

氏名	田中久美子
学位(専攻分野)	博士(薬学)
学位記番号	薬博第396号
学位授与の日付	平成9年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	薬学研究科薬学専攻
学位論文題目	ヒト <i>MDR1</i> 遺伝子導入上皮細胞における P-糖蛋白質を介した薬物輸送機構の解析
論文調査委員	(主査) 教授 乾 賢一 教授 橋田 充 教授 佐治英郎

論文内容の要旨

多剤耐性を示す癌細胞の細胞膜には、P-糖蛋白質が過剰に発現しており、構造の異なる様々な抗癌剤を細胞外に排出するポンプとして機能することが知られている。また、P-糖蛋白質は肝臓、腎臓、脳、小腸などの正常組織にも発現しており、薬物など生体異物の体内からの排泄に関与している。P-糖蛋白質は、癌細胞および正常組織での薬物動態に大きく関わっているにもかかわらず、薬物輸送機構や薬物間相互作用についての基礎的情報が十分であるとは言いがたい。本研究では、P-糖蛋白質を介した薬物輸送特性の解明を目的として、培養上皮細胞に P-糖蛋白質をコードする *MDR1* 遺伝子を導入した評価系を作成し、P-糖蛋白質を介した薬物輸送について系統的検討を行った。

I. ヒト *MDR1* 導入上皮細胞による薬物輸送の評価と P-糖蛋白質の基質認識特性

培養上皮 LLC-PK₁ 細胞に *MDR1* 遺伝子を導入してコルヒチン 150ng/ml 共存下で培養することにより、細胞の頂側膜側に P-糖蛋白質を過剰発現させた細胞 LLC-GA5-COL150 を作成した。この細胞を多孔性フィルター上に培養してダウノルビシンおよびビンブラスチンの経細胞輸送を検討したところ、側底膜側から頂側膜側への方向選択的な薬物輸送が認められ、両方向の輸送量の差をとることによって、P-糖蛋白質を介した輸送を容易に評価することができた。また、P-糖蛋白質を介した輸送の増大は、薬物の細胞内蓄積量の減少とも良好な対応を示した。ダウノルビシン及びビンブラスチンの P-糖蛋白質を介した輸送は、シクロスポリン誘導体あるいはタクロリムス共存下で減少し、その阻害効果には薬物間で大きな差が認められた。これら阻害剤の脂溶性と阻害効果について検討したところ、両者の間に相関関係が認められ、阻害剤の脂溶性によって P-糖蛋白質に対する阻害効果が規定されていることが明らかとなった。

P-糖蛋白質の阻害剤の中でも副作用が少なく、併用によって抗癌剤の作用増強が期待されるセファランチンについて、方向選択的なダウノルビシン輸送に対する阻害効果について検討を加えた。P-糖蛋白質阻害活性を有するものの強い生理活性を有するシクロスポリン A にセファランチンを併用した場合、

その阻害効果はそれぞれ単独で用いた場合の和よりも大きく、副作用の回避には異なる阻害剤の併用が有用であることが示唆された。従って、この経細胞輸送系は P-糖蛋白質の基質認識特性や阻害剤の併用効果の検討において、簡便かつ有用な評価系であることが明らかとなった。

II. P-糖蛋白質による薬物輸送制御機構の解析

癌細胞における P-糖蛋白質の発現レベルは、細胞種や耐性の程度によって大きく異なることが知られている。MDR1 遺伝子導入細胞を種々の濃度の薬物存在下で培養することによって、P-糖蛋白質の発現レベルの異なる細胞が容易に得られる。そこで、薬物経細胞輸送が P-糖蛋白質の発現レベルによって制御されるか否かについて検討した。P-糖蛋白質の発現レベルの上昇に伴って、ダウノルビシンの方向選択的な経細胞輸送量が増大し、細胞内蓄積量が減少した。さらに、ダウノルビシン輸送に対するシクロスポリン A の阻害効果は減弱した。P-糖蛋白質の発現レベルの上昇に伴ってシクロスポリン A 自体の細胞内蓄積量が減少したことから、シクロスポリン A の阻害効果の強さの違いは細胞内シクロスポリン A 濃度に依存することが示唆された。従って、P-糖蛋白質の発現レベルによって薬物の経細胞輸送並びに阻害剤の効果が制御されることが示された。

細胞における薬物輸送では、輸送体を介した薬物の移動のみならず、受動拡散による薬物の細胞膜透過も寄与していることから、薬物経細胞輸送、細胞内蓄積量に対する P-糖蛋白質の影響を予測するためには、P-糖蛋白質を反映する輸送過程を他の輸送過程から分離評価する必要がある。薬物経細胞輸送実験系は、細胞での取り込み実験より情報量が多い利点を有することから、薬物経細胞輸送を速度論的に解析することを試み、LLC-GA5-COL150 細胞における薬物の経細胞輸送特性について検討した。頂側膜側、細胞内、側底膜側の 3つのコンパートメントを仮定した速度論モデルを構築して、各コンパートメント間の輸送過程をクリアランス (CL) で評価した。P-糖蛋白質によって細胞内蓄積量が著しく変動するダウノルビシン、ほとんど変動しないジゴキシンともに、P-糖蛋白質導入によって細胞内から頂側膜側への輸送過程を示す CL_{C-A} が顕著に上昇することが認められ、またシクロスポリン A による阻害効果を定量的に評価することができた。従って、速度論的に解析することにより、薬物経細胞輸送、細胞内蓄積量及び阻害剤の影響に対する P-糖蛋白質の寄与を評価するとともに、それらに対する P-糖蛋白質阻害剤の影響を定量的に予測することが可能となった。

以上、著者は P-糖蛋白質発現上皮細胞を用いた薬物経細胞輸送評価系を作成し、P-糖蛋白質の基質認識特性を明らかにした。また、P-糖蛋白質の発現レベルによって薬物輸送が制御されることを明らかにし、さらに速度論的に解析することによって薬物経細胞輸送・細胞内蓄積量における P-糖蛋白質の寄与を明確にした。これらの研究成果は、P-糖蛋白質を介した薬物間相互作用や抗癌剤耐性克服薬の開発に際し有用な基礎的知見になると考える。

論文審査の結果の要旨

P-糖蛋白質は、ATP の加水分解エネルギーを直接利用して抗癌剤を細胞外に排出する機能を有してお

り、癌細胞の抗癌剤に対する多剤耐性に関与する。近年、P-糖蛋白質を阻害することによって、抗癌剤の癌細胞内濃度を高める多剤耐性克服薬の臨床応用が期待されている。一方、P-糖蛋白質は癌細胞のみならず、腎臓、肝臓、脳、小腸などにも発現し、薬物など生体内異物の分布・排泄に関わることが明らかとなってきた。しかし、薬物動態あるいは薬物間相互作用に対するP-糖蛋白質の寄与についての定量的な評価・解析は不十分であり、P-糖蛋白質の基質認識特性あるいは薬物輸送制御機構については不明な点が多い。本論文はヒト *MDR1* 遺伝子を導入しP-糖蛋白質を過剰発現させた培養上皮細胞を確立し、P-糖蛋白質を介した薬物輸送機構の解析を行ったものであり、得られた成果は以下の通りである。

ヒト *MDR1* 遺伝子を導入した培養上皮 LLC-PK₁ 細胞をコルヒチン共存下で培養することによって、P-糖蛋白質を頂側膜に過剰発現させた。この細胞を多孔性フィルター上に単層培養することによって、薬物の方向選択的な経細胞輸送を簡便かつ定量的に評価し得る実験系を確立した。シクロスポリン誘導体によるダウノルビシンとビンブラスチンの経細胞輸送および細胞内蓄積量の変化を検討した結果、阻害剤の脂溶性によってP-糖蛋白質の基質認識特性が規定されることが明らかとなった。さらに、P-糖蛋白質に対して阻害効果が認められない低濃度のシクロスポリンにセファランチンを併用したところ、ダウノルビシンの細胞内蓄積は著しく増大することから、低濃度（低用量）の多剤耐性克服薬の併用によって副作用の低減が期待できることが明らかとなった。これらの結果から、本研究で確立した薬物経細胞輸送実験系は、P-糖蛋白質の基質認識特性や薬物間相互作用の検討において、有用な評価系であると考えられた。

P-糖蛋白質による薬物輸送制御機構の解明を目的に、P-糖蛋白質の発現レベルと薬物間相互作用の相関について検討を加えた。細胞を薬物濃度の異なる培養液で処理することによって、P-糖蛋白質の発現レベルが異なる薬物経細胞輸送実験系を作成した。ダウノルビシンの経細胞輸送および細胞内蓄積におよぼすシクロスポリンの効果は、発現レベルが低い場合に顕著であり、その原因は細胞内シクロスポリン濃度の変動に起因することが明らかとなった。さらに、薬物動態に対するP-糖蛋白質の寄与を定量的に評価することを目的に、薬物経細胞輸送・細胞内蓄積を速度論的に解析した。その結果、細胞内、頂側膜側、側底膜側コンパートメントを仮定した速度論モデルを用いることによって、P-糖蛋白質を介した薬物の膜輸送活性、および薬物の細胞内蓄積におよぼす阻害剤の効果を定量的に評価・予測できることが明らかとなった。

以上の研究は、P-糖蛋白質を介した薬物輸送機構および薬物間相互作用の解明、ならびに癌化学療法における多剤耐性克服薬の臨床応用に貢献するところ大であり、医療薬剤学の発展に寄与するものと考えられる。よって、本論文は博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。

更に、平成9年3月3日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。