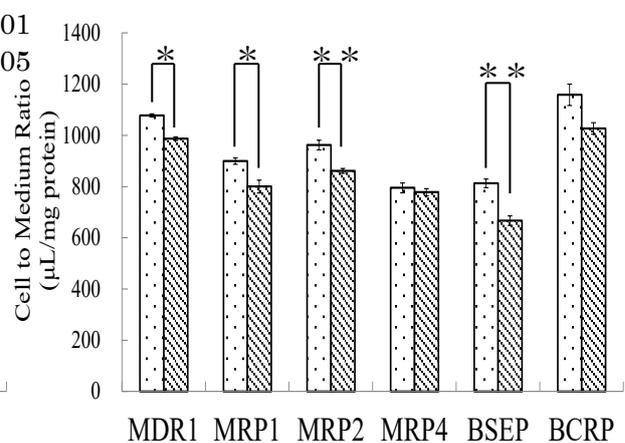


Figure.2 ^{99m}Tc -TF の集積率

III. ヒト由来癌細胞における排泄機序の確認

A) 実験材料と方法

2種類のヒト由来癌細胞(肺腺癌:H441, 前立腺癌:DU145)を37度, 5%CO₂で培養した. またマイクロアレイを用いて, universal human reference RNA に対するそれぞれの細胞における排泄型薬物トランスポーターの発現量を調べた. さらに阻害実験には, MDR1 阻害剤である verapamil hydrate (Sigma)と BSEP 阻害剤である troglitazone (LKT Laboratories)を用いた. 24 ウェル細胞培養用マルチウェルプレート(Falcon)に1ウェル辺り 1×10⁴ cells/ml 播き, 約24時間後に実験を行った. 培養用培地を除去し, 測定用培地(Modified Hanks' balanced salt solution)を加えて約10分プレインキュベーションした. その後, 阻害剤無負荷の場合として, 約3.7 kBq の ^{99m}Tc-MIBI または ^{99m}Tc-TF を投与して30分間インキュベーションするとともに, 輸送阻害効果を確認するため, 各 ^{99m}Tc 製剤と阻害剤を同時投与して30分間インキュベーションした. ^{99m}Tc 製剤を含んだ測定用培地を取り除き, 測定用培地で細胞を2回洗浄した. 500 μl の0.1N NaOH で細胞を溶解し, そのうちの400 μl をガンマカウンタで測定した.

B) 結果と考察

Table.1 に各癌細胞のマイクロアレイによる発現解析結果を示す. マイクロアレイの結果は universal human reference RNA に対する各癌細胞の薬物トランスポーターの発現量の割合を示している. 今回の検討では, 2.0倍以上のものを高発現とした. H441 はMDR1, MRP1 および BSEP が高発現しており, 一方, DU145 はBSEP が高発現していることが確認された.

Table.1 マイクロアレイの結果

	MDR1	MRP1	MRP2	MRP4	BSEP	BCRP
H441	2.65	2.14	0.01	0.26	4.20	0.29
DU145	1.76	0.97	0.06	0.35	2.66	0.32

H441 と DU145 における阻害実験の結果を Figure.3 と 4 に示す. 阻害剤を用いて, 特定の排泄型薬物トランスポーターを阻害することで, 癌細胞内の集積が増加した場合には, そのトランスポーターが ^{99m}Tc 製剤の癌細胞における排泄機序に関わっていることが確認できる.

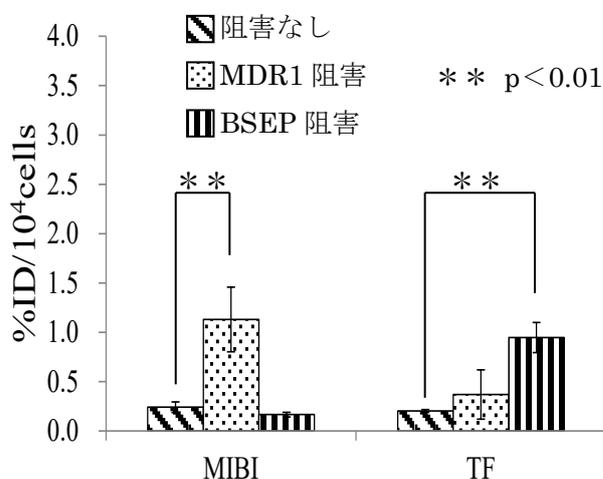


Figure.3 H441 における阻害効果

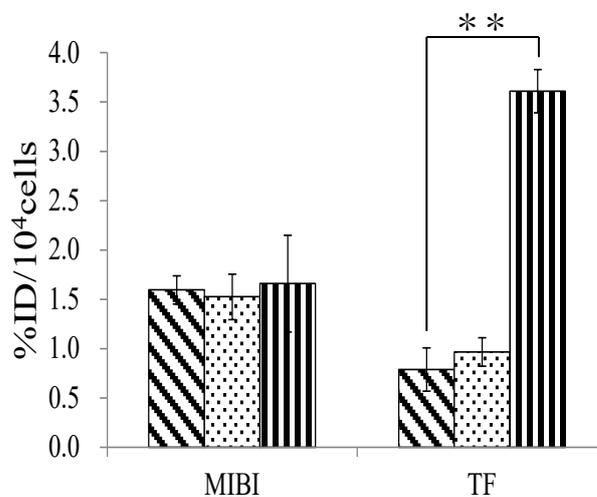


Figure.4 DU145 における阻害効果

H441 において、 ^{99m}Tc -MIBI は MDR1 阻害時に、癌細胞への集積が阻害無負荷の場合と比べて有意に増加した。一方、 ^{99m}Tc -TF では MDR1 阻害時に有意差は無かったものの、阻害無負荷と比べて ^{99m}Tc -TF の集積が増加し、BSEP 阻害時にはその集積が有意に増加した。DU145 に関しては、 ^{99m}Tc -MIBI は MDR1 阻害と BSEP 阻害のいずれも癌細胞への集積に変化が認められなかった。それに対し、 ^{99m}Tc -TF では BSEP 阻害時に、阻害無負荷に比べて癌細胞集積が有意に増加した。

前述のように、ベシクルを用いた薬物トランスポーターの検討において、 ^{99m}Tc -MIBI の排泄機序には MDR1 と MRP1 が関与しており、 ^{99m}Tc -TF の排泄機序には MDR1 と MRP1 以外に MRP2 と BSEP が関係していることが明らかになった。この結果を癌細胞において両 ^{99m}Tc 製剤の排泄機序を確認できるか試みた。マイクロアレイの結果から、H441 において MDR1 が高発現しており、癌細胞における阻害実験からも両 ^{99m}Tc 製剤の排泄に大小はあるものの MDR1 が関与していることが確認できたが、 ^{99m}Tc -MIBI の場合は有意な集積増加を認めなかった。この理由として、ベシクルは薬物トランスポーターを単一発現させてあり、両 ^{99m}Tc 製剤の排泄に関与する薬物トランスポーターの種類を確認できるが、癌細胞においては、数多くのトランスポーターが存在し、その発現量も異なることから、 ^{99m}Tc -MIBI の各薬物トランスポーターへの親和性の違いが影響したためと思われる。また、BSEP は両細胞において高発現していることがマイクロアレイの結果から判明しており、 ^{99m}Tc -MIBI では癌細胞への集積増加が見られなかったが、 ^{99m}Tc -TF では集積増加が認められたため、 ^{99m}Tc -TF の排泄機序に BSEP が関与していることが癌細胞においても確認された。したがって、本研究の結果から、 ^{99m}Tc -MIBI と ^{99m}Tc -TF の排泄機序が異なることが薬物トランスポーター発現ベシクルとヒト由来癌細胞を用いた検討より確認できた。

IV. 結語

^{99m}Tc -MIBI と ^{99m}Tc -TF の排泄機序はこれまでの知見通り、MDR1 と MRP1 が関与していることが本研究でも確認できた。さらに、 ^{99m}Tc -TF は MRP2 と BSEP も関与していることが初めて明らかになった。特に BSEP に関しては、癌細胞においてもその関与を確認できた。したがって、両 ^{99m}Tc 製剤の排泄機序は異なり、これらの ^{99m}Tc 製剤を使い分けることにより、抗癌剤効果予測の精度が向上すると考えられた。

V. 謝辞

本稿を終えるにあたり、ご指導くださいました川井恵一教授、小林正和助教、大江和代博士およびご協力いただいた本研究室の方々に心より感謝申し上げます。

VI. 参考文献

- 1) 大塚弘毅, 大西弘明, 呉屋朝幸, 渡邊卓. P-447 Side population(SP)法による肺癌幹細胞研究: 抗癌剤耐性克服をめざして. 肺癌 2008;48(5), 601,
- 2) Fojo A, Hamilton TC, Young RC, Ozols RF. Multidrug resistance in ovarian cancer. Cancer. 1987; 60(8 Suppl): 2075-2080.
- 3) Ballinger JR. Imaging multidrug resistance with radiolabeled substrates for P-glycoprotein and multidrug resistance protein. Cancer Biother Radiopharm. 2001; 16(1): 1-7.
- 4) Kinuya S, Li XF, Yokoyama K, Mori H, Shiba K, Watanabe N, Shuke N, Bunko H, Michigishi T, Tonami N. Reduction of ^{99m}Tc -sestamibi and ^{99m}Tc -tetrofosmin uptake in MRP-expressing breast cancer cells under hypoxic conditions is independent of MRP function. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2003; 30(11): 1529-1531.