



Interaction of Docetaxel (Taxotere) with Human P-Glycoprotein

白川, 勝朗

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2000-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2120

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002120>

※ 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）	白 ^{しら} 川 ^{かわ} 勝 ^{かつ} 朗 ^{ろう} （韓国）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	博い第1263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12年3月31日
学位論文題目	Interaction of Docetaxel("Taxotere") with Human P-Glycoprotein (Docetaxel("Taxotere")とヒトP-糖蛋白質の相互作用)

審査委員	主査 教授 奥村 勝彦	
	教授 春日 雅人	教授 前田 盛

論文内容の要旨

Docetaxel("Taxotere")[(2R, 3S)-N-carboxy-3-phenylisoserine, N-tert-buthyl ester, 13-ester with 5β-20-epoxy-1, 2α, 4, 7β, 10β, 13α-hexahydroxytax-11-en-9-one 4-acetate 2-benzoate, trihydrate](C₄₃H₅₃NO₁₄ · 3 H₂O (861.94) は、半合成された、paclitaxel("Taxol")類似の抗癌剤で、微小管の重合を促進し、細胞周期を G2/M 期で停止させ、アポトーシスへ導く事により細胞毒性を発揮する。docetaxel は、乳癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、頭頸部癌の治療に有効であり、北米、ヨーロッパおよび日本等の国々では、乳癌、非小細胞肺癌に対してすでに臨床応用されている。

以前我々は、MDR1 cDNA をブタ腎尿管上皮細胞 LLC-PK₁ にトランスフェクトする事によって、腫瘍細胞の、異物排泄と多剤耐性 (multidrug resistance; MDR) において最も重要な蛋白質であるヒト P-糖蛋白質 (P-gp) を、apical membrane に選択的に過剰発現させた LLC-GA5-COL150 細胞を樹立した。この細胞は、tight junction を伴って単層培養される事が示され、P-gp を介した drug transport を直接的に評価することが可能である。

今回我々は、docetaxel と P-gp の相互作用を、LLC-PK₁ および LLC-GA5-COL150 の両細胞株を用いて検討した。

LLC-PK₁ および LLC-GA5-COL150 は、microporous polycarbonate membrane filter("Transwell" 3414, Coster, Cambridge, MA) 上に、各々 4 × 10⁵ および 5 × 10⁵ cells/cm² の濃度で培養した。Medium199 に 10 % fetal bovine serum と、LLC-GA5-COL150 についてのみ 150 ng/ml の colchicine を調整したものを、chamber の内側に各々 1.5 および 2.6 ml 加え、5 % CO₂-95 % air, 37℃ の条件下で 3 日間培養した。輸送実験の 3 時間前に、すべての culture medium を colchicine を含まないものに入れ替え、実験開始時には、ドナー側は、[¹⁴C]¹docetaxel (3.4 kBq) を含んだ各濃度の docetaxel と [³H]¹inulin (34 kBq) を加えた medium 2 ml、レシーバー側は fresh な medium のみ 2 ml と再度入れ替えた。実験中も、細胞を 5 % CO₂-95 % air, 37℃ の条件下で培養し、規定の時間毎に、レシーバー側の medium を 25 μl ずつ採取した。docetaxel の経細胞輸送に対する MDR modulator の効果を検討する場合は、実験の開始 1

時間前に、MDR modulator を細胞層の内外両側の medium に同濃度となるように添加し、実験時の medium にも同濃度の MDR modulator を両側に加えた。細胞を経由しない漏出性の移動の有無は、 $[^{14}\text{H}]$ inulin のレシーバー側への出現によって評価したが、最大でも1時間当たり全放射活性の1%以下であった。細胞内蓄積の評価については、輸送実験終了時に即座に medium を吸引除去し、細胞層の上下両側を ice-cold phosphate-buffered saline で2度洗浄した後、細胞層の付着した filter を chamber より取り外し、1 ml の0.3N NaOH 中で細胞を溶解した液を用いた。採取した medium および細胞溶解液は、3 ml の ACS II (Amersham International) 液に混和して、liquid scintillation counter (Beckman, LS6000TA) にて放射活性を測定し、全放射活性に対する分画 (パーセント) として表わした。

LLC-GA5-COL150において、 $[^{14}\text{C}]$ docetaxel の basal-to-apical 方向の transport は、LLC-PK₁におけるそれを著明に上回ったが、apical-to-basal 方向の transport では下回った。LLC-GA5-COL150における、 $[^{14}\text{C}]$ docetaxel の細胞内蓄積量については、LLC-PK₁の4-20分の1に留まった。MDR modulator のうち SDZ PSC833およびシクロスポリン A は、LLC-GA5-COL150における $[^{14}\text{C}]$ docetaxel の basal-to-apical 方向の transport を抑制し、apical-to-basal 方向の transport を増加させたが、ベラパミルは、apical-to-basal 方向の transport にのみ影響を及ぼした。 $[^{14}\text{C}]$ docetaxel を basal 側あるいは apical 側いずれに加えた場合も、LLC-GA5-COL150における細胞内蓄積量は、上記3種の MDR modulator 添加により増加した。以上より、docetaxel はヒト P-gp によって輸送される事、docetaxel と他の薬剤の相互作用は P-gp を介したものである事が示唆された。

内因性に、低レベルの P-gp を発現している LLC-PK₁において、MDR modulator だけでなく、P-gp の輸送基質である daunorubicin と vinblastine によっても $[^{14}\text{C}]$ docetaxel の transport が抑制された。また、LLC-GA5-COL150と比較すると、より低濃度 (2-10分の1) で同程度の抑制効果を発揮した。これらの観察より、docetaxel と、同様に P-gp によって輸送される他の抗癌剤 (anthracyclines, vinca alkaloids) を用いた combination chemotherapy においては P-gp を介した、薬物動態学および薬力学的相互作用についても必要がある事が示された。

論文審査の結果の要旨

Docetaxel (“Taxotere”) は、半合成された、paclitaxel (“Taxol”) 類似の抗癌剤で、微小管の重合を促進し、細胞周期を G2/M 期で停止させ、アポトーシスへ導く事により細胞毒性を発揮する。以前我々は、MDR 1 cDNA をブタ腎尿細管上皮細胞 LLC-PK₁ にトランスフェクトする事によって、腫瘍細胞の、異物排泄と多剤耐性 (multidrug resistance; MDR) において最も重要な蛋白質であるヒト P-糖蛋白質 (P-gp) を、apical membrane に選択的に過剰発現させた LLC-GA5-COL150細胞を樹立した。今回我々は、docetaxel と P-gp の相互作用を、LLC-PK₁ および LLC-GA5-COL150 の両細胞株を用いて検討した。

[方法] LLC-PK₁ および LLC-GA5-COL150 は、microporous polycarbonate membrane filter 上に培養した。Medium 199 に10% fetal bovine serum と、LLC-GA5-COL150 についてのみ150 ng/ml の colchicine を調整したものを、chamber の内側、外側に各々1.5および2.6 ml 加え、5% CO₂-95% air, 37℃の条件下で3日間培養した。輸送実験の3時間前に、すべての culture medium を colchicine を含まないものに入れ替え、実験開始時には、ドナー側は $[^{14}\text{C}]$ docetaxel (3.4 kBq) を含んだ各濃度の docetaxel を

加えた medium 2 ml, レシーバー側は fresh な medium のみ 2 ml と再度入れ替えた。実験中も, 細胞を 5 %CO₂-95 %air, 37℃の条件下で培養し, 規定の時間毎に, レシーバー側の medium を 25 µl ずつ採取した。docetaxel の経細胞輸送に対する MDR modulator の効果を検討する場合は, 実験の開始 1 時間前に, MDR modulator を細胞層の内外両側の medium に同濃度となるように添加し, 実験時の medium にも同濃度の MDR modulator を両側に加えた。細胞内蓄積の評価については, 輸送実験終了時に即座に medium を吸引除去し, 細胞層の付着した filter を chamber より取り外し, 1 ml の 0.3N NaOH 中で細胞を溶解した液を用いた。採取した medium および細胞溶解液は, 3 ml の ACSII (Amersham International) 液に混和して, liquid scintillation counter (Beckman, LS6000TA) にて放射活性を測定し, 全放射活性に対する分が (パーセント) として表した。

[結果および考察] LLC-GA5-COL150において, [¹⁴C] docetaxel の basal-to-apical 方向の transport は, LLC-PK₁におけるそれを著明に上回ったが, 逆に apical-to-basal 方向の transport では下回った。LLC-GA5-COL150における, [¹⁴C] docetaxel の細胞内蓄積量については, LLC-PK₁の 4-20分の 1 に留まった。MDR modulator である SDZ PSC833およびシクロスポリン A は, LLC-GA5-COL150におけ[¹⁴C] docetaxel の basal-to-apical 方向の transport を抑制し, apical-to-basal 方向の transport を増加させ, 細胞内蓄積量も, これら MDR modulator 添加により増加した。以上より, docetaxel はヒト P-gp によって輸送される事, docetaxel と他の薬剤の相互作用は P-gp を介したものである事が示唆された。

これらの観察より, docetaxel と, 同様に P-gp によって輸送される他の抗癌剤 (anthracyclines, vinca alkaloids) を用いた combination chemotherapy においては P-gp を介した, 薬物動態学および薬力学的相互作用についても考慮する必要がある事が示された。

本研究は, 抗癌剤 Docetaxel (“Taxotere”) と, 癌細胞の多剤耐性機構の主要な原因と考えられている P-gp との相互作用を, ヒト *MDR 1* cDNA をトランスフェクトしたブタ腎尿管上皮細胞を用いて研究したものであるが, 従来はほとんど行われなかった Docetaxel の経細胞輸送動態や細胞内蓄積量, さらに MDR modulator を併存させた場合のそれらの変化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。