



# Reversal effects of antifungal drugs on multidrug resistance in MDR1-overexpressing HeLa cells

飯田, 奈美

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2003-05-14

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2693

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002693>

※ 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。



【 1 6 9 】

氏 名 ・ ( 本 籍 ) 飯 田 奈 美 ( 東 京 都 )

博士の専攻分野の名称 博士 ( 医学 )

学 位 記 番 号 博ろ第1877号

学位授与の 要 件 学位規則第 4 条第 2 項該当

学位授与の 日 付 平成 1 5 年 5 月 1 4 日

【 学位論文題目 】

Reversal effects of antifungal drugs on multidrug  
resistance in MDR1-overexpressing HeLa cells  
(MDR1過剰発現HeLa細胞を用いた抗真菌剤の  
多剤耐性克服効果の評価)

審 査 委 員

主 査 教 授 奥 村 勝 彦

教 授 黒 田 嘉 和

教 授 前 田 盛

## I. 緒言

1981年、ケトコナゾール経口剤が開発されたことによって、抗真菌剤による薬物治療が一般的に行われるようになった。しかしながら、臨床での使用実績が積み重なるに伴い、次第に、ケトコナゾールを含むアゾール系抗真菌剤が引き起こす薬物動態学的相互作用が重要視されるようになってきた。これまでの *In vitro* ヒト肝ミクロソーム実験から、1) アゾール系抗真菌剤は薬物代謝酵素チトクローム P450 (CYP) を阻害すること、2) 阻害の強さはそのアイソフォームにより異なること、が示されてきた。具体的には、通常、成人の肝臓と小腸に発現しているアイソフォームである CYP3A4 は、ケトコナゾール、イトラコナゾール、フルコナゾール、いずれによっても阻害され、ケトコナゾールによる阻害が最も強く、イトラコナゾール、フルコナゾールはそれに次ぐことが明らかとなっている。現在のところ、臨床における薬物相互作用の大部分が、CYP の阻害で説明できるものと考えられている。

近年の研究から、薬物輸送担体が薬物代謝酵素とともに薬物体内動態を規定する重要なタンパクであること、薬物輸送担体のうち MDR1 (P-糖蛋白質) が最も重要であること、MDR1 と CYP3A4 の基質特異性がかなり重複していること、などが明らかとされている。ところで、MDR1 については、元来、多剤耐性を獲得した癌細胞から単離され多剤耐性メカニズムとして注目を集めたタンパクであるが、肝臓、小腸、脳などの正常組織においても発現しており、薬物体内動態と薬物相互作用を規定することが明らかとなっている。以上のことから、抗真菌剤が MDR1 を介して薬物相互作用を引き起こすことが推定されるが、現在のところ十分なデータが得られておらず、はっきりした結論はいまだ得られていない。アゾール系抗真菌剤においても、CYP3A4 と同様に、MDR1 を介した相互作用の強さについて順位付けを行えば、MDR1 の基質となる薬剤を投与している患者や化学療法中の癌患者に対して、アゾール系抗真菌剤を選択する際に有用な情報となるであろう。

そこで、本研究ではまず、ヒト子宮頸癌由来の細胞株 HeLa-Ohio (HeLa) を、硫酸ビンブラスチン (VLB) に段階的に暴露することにより、VLB に対する耐性を獲得した HeLa 由来細胞株 Hvr100-6 を樹立し、MDR1 の過剰発現をフロ

ーサイトメトリーにより確認した。次に、抗癌剤である VLB、パクリタキセル (TXL)、塩酸ドキシソルピシン (DXR)、塩酸ダウノルビシン (DNR)、5-フルオロウラシル (5-FU) の増殖抑制作用を、親株である HeLa 細胞と Hvr100-6 細胞とで比較し、Hvr100-6 細胞の多剤耐性について検討した。その上で、アゾール系抗真菌剤であるフルコナゾール、イトラコナゾール、ケトコナゾール、ミコナゾールおよびアムホテリシン B を用いて、耐性克服効果の観点から比較した。さらに、耐性克服の原因となるメカニズムを、 $[^3\text{H}]$  標識した VLB の細胞内取り込み実験により検討した。

## II. 方法及び結果

### 1. HeLa 細胞及び Hvr100-6 細胞における MDR1、MRP のフローサイトメトリー分析

HeLa 由来の VLB 耐性細胞株 Hvr100-6 は、親株である HeLa 細胞の培養液中 VLB 濃度を段階的に上昇させ、MDR1 が過剰に発現している株を継代して樹立した。Hvr100-6 は、最終的には、VLB100nM に対して耐性を示す細胞株である。この細胞株において MDR1 が過剰に発現していることを確認するため、MDR1、及び、もう一つの多剤耐性に関わる膜蛋白質として知られている、multidrug resistance-associated protein (MRP) のフローサイトメトリー分析を行った。すなわち、親株である HeLa 細胞及び Hvr100-6 細胞を、MDR1 または MRP に特異的なモノクローナル抗体 MRK16 または MRPm6 で処理した後、蛍光色素 FITC で標識した二次抗体で処理し、 $1 \times 10^5$  細胞を含む試料の蛍光強度を、フローサイトメトリーにより測定した。同時に、MDR1 の細胞内エピトープに特異的なモノクローナル抗体 JSB-1 についても、同様に処理及び測定を行った。

Hvr100-6 細胞の蛍光ヒストグラムを、親株である HeLa 細胞と比較した結果、MRK16 で処理した場合のみで、蛍光強度の高い方へのシフトが認められ、一方 MRPm6 ではシフトは認められなかった。従って、MDR1 は Hvr100-6 細胞で誘導されており、MRP は誘導されていないことが示唆された。また、JSB-1

についてもシフトが認められなかったことから、Hvr100-6 細胞における MDR1 の発現方向にも異常がないことが示唆された。

## 2. HeLa 細胞及び Hvr100-6 細胞に対する抗癌剤の増殖抑制作用及び抗真菌剤による Hvr100-6 細胞の耐性克服効果

親株である HeLa 細胞、及び、Hvr100-6 細胞に対する、VLB、TXL、DXR、DNR、5-FU の増殖抑制作用については、WST-1 (テトラゾリウム塩) 比色定量分析法により検討した。すなわち、それぞれの細胞を各抗癌剤を含む培養液中で一定期間培養し、WST-1 試薬で処理したのち、波長 450nm における吸光度を測定することにより、生存する細胞数を算出した。また、得られた結果をシグモイド阻害効果モデルにあてはめ、細胞の生存数が、抗癌剤非存在下の生存数の 50% となる抗癌剤濃度 ( $IC_{50}$ ) を算出した。各抗癌剤に対する Hvr100-6 細胞の相対的な耐性は、Hvr100-6 細胞と、親株である HeLa 細胞の  $IC_{50}$  の比として定義した。

その結果、Hvr100-6 細胞の VLB、TXL、DXR、DNR に対する耐性は、それぞれ約 300、4000、50、200 であることが明らかとなった。一方、MDR1 の基質でないことが知られている、5-FU では耐性は認められなかった。

次に、ここで認められた耐性について、抗真菌剤フルコナゾール、イトラコナゾール、ケトコナゾール、ミコナゾール、及びアムホテリシン B による耐性克服効果について検討した。すなわち、抗癌剤を含んだ培養液に、これらの抗真菌剤を添加して、同様に増殖抑制作用を検討した。耐性克服効果の指標として、各抗真菌剤の dose modifying factor (DMF) を算出した。DMF は、Hvr100-6 細胞において得られた、抗真菌剤の非存在下と存在下の  $IC_{50}$  の比とした。

その結果、イトラコナゾール以外の抗真菌剤では、培養液中濃度  $0.1 \mu M$  の場合は、いずれの抗癌剤においても耐性克服効果は認められないことが明らかとなった。一方、イトラコナゾールは、Hvr100-6 細胞において、VLB と TXL に対する耐性を低下させることが示唆された。このイトラコナゾールの耐性克服効果は濃度依存的で、TXL についての DMF は、イトラコナゾール

の培養液中濃度  $0.1$ 、 $0.25$ 、 $0.5 \mu M$  において、それぞれ  $3.2$ 、 $10.1$ 、 $435.7$  であった。なお、抗真菌剤自身の増殖抑制作用は、親株である HeLa 細胞と Hvr100-6 細胞で変わらず、Hvr100-6 細胞でのイトラコナゾールの  $IC_{50}$  は、VLB、TXL に対する耐性克服効果を示した濃度より 10 倍以上高かった。

## 3. HeLa 細胞及び Hvr100-6 細胞における [ $^3H$ ] VLB の細胞内取り込み実験

先の実験で示された、イトラコナゾール共存下で VLB の細胞毒性が変化するメカニズムについて検討するため、HeLa 細胞、及び、Hvr100-6 細胞における、[ $^3H$ ] VLB の細胞内取り込み実験を行った。すなわち、イトラコナゾールを含まない、もしくは、種々の濃度 ( $0.1$ 、 $0.5$ 、 $1$ 、 $10$ 、 $100 \mu M$ ) のイトラコナゾールを含む緩衝液中で、親株である HeLa 細胞及び Hvr100-6 細胞を一定時間プレインキュベーションした後、緩衝液を、イトラコナゾールと  $1 \mu M$  の [ $^3H$ ] VLB を共存させた緩衝液で置換し、経時的に細胞内の放射活性を測定することにより、細胞内の [ $^3H$ ] VLB 蓄積量を測定した。

その結果、Hvr100-6 細胞での [ $^3H$ ] VLB 蓄積量は、HeLa 細胞の約 10 分の 1 であった。また、親株である HeLa 細胞での [ $^3H$ ] VLB 蓄積量は、イトラコナゾール非共存下と共存下で変化はなかったが、Hvr100-6 細胞では共存下で増加し、先の耐性克服効果に関するデータに矛盾しないものであった。

## III. 考察

従来、抗癌剤と抗真菌剤の相乗作用は、抗真菌剤による細胞膜の脂質構成の変化に伴い、抗癌剤及び抗真菌剤の細胞膜透過量が増加することに起因すると考えられてきた。また、ウイルスによる形質変換後の細胞で、抗真菌剤の増殖抑制作用が増加する現象もまた、細胞膜透過量の増加に一因があると言われてきた。

しかし、本研究で樹立した多剤耐性細胞株 Hvr100-6 において、抗真菌剤に対しては、耐性は認められなかった。また、イトラコナゾール以外の抗真菌剤は、今回検討したいずれの抗癌剤においても、耐性克服効果が認められ

なかった。一方、イトラコナゾールについては、Hvr100-6 細胞の VLB、TXL に対する耐性を克服することが示唆され、その作用は濃度依存的で、抗癌剤の細胞内蓄積量の変化により説明できるものであった。

これらのことから、イトラコナゾールの VLB と TXL に対する耐性克服効果は、従来議論されていたような、細胞膜透過性の変化より、むしろ MDR1 を介したものであると考えられた。意外にも、イトラコナゾールは、MDR1 の良く知られた基質である DXR、DNR については、耐性克服効果が認められなかった。この矛盾は、細胞内の MDR1 の発現量が多いためとも考えられる。すなわち、本研究で用いた  $0.1\mu\text{M}$  のイトラコナゾールでは、MDR1 の DXR、DNR を排出する機能を十分阻害していない可能性があり、さらなる検討が必要である。

MDR1 を介した相互作用の見地からの、抗真菌剤の順位付けについては、実験系により相互作用に関するデータが異なるために、これまでの研究報告からは情報が得られなかった。しかし、本研究では、5 つの抗真菌剤を比較し、ヒトにおいて到達し得る血漿中濃度において、イトラコナゾールのみが MDR1 の機能を抑制することが示された。従って、イトラコナゾールが抗真菌剤として投与される際には、MDR1 を介した薬物動態学的相互作用が起こる可能性、もしくは耐性が克服される可能性のあることが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

受付番号	乙 第1881 号	氏 名	飯田 奈美
論文題目	Reversal Effects of Antifungal Drugs on Multidrug Resistance in MDR1-Overexpressing HeLa Cells MDR1過剰発現HeLa細胞を用いた抗真菌剤の多剤耐性克服効果の評価		
審査委員	主 査 奥 村 勝 彦 ( 副 査 黒 田 嘉 和 副 査 石 田 茂 1122		
審査終了日	平成15年 5 月 / 日		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

## 論文審査の結果の要旨

近年、アゾール系抗真菌剤が引き起こす薬物動態学的相互作用が重要視されるようになってきたが、現在のところ、臨床における薬物相互作用の大部分が、薬物代謝酵素チトクローム P450 (CYP) の阻害で説明できるものと考えられている。しかし一方、近年の研究から、薬物輸送担体が薬物代謝酵素とともに薬物体内動態を規定する重要なタンパクであること、薬物輸送担体のうち、元来癌細胞の多剤耐性メカニズムとして注目を集めた、MDR1 (P-糖蛋白質) が最も重要であること、MDR1 と CYP3A4 の基質特異性がかなり重複していること、などが明らかとされている。従って、抗真菌剤が MDR1 を介して薬物相互作用を引き起こすことが推定されるが、はっきりした結論はいまだ得られていない。そこで今回我々は、まず、ヒト子宮頸癌由来の細胞株 HeLa-Ohio (HeLa) を用い、MDR1 を過剰発現した HeLa 由来細胞株 Hvr100-6 を樹立した。次に、これらの細胞株を用い、抗癌剤の増殖抑制作用に対する 5 種類の抗真菌剤の影響を比較評価し、さらには、認められた耐性克服効果について、そのメカニズムを細胞内取り込み実験により検討した。

HeLa 細胞を硫酸ビンプラスチン (VLB) に段階的に暴露することにより、VLB に対する耐性を獲得した細胞株 Hvr100-6 を樹立し、MDR1 の過剰発現を、フローサイトメトリー分析により確認した。次に、HeLa 細胞、及び、Hvr100-6 細胞を用いて、VLB、パクリタキセル (TXL)、塩酸ドキソルビシン (DXR)、塩酸ダウノルビシン (DNR)、5-フルオロウシル (5-FU) の増殖抑制作用について、これらの抗癌剤を培養液中に一定期間共存させた後、測定した生存細胞数を用いて解析し評価した。その上で、抗真菌剤であるフルコナゾール、イトラコナゾール、ケトコナゾール、ミコナゾール、アムホテリシン B を抗癌剤と共存させ、同様の検討を行い、これらの耐性克服効果について評価した。さらに、耐性克服効果の現れるメカニズムについて、イトラコナゾール共存下、

及び、非共存下で [ $^3$ H] VLB の細胞内取り込み実験を行い、検討した。

Hvr100-6 細胞では、VLB、TXL、DXR、DNR に対する耐性が認められた。一方、MDR1 の基質でない、5-FU に対する耐性は認められなかった。また、抗真菌剤の耐性克服効果は、培養液中濃度  $0.1 \mu\text{M}$  では、イトラコナゾール以外では認められなかったが、イトラコナゾールは、VLB と TXL に対する耐性を濃度依存的に低下させた。細胞内取り込み実験の結果、Hvr100-6 細胞における [ $^3$ H] VLB 蓄積量は、HeLa 細胞より少なく、イトラコナゾール共存下で増加したことから、先に認められた耐性克服効果は、抗癌剤の細胞内蓄積量の増加と関連することが示唆された。

MDR1 は正常組織においても発現しており、薬物体内動態と薬物相互作用を規定することが明らかになっている。しかし、抗真菌剤の MDR1 を介した相互作用については、これまでも研究報告は行われてきたものの、薬剤間の比較を行うに十分なデータは未だ得られてこなかった。本研究では、5 つの抗真菌剤を比較することにより、ヒトにおいて到達し得る血漿中濃度においては、イトラコナゾールのみが MDR1 の機能を抑制することが示された。従って、これらの結果は、MDR1 の基質となる薬剤の投与患者や、化学療法中の癌患者に対して、抗真菌剤を選択する際に、有用な知見になると考えられる。

本研究は、多剤輸送担体である MDR1 を過剰発現した細胞を樹立し、種々の抗真菌剤について、MDR1 との相互作用を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった多剤耐性に対する克服効果を明らかにしており、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。