

1208 内用治療製剤 ^{131}I -MIBG の腫瘍細胞外排泄機序の評価

建石 あかり

(指導教員：川井 恵一教授，小林 正和助教)

要旨：3-[^{131}I]Iodobenzylguanidine (^{131}I -MIBG) は神経芽細胞腫に対する内用療法の治療製剤として臨床利用されており，腫瘍細胞内へ集積して殺細胞効果を発揮する。しかし，一般に腫瘍細胞には排泄型薬物トランスポーターが発現しており，投与された薬剤の腫瘍細胞内濃度が低下することがある。その結果として， ^{131}I -MIBG を用いた内用療法の治療効果が低下する可能性が考えられることから， ^{131}I -MIBG の細胞外排泄機序として ^{131}I -MIBG を輸送する排泄型薬物トランスポーターを明らかにすることは重要である。そこで本研究では，内用療法における治療効果の向上を目指し， ^{131}I -MIBG の細胞外排泄機序を検討した。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ベシクルに ^{131}I -MIBG を投与し，集積した放射能を測定した。その結果，multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1) と multidrug resistance-associated protein 4 (MRP4) 発現ベシクルにおいて顕著な ATP 依存性が確認され， ^{131}I -MIBG の細胞外排泄への関与が考えられた。また， ^{131}I -MIBG 内用療法の適用となっているヒト由来神経芽細胞腫 SK-N-SH 及び MRP1, MRP4 が高発現しているヒト由来前立腺癌細胞 MDA-PCa-2b において，MRP 特異的阻害剤の負荷により， ^{131}I -MIBG 投与後早期において細胞外排泄の低下による集積の増加が確認できた。従って，MRP を介した排泄を阻害することで ^{131}I -MIBG を腫瘍細胞内に貯留させ，内用療法の治療効果を向上させる可能性が示された。

I. はじめに

神経芽細胞腫は小児悪性腫瘍の中でも白血病，脳腫瘍に次いで多く，本邦では年間約 180 から 200 人の罹患者数に及ぶと言われている¹⁾。特に初期治療抵抗性・再発症例においては，十分に有効な治療法が確立されておらず，生命予後は極めて不良である。そこで手術が不能である症例，転移病巣・再発病巣がある症例を対象に， ^{131}I -MIBG を用いた内用療法の臨床応用が始められた²⁾。この内用療法とは， ^{131}I -MIBG が神経芽細胞腫に取り込まれ， β 線により殺細胞効果を発揮することを利用した手法である³⁾。

一般に，腫瘍細胞には multiple drug resistance 1 (MDR1), multidrug resistance-associated protein 1, 2, 3, 4 (MRP1, 2, 3, 4) および breast cancer resistance protein (BCRP) などの排泄型薬物トランスポーターが発現しており，投与された薬剤の腫瘍細胞内濃度が低下することがある⁴⁾。したがって ^{131}I -MIBG も腫瘍細胞内に移行した後に排泄型薬物トランスポーターにより腫瘍細胞外へ排泄され， ^{131}I -MIBG の腫瘍細胞内集積量が減少することにより，内用療法の治療効果が低下する可能性が考えられた。これまでの報告から ^{131}I -MIBG の排泄には P 糖タンパクと呼ばれる MDR1 が関与していないことがわかっている⁵⁾が，前述の通り，MDR1 以外にも発現が推測される MRP1, 2, 3, 4 や BCRP などの排泄型薬物トランスポーターが ^{131}I -MIBG の神経芽細胞腫からの排泄に関与している可能性が考えられた。よって本研究では，6 種類の排泄型薬物トランスポーター (MDR1, MRP1, 2, 3, 4 および BCRP) を個々に単一発現させたベシクルおよび腫瘍細胞を用いて， ^{131}I -MIBG の細胞外排泄に関与する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) 実験方法と材料

^{131}I -MIBG は富士フィルム RI ファーマ株式会社, levo-[ring-2,5,6- ^3H]-norepinephrine, (^3H -NE) は PerkinElmer Life & Analytical Sciences 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 400mM Mops-Tris 緩衝液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, 2, 3, 4, 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 1.5 ml 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, 約 3.7 kBq/ μl の ^{131}I -MIBG または ^3H -NE を 10.0 μl ずつ加えた. これらに 50 mM Mops-Tris 緩衝液を 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 50 mM Mops-Tris 緩衝液を 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 50 mM Mops-Tris 緩衝液を 9.0 μl 加え, 37°C 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 ^{131}I -MIBG または ^3H -NE を含む薬液を 31.0 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, 400mM Mops-Tris 緩衝液を 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, 400mM Mops-Tris 緩衝液で 2 回洗浄した. その膜フィルタを試験管に入れ, オートウェルガンマカウンタ (AccuFLEX γ 7000, Aloka) で測定した. また, 解析結果はタンパク 1 mg あたりに換算した集積薬剤のモル数で表した.

B) 結果と考察

ベシクルに対する ^{131}I -MIBG または ^3H -NE の集積をそれぞれ Figure.1 と 2 に示す. この実験系において, ATP 存在下における ^{131}I -MIBG または ^3H -NE 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 ^{131}I -MIBG または ^3H -NE の排泄機序に関与していることを示す.

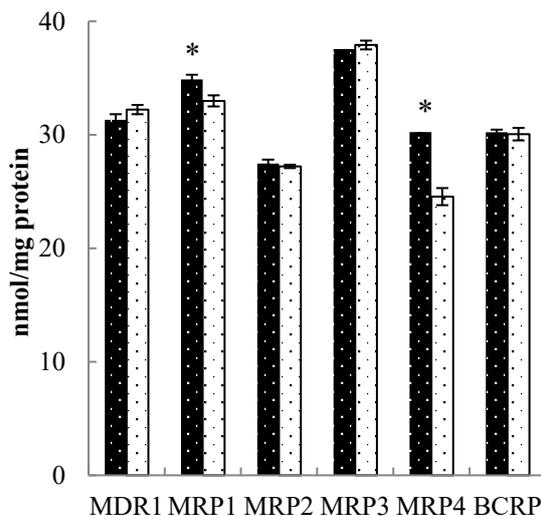


Figure.1 ^{131}I -MIBG の集積率

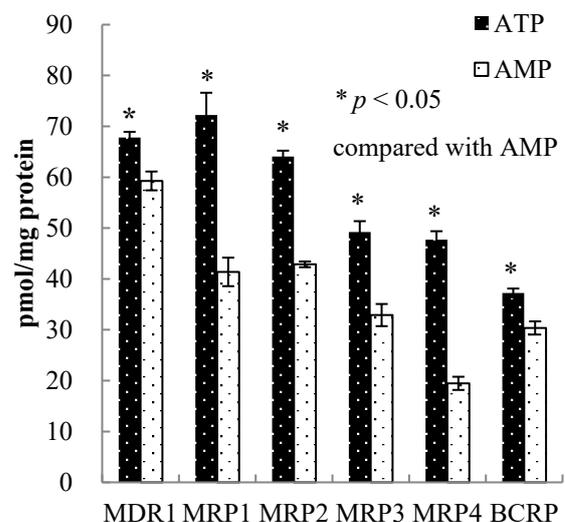


Figure.2 ^3H -NE の集積率

^{131}I -MIBG では、MRP1 および MRP4 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、 ^3H -NE では全てのトランスポーター発現ベシクルにおいて有意に増加したが、 ^{131}I -MIBG に比べて排泄型薬物トランスポーターの関与が小さかった。従って、 ^{131}I -MIBG では ^3H -NE に比べ排泄型薬物トランスポーターの関与が大きく、その中でも MRP1, MRP4 が ^{131}I -MIBG の細胞外排泄に関与している可能性が示された。

III. ヒト由来腫瘍細胞における排泄機序の確認

A) 実験方法と材料

ヒト神経芽細胞腫由来細胞株 SK-N-SH, ヒト前立腺癌由来細胞株 MDA-PCa-2b, DU145, PC3, LNCap を 37°C , $5\%\text{CO}_2$ 条件下で培養した。またマイクロアレイ (Agilent) を用いて, universal human reference RNA (Stratagene) に対する各培養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 SK-N-SH, MDA-PCa-2b における阻害実験には, MRP 特異的阻害剤として probenecid (Invitrogen) および MK571 sodium salt (Cayman Chemical) を使用した。この細胞を 12 ウェル細胞培養用マルチウェルプレート (Iwaki) に 1 ウェル辺り 1×10^5 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, インキュベーションバッファーとしてリン酸生理緩衝液 (Na^+ -PBS) 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を control として, 約 $3.7 \text{ kBq}/\mu\text{l}$ の ^{131}I -MIBG を $5 \mu\text{l}$ 投与し, 一方では輸送阻害効果を確認するために ^{131}I -MIBG と MRP 阻害剤を同時投与して, それぞれ 5 分間インキュベーションした。 ^{131}I -MIBG を含んだ Na^+ -PBS を取り除き, 氷冷した Na^+ -PBS で細胞を 2 回洗浄した。 $1000 \mu\text{l}$ の 0.1N NaOH で細胞を溶解し, そのうちの $800 \mu\text{l}$ をガンマカウンタで測定した。

B) 結果と考察

Table.1 に MDA-PCa-2b, DU145, PC3, LNCap のマイクロアレイによる薬物トランスポーター遺伝子発現解析結果を示す。マイクロアレイの結果は reference RNA に対する各細胞における薬物トランスポーター遺伝子の発現量の割合を対数表示しており, 今回の検討では, 正の数値を高発現とした。この結果, 他の腫瘍細胞に比較して, MDA-PCa-2b では MRP1, MRP4 がともに顕著に高発現していることを確認した。

Table.1 マイクロアレイの結果

	MDR1	MRP1	MRP2	MRP4	BCRP
MDA-PCa-2b	-3.17	0.90	-7.77	1.90	-2.53
DU145	-3.18	-0.97	-4.00	-1.52	-1.63
PC3	-3.16	-1.63	-8.22	-1.16	-4.36
LNCap	-3.23	-0.18	-8.07	0.24	-3.73

一方、特定の排泄型薬物トランスポーターを阻害することで腫瘍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 ^{131}I -MIBG の腫瘍細胞からの排泄に関わっていることが確認できる。MRP1, MRP4 の高発現が確認された MDA-PCa-2b 及び ^{131}I -MIBG 内用療法の適用となっている SK-N-SH における阻害実験の結果を Figure.3 と 4 に示す。両細胞において、MRP 阻害剤使用時に腫瘍細胞への集積が阻害無負荷の control と比べて有意に増加した。

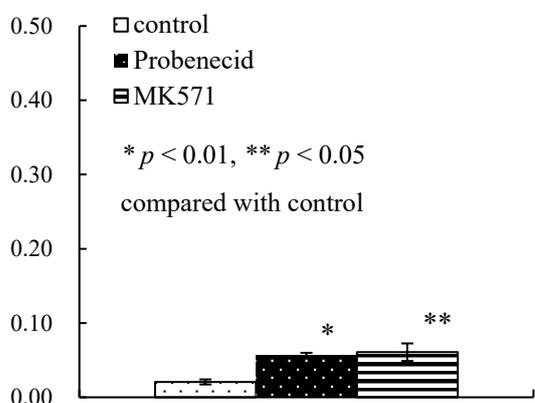


Figure.3 MDA-PCa-2b における阻害効果

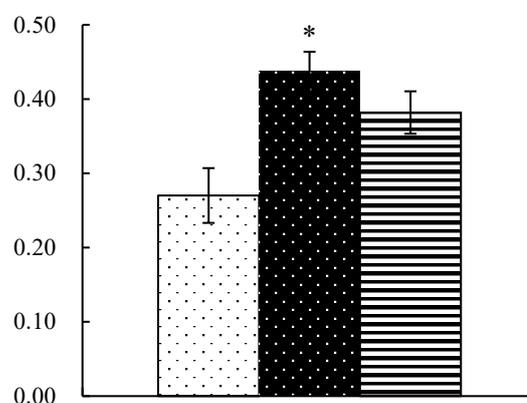


Figure.4 SK-N-SH における阻害効果

前述のように、ベシクルを用いた排泄型薬物トランスポーターの検討において、 ^{131}I -MIBG の細胞外排泄には MRP1, MRP4 が関与している可能性が認められたため、腫瘍細胞においてもこれらのトランスポーターが排泄に関与しているのかを検討した。マイクロアレイ解析の結果から、MRP1, MRP4 の高発現を認めた MDA-PCa-2b, MDA-PCa-2b および SK-N-SH において、MRP 阻害剤の阻害効果からも MRP1, MRP4 の関与が確認できた。

IV. 結語

本研究によって、 ^{131}I -MIBG の腫瘍細胞外排泄への MRP1, MRP4 の関与が確認された。この結果から、MRP1, MRP4 を介した細胞外排泄を阻害することで ^{131}I -MIBG を腫瘍細胞内に貯留させ、 ^{131}I -MIBG 内用療法の治療効果を向上させる可能性が考えられた。

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) Sano Y, Okuyama C, Iehara T, Matsushima S, Yamada K, Hosoi H, Nishimura T. New semi-quantitative ^{123}I -MIBG estimation method compared with scoring system in follow-up of advanced neuroblastoma: utility of total MIBG retention ratio versus scoring method. *Ann Nucl Med.* 2012; **26**(6): 462-470.
- 2) de Kraker J, Hoefnagel KA, Verschuur AC, van Eck B, van Santen HM, Caron HN. Iodine-131-metaiodobenzylguanidine as initial induction therapy in stage 4 neuroblastoma patients over 1 year of age. *Eur J Cancer.* 2008; **44**(4):551-556.
- 3) 福喜多博義, 他 核医学技術総論 p467-469 山代印刷株式会社出版部 2010.
- 4) Nakanishi T. Drug transporters as targets for cancer chemotherapy. *Cancer Genomics Proteomics.* 2007; **4**(3): 241-254.
- 5) Kiyono Y, Yamashita T, Doi H, Kuge Y, Katsura T, Inui K, Saji H. Is MIBG a substrate of p-glycoprotein? *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2007; **34**(4): 448-452.