

Fluo-3を用いた、低レベルの抗癌剤多剤耐性細胞の迅速解析と耐性克服剤の検討

著者	小泉 晶一
著者別表示	Koizumi Shoichi
雑誌名	平成5(1993)年度 科学研究費補助金 一般研究(C) 研究成果報告書
巻	1992-1993
ページ	6p.
発行年	1994-03
URL	http://doi.org/10.24517/00051051



Fluo-3 を用いた，低レベルの抗癌剤多剤耐性 細胞の迅速解析と耐性克服剤の検討

研究課題番号 04670582

平成5年度科学研究費補助金（一般研究C）

研究成果報告書

平成6年3月

研究代表者 小 泉 晶 一

（金沢大学医学部助教授）

はしがき

悪性腫瘍の治療中にみられる、腫瘍細胞の多剤耐性機序の一つとして、多剤耐性遺伝子(MDR1)の増幅とその遺伝子産物であるP-糖蛋白の過剰産生が知られている。このP-糖蛋白は細胞膜におけるATP依存性の薬剤排泄ポンプという機能を担い、細胞内の抗癌剤濃度を低下させるが、カルシウム拮抗剤などでその機能がブロックされることから、細胞内のイオン化カルシウム代謝と深くかかわっていると思われる。Fluo-3は従来のものに比べて最もカルシウムに感受性が高い蛍光プローベであるが、多剤耐性細胞内ではほとんど蓄積がみられず、抗癌剤感受性細胞では強く蓄積される。本研究では、著者の研究室で樹立された各種の多剤耐性細胞株を使用し、Fluo-3を用いて、腫瘍細胞の多剤耐性の程度を、P-糖蛋白の機能面から、より鋭敏に測定することを目的とした。P-糖蛋白阻害剤であるベラパミルやセファランチンも使用し、蛍光プローベの細胞内蓄積量の変化をみた。その結果は従来用いられているRhodamine-123(Rh-123)の結果と比較した。本研究によってFluo-3やRh-123を用い、機能面から測定された低レベルのP-糖蛋白依存性多剤耐性の程度と、P-糖蛋白に対する抗体を用いた免疫組織化学的方法や、ウエスタンブロット法、RT-PCR法によるMDR1mRNA検出等の分子生物学的方法によって検出されるMDR1依存性の多剤耐性の程度ととの比較を行なった。

研究組織

研究代表者： 小泉晶一（金沢大学医学部助教授）

研究分担者： なし

研究経費

平成4年度 1100千円

平成5年度 1100千円

計 2200千円

研究発表

(1) 学会誌等

1. Koizumi S.

Rapid and sensitive detection of low-grade multidrug resistance (MDR) in

- leukemic cells using the fluorescent indicator, Fluo-3.
Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 33:481, 1992
2. 小泉晶一
蛍光プローベFluo-3を用いた、低レベル多剤耐性細胞の迅速解析。
Proc. Jpn. Cancer Assoc. (日本癌学会総会記事) 51:418, 1992
 3. 小泉晶一
多剤耐性細胞におけるP-糖蛋白発現と蛍光プローベFluo-3の細胞内蓄積との良い相関性。
Proc. Jpn. Cancer Assoc. (日本癌学会総会記事) 52:638, 1993
 4. 小泉晶一
蛍光プローベFluo-3を用いた多剤耐性細胞の高感度迅速解析。
医学のあゆみ 165:131-132, 1993
 5. Koizumi S, Allegra CJ,
Enzyme studies of methotrexate-resistant human leukemic cell (K562) subclones.
Leukemia Res. 16:565-569, 1992
 6. 小泉晶一、藤本孟男、鶴沢正仁、他
小児急性リンパ性白血病の治療研究：予後良好群における頭蓋放射線照射削除の試み：CCLSG-L874, I874プロトコールの成績。
日小血会誌 6:446-454, 1992
 7. Koizumi S, Fujimoto T,
Improvement in treatment for childhood acute lymphoblastic leukemia: a 10-year study by the Children's Cancer and Leukemia Study Group.
Intern. J. Hematol. 1994 in press
 8. Sato J, Ninomiya T, Koizumi S, et al.
Analysis of growth failure in children treated for acute lymphoblastic leukemia.
Intern. J. Hematol. 56:205-212, 1992
 9. 小西道雄、新井田 要、小泉晶一、他
肺病変を主とし、骨髄、リンパ節などへ広範な浸潤を認めた、原発巣不明の播種性横紋筋肉腫の一例。
小児がん 29:246-249, 1992
 10. Tamaru Y, Miyawaki T, Koizumi S. et al.
Absence of bcl-2 expression by activated CD45RO+ T lymphocytes in acute infectious mononucleosis supporting their susceptibility to programmed

cell death.

Blood 82:521-527, 1993

11. Hasegawa M, Yamashita T, Koizumi S, et al.
Poorly differentiated orbital rhabdomyosarcoma with intracranial extension:
a case report.
Brain Tumor Pathol. 10:113-116, 1993
12. 清水宏之、中館尚也、小泉晶一、他
小児急性前骨髄球性白血病の臨床的特徴と治療成績。
臨床血液 34:989-996, 1993
13. 太田邦雄、寺尾 岳、小泉晶一、他
フローサイトメトリー法による血小板無力症の診断。
小児科臨床 46:2571-1575, 1993
14. 川井 進、藤本孟男、小泉晶一、他
小児急性リンパ性白血病ハイリスク群の治療研究 -CCLSG high risk ALL 874
protocol の治療成績-
臨床血液 34:128-136, 1993
15. Takaue Y, Watanabe A, Koizumi S, et al.
High-dose chemotherapy and blood stem cell autografts for children with
first relapsed acute lymphoblastic leukemia: a pilot study of the
Children's Cancer and Leukemia Study Group of Japan (CCLSG).
Med. Pediatr. Oncol. 1993,
16. 大野一郎、小西道雄、小泉晶一、他
著明な低リン血症を呈した、若年性慢性骨髄性白血病急性転化の一例。
小児科臨床 46:2613-2617, 1993
17. Katayama K, Koizumi S, Yamagami M, et al.
Successful peritransplant therapy in children with active hepatosplenic
candidiasis.
Intern. J. Hematol. 1994, in press
18. Fujimoto T, Hirota T, Koizumi S, et al.
A controlled, dose-comparison study of granisetron for nausea and vomiting
induced by cancer chemotherapy in children.
Am. J. Pediatr. Hematol. Oncol. 1994, in press

(2) 口頭発表 (一部のみ)

1. Koizumi S.
Rapid and sensitive detection of low-grade multidrug resistance in leukemic cells using the fluorescent indicator, fluo-3.
83th Annual Meeting of the American Association of Cancer Research (1992, 5. 20, San Diego, CA)
2. Koizumi S, Fujimoto T. et al.
Efficacy of intermittent methotrexate and 6-mercaptopurine in maintenance chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia: a report from the Japanese Children's Cancer and Leukemia Study Group.
28th Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology (1992, 5. 17, San Diego, CA)
3. 小泉晶一
蛍光プローベFluo-3を用いた、低レベル多剤耐性細胞の迅速解析。
第51回日本癌学会総会 (1992、9、29、大阪)
4. 小泉晶一
多剤耐性細胞におけるP-糖蛋白発現と蛍光プローベFluo-3の細胞内蓄積との良い相関性。
第52回日本癌学会総会 (1992、9、29、仙台)
5. 小泉晶一
蛍光プローベFluo-3を用いた、低レベル多剤耐性細胞の迅速解析。
第55回日本血液学会総会 (1993、4、22、四日市)
6. 小泉晶一、小西道雄、市原 強
Fluo-3とRhodamine-123を用いたフローサイトメトリー法による、多剤耐性細胞におけるP-糖蛋白機能の検討。
第56回日本血液学会総会 (1994、5、13、新潟)
7. Koizumi S.
Flow cytometric analysis of low-grade multidrug resistance using Fluo-3: a comparison with rhodamine-123.
85th Annual Meeting of the American Association of Cancer Research (1992, 4. 11, San Francisco, CA)

研究成果

1. P-糖蛋白のefflux pumpとしての機能性を応用して、多剤耐性細胞の、新しい蛍光プローベFluo-3を用いた機能的解析の可能性を検討し、Rh-123と比較した。薬剤感受性K56

2親株、多剤耐性K562/VCR、K562/ADR細胞、その感受性復元細胞、MTXのみ耐性で非多剤耐性K562/MTX細胞、多剤耐性であるがP-糖蛋白陰性K562/THPADR細胞を使用した。

2. K562/VCRとK562/ADRではFluo-3、Rh-123ともに細胞内蓄積低下と、P-糖蛋白阻害剤であるベラパミルやセファランチン添加によるこれらの蛍光プローベの蓄積増加がみられた。免疫染色とウエスタンブロット法ではP-糖蛋白発現増幅のないK562親株、K562/THPADR、K562/MTX細胞でもベラパミルやセファランチン添加によってFluo-3の排泄遅延が認められたが、Rh-123では排泄に差がみられなかった。RT-PCR法によるとMDR1mRNA発現はP-糖蛋白陰性の細胞も含めてすべての細胞でみられたことより、Rh-123はP-糖蛋白発現をより明確に表現したが、Fluo-3はMDR1mRNAを発現する低レベルの多剤耐性細胞の検出に有用かもしれないと思われた。
3. Fluo-3とP-糖蛋白の相関関係をさらにより深く検討するため、RT-PCR法でもMDR1mRNA発現がほとんど検出できない細胞株をK562親株より限界希釈法で樹立した(K562/NC16)。K562/NC16細胞においても、Fluo-3の排泄はベラパミルやセファランチン添加で遅延した。Rh-123は変化しなかった。以上より、Fluo-3の細胞内蓄積量はP-糖蛋白のみならず、他の膜輸送蛋白が関与している可能性が示唆された。
4. 臨床の白血病細胞の検討では、31例中13例がMDR1mRNA陽性、P-糖蛋白陰性で、これらの例ではFluo-3の細胞内蓄積は多剤耐性パターンをとった。低レベルのMDR1mRNA発現が白血病の予後因子として重要であるか否か、現在検討が進められている。
以下、論文の別刷をもって研究成果の報告に代える。