Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-04

Inhibitory Effects of a Cyclosporin Derivative, SDZ PSC 833, on Transport of Doxorubicin and Vinblastine via Human P-Glycoprotein

楠，信也

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
1998-11-31
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲1863
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001863

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

氏名・（本籍）　楠（くすのき）　信也（しんや）　（兵庫県）

博士の専攻分野の名称　博　士（医　学）
学位記番号　博い第1180号
学位授与の要件　学位規則第4条第1項該当
学位授与の日付　平成10年11月30日

学位論文題目　Inhibitory Effects of a Cyclosporin Erivative, SDZ PSC 833, on Transport of Doxorubicin and Vinblastine via HumanP-Glycoprotein
（シクロスポリン誘導体SDZ PSC 833によるヒトP糖蛋白質を介したドキソルビシン及びビンブラスチン輸送の阻害効果）

審査委員　主査　教授　奥村勝彦
教授　春日雅人　教授　黒田嘉和

論文内容の要旨

〈緒言〉

多剤耐性（MDR）は癌化学療法において深刻な問題である。耐性獲得のメカニズムの一つとしてP糖蛋白質の発現が挙げられる。P糖蛋白質は細胞内に取り込まれた薬物を細胞外へ排出することにより細胞内薬物濃度を低下させてその結果薬物に対する抵抗精を示す。MDRmodulatorはP糖蛋白質を介した薬物輸送を阻害する薬物の総称であり癌化学療法においてその応用が期待されている。最近，シクロスポリンDの新しい誘導体であるSDZ　PSC 833（PSC 833）はMDRmodulatorとしての活性を示すことが見出された。シクロスポリンAは免疫抑制作用及び腎毒性を有しているがPSC 833にはそのような副作用は認められていない。PSC 833とドキソルビシンまたはエトポシドの併用療法に関する臨床試験は現在進行中である。以前の研究においてPSC 833の耐性克服効果は主に細胞増殖阻害実験を用いて評価されていた。我々は既にヒトMDR 1 cDNAを導入しヒトP糖蛋白質を発現したLLC-GA 5－COL150細胞を用いた経細胞輸送実験形を確立している。PSC 833及びCs-Aによるドキソルビシン及びビンブラスチン輸送の阻害効果について比較しそのメカニズムについても併せて検討を行った。

〈実験材料及び方法〉

1．細胞

ブタ腎上皮由来LLC-PK 1細胞は10％牛胎仔血清を含むMedium199を用い5％CO_2－95％air，37の環境下で培養した。LLC-GA 5—COL150細胞はLLC-PK 1細胞にヒトMDR 1 cDNAを導入しコルヒチン150ng/ml共存下で培養することによって得た。

2．［^{14}C］ドキソルビシンの経細胞輸送及び細胞内蓄積量

LLC-PK 1及びLLC-GA 5－COL150細胞は多孔フィルターの上にそれぞれ4 x10^5及び5 x10^5cells/cm_2で播種した。PSC833及びCs-Aの影響を検討するためにPSC833（0.1，0.5，1，2μM）あるいはCs-A（2，5，10μM）は実験開始1時間前に細胞シートの両側に添付した。経細胞輸送量の測定は［^{14}C］ドキソルビシンを含む培養液をドナー側に添付し3，6，20，24時間後にレシーバー側

から採取することにより行った。実験終了直後に1mlの0.3N NaOHで細胞を溶解し細胞内蓄積量を測定した。経細胞輸送量及び細胞内蓄積量は液体シンチレーション法で測定した。

3.「^{3}H」ビンブラスチンの経細胞輸送及び細胞内蓄積量

[^{3}H] ビンブラスチン経細胞輸送及び細胞内蓄積量は2.に準じて行った。ただし [^{3}H] ビンブラスチンの輸送速度が [^{14}C] ドキソルビシンの場合と比較して速かったのでサンプリングは1，2，3時間後に行った。

4. PSC 833の経細胞輸送

PSC 833の経細胞輸送は同様の実験系を用いて行った。経細胞輸送量の測定は10μMのPSC 833を含む培養液をドナー側に添加し3及び6時間後にレシーバー側から採取することにより行った。PSC 833の定量は高速液体クロマトグラフィにより行った。

5. PSC 833及びCs-Aの薄層クロマトグラフィ（TLC）

PSC 833及びCs-Aの相対的な脂溶性を求めるためにTLCによる分析を行った。PSC 833及びCs-AのRf値はそれぞれ0.831及び0.812であった。

6. [^{14}C] ドキソルビシン及び [^{3}H] ビンブラスチンの経細胞輸送におけるPSC 833及びCs-Aの50%輸送阻害濃度（IC_{50}）の測定

PSC 833及びCs-Aによる輸送の阻害率はPSC 833およびCs-Aの濃度に対してプロットし，非線形最小自乗法を用いてシグモイドEmaxモデル（1）に当てはめた。

$$E=Emax\ xC^{r}/(IC_{50}{}^{r}+C^{r}) \quad \cdots\cdots (1)$$

〈結果〉

1. LLC-PK 1及びLLC-GA 5－COL150細胞における [^{14}C] ドキトルビシン及び [^{3}C] ビンブラスチンの経細胞輸送

LLC-GA 5－COL150細胞における側底膜側から頂側膜側への [^{14}C] ドキソルビシン輸送はLLC-PK 1細胞の場合と比較して顕著に大きく，反対に頂側膜側から側底膜側への輸送は減少した。[^{3}H] ビンブラスチンの経細胞輸送も同様の結果であった。

2. [^{14}C] ドキソルビシンの経細胞輸送におけるPSC 833及びCs-Aの阻害効果

PSC 833は0.1μMにおいて [^{14}C] ドキソルビシンの輸送をほとんど阻害しなかったが，0.5μM以上の濃度において強力な阻害活性を示した。Cs-Aは2μMにおいて [^{14}C] ドキソルビシン輸送を阻害しなかったが10μMにおいて完全な阻害を示した。またLLC-GA 5－COL150細胞における細胞内蓄積量はLLC-PK 1細胞の場合と比較して低下していた。LLC-GA 5－COl150細胞における細胞内蓄積量は0.5μMのPSC 833存在下，LLC-PK 1細胞レベルまで増大した。Cs-Aは10μMにおいてほぼ完全に細胞内蓄積量を回復させた。PSC 833及びCs-Aは [^{14}C] ドキソルビシン輸送を濃度依存的に阻害し，シグモイドEmaxモデルにあてはめ測定したIC_{50}はそれぞれ0.291及び3.66であった。[^{14}C] ドキソルビシン輸送におけるPSC 833のIC_{50}値はCs-Aの約1／10であった。

3. [^{3}H] ビンブラスチンの経細胞輸送におけるPSC 833及びCs-Aの阻害効果

[^{14}C] ドキソルビシンにおける結果と同様に，PSC 833及びCs-Aは [^{3}H] ビンブラスチンの経細胞輸送を濃度依存的に阻害した。PSC－833及びCs-Aはそれぞれ2μM及び10μMにおいて [^{3}H] ビンブラスチンの輸送を完全に阻害した。LLC-GA 5－COL150細胞における細胞内蓄積量は2μMのPSC 833存在下においてLLC-PK 1細胞レベルまで回復したのに対して，Cs-Aの場合10μM存在下においてものLLC-PK 1細胞の半分のレベルまでしか回復しなかった。また [^{3}H] ビンブラスチン輸送におけるPSC 833及びCs-AのIC_{50}値はそれぞれ1.06及び5.10μMでありPSC 833のIC_{50}値はCs-A

の約１／５であった。さらに［^{14}C］ドキソルビシン輸送におけるPSC 833のIC_{50}値は「^{3}H」ビンブラスチン輸送における値の約１／４であったが，Cs-Aの場合それらの値はほぼ同等であった。

４．PSC 833の経細胞輸送

LLC-PK１細胞におけるPSC 833の側底膜側から頂側膜側への輸送は反対方向への輸送とほぼ同等であった。同様の結果がLLC-GA５－COL150細胞においても得られた。さらにLLC-PK１及びLLC-GA５－COL150細胞によるPSC 833の輸送量はほぼ同等であった。

〈考案〉

今回の実験系では実際に細胞外に排出される抗癌剤の量を測定することによりP糖蛋白質を介した薬物輸送とその阻害効果を直接的に評価した。「^{14}C」ドキソルビシン及び［^{3}H］ビンブラスチン輸送におけるPSC 833のIC_{50}はそれぞれCs-Aの10％及び20％であり、P糖蛋白質介在輸送におけるPSC 833の阻害効果はCs-Aの５～10倍であった。細増殖阻害実験においてPSC 833及びCs-Aの耐性克服濃度はそれぞれ0.03～2μM及び0.3～10μMと報告されており本実験のIC_{50}値とは絶対値が異なるが相対的に他の報告と一致する結果であった。脂溶性がMDRmodulatorの阻害効果を左右する重要な因子が報告されている。今回PSC 833及びCs-AのRf値がそれぞれ0.831及び0.812であった。従ってPSC 833の高い脂溶性がCs-Aより強いP糖蛋白質阻害活性を示す要因である可能性が考えられた。しかしながら脂溶性のみではこれらの阻害活性の相違を説明できず以下に示すほかの要因も考えられた。

MDRmodulatirはそれ自体がP糖蛋白質に輸送されるか否かによって２つのタイプに分類される。PSC 833はP糖蛋白質によって輸送されないことを明らかにしたがCs-Aは輸送されることが報告されている。P糖蛋白質により輸送されるMDRmodulatorは細胞外へ排出されるためP糖蛋白質の発現している細胞において細胞内modulator濃度は減少する。しかしMDRmodulatorがP糖蛋白質により輸送されない場合P糖蛋白質発現細胞においても細胞内濃度を高値に維持できる。さらにPSC 833のP糖蛋白質への親和性はCs-Aよりも高いことが報告されている。従ってP糖蛋白質により輸送されないこと並びにP糖蛋白質への親和性が高いことがPSC 833の阻害活性の強さに寄与していることが考えられた。

さらに［^{14}C］ドキソルビシン輸送におけるPSC 833の阻害効果はビンブラスチン輸送より約４倍強力であった。この差の原因は明確でないがP糖蛋白質に対する薬物の親和性の違いによると推測される。この結果はドキソルビシンとPSC 833の併用療法が有効であることを示唆している。併用療法に関する臨床試験においてPSC 833はドキソルビシンの血中AUCを20～199％上昇させることが報告されておりPSC 833のmodulator効果が臨床においても認められている。耐性克服剤の臨床試験においてPSC 833及びCs-Aの目標血中濃度はそれぞれ1000ng/ml（約0.8μM）及び3000～4800ng/ml（約2.5～4.0μM）であることが報告されており臨床的にもPSC 833はCs-Aより低濃度で有効であることが示されている。従って本実験系はMDRはmodulatorとしての相対的効果を予測する手段として有効であることが示された。

〈まとめ〉

P糖蛋白質を介した抗癌剤輸送におけるPSC 833の阻害効果はCs-Aより５～10倍強力であった。PSC 833の強い阻害活性はPSC 833自体がP糖蛋白質により輸送されないこと並びにCs-Aと比較し高い脂溶性を示すことに起因していると考えられた。

論文審査の結果の要旨

抗癌剤などの多剤耐性（MDR,Mjlti-Drug Resistance）のメカニズムの一つとしてP糖蛋白質の発現が近年注目されている。P糖蛋白質は細胞内に取り込まれて薬物をを細胞外へ排出する輸送蛋白質で，排出によって細胞内薬物濃度を低下させ，その結果として薬剤に対する抵抗性を発現する。MDRmodulatorはこのP糖蛋白質を介した薬物輸送を阻害する薬物の総称であり，抗癌剤などの作用増強にその応用が期待されている。今回申請者はシクロスポリンA（Cs-A）及びその誘導体PSC 833によるドキソルビシンとビンブラスチン輸送の阻害効果について比較し，そのメカニズムについて検討した。

方法はブタ腎上皮細胞LLC-PK 1細胞とこの細胞にヒトP糖蛋白MDR 1のcDNAを導入し，コルヒチン150ng/ml共存下で培養して得たLLC-GA 5－COl150細胞を用いてドキソルビシン，ビンブラスチンの経細胞輸送，細胞内蓄積量を測定するものである。細胞は多孔フィルターの上に播種し，各濃度のCs-AあるいはPSC 833を実験開始1時間前に細胞シートの両側に添付した。経細胞輸送量の測定は抗癌剤を含む培養液をドナー側に添加し，経時的にレシーバー側から採取することにより行った。細胞内蓄積量は実験終了後に細胞をアルカリで溶解して測定した。
ドキソルビシン及びビンブラスチンの定量は［^{14}C］［^{3}H］標識体の放射活性を測定して行い，PSC 833の定量はHPLCによった。

その結果，MDR 1導入細胞における側底膜側から頂側膜側へのドキソルビシン及びビンブラスチンの輸送はLLC-PK 1細胞の場合に比べて顕著に大きく，反対方向の頂側膜側から側底膜側への輸送は減少した。この輸送系を用いてCs-A及びPSC 833の阻害効果を検討したところ，Cs-Aは10μM以上，PSC 833は0.5μM以上でドキソルビシン，ビンブラスチンの経細胞輸送に対する阻害活性を示し，いずれの阻害も濃度依存的であった。その50％阻害濃度IC_{50}はCs-Aの場合ドキソルビシンには3.66μM、ビンブラスチンには5.10μMであり、PSC 833の場合はそれぞれ0.29，1.06μMであった。従って，P糖蛋白質介在輸送におけるPSC－833の阻害効果はCs-Aの5～10倍強いことが明らかとなり，抗癌剤のin vivo増強効果ともほぼ一致した。またPSC－833がP糖蛋白質によって輸送されないことを明らかにすると共にPSC 833の脂溶性がCs-Aに比し高いことを明確にした。従って，PSC 833の阻害活性の強さはPSC 833自体がP糖蛋白質により輸送されず輸送部位で高濃度を保てることに大きく依存しており，脂溶性の高さに起因するP糖蛋白質への親和性にも依存していることが予測された。さらに，ドキソルビシン輸送におけるPSC 833の阻害効果はビンブラスチン輸送より4倍強力であったが，この結果は併用療法に関する臨床試験においてPSC 833がドキソルビシンの血中AUCを20～199％上昇させた事実を十分に説明できるものであった。従って，本実験系はMDRmodulatorとしての相対的効果を予測する手段として有用と考えられる。

本研究はP糖蛋白質を介した抗癌剤輸送におけるPSC 833，Cs-Aの阻害効果をP糖蛋白質遺伝子導入細胞によって解析したものであるが，従来ほとんど行われなかった薬物輸送蛋白質の阻害機構について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって本研究者は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。