グリオーマにおける多剤耐性関連蛋白の発現

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 毛利, 正直 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9276

グリオーマにおける多剤耐性関連蛋白の発現

金沢大学医学部医学科脳神経外科学講座（主任：山下純宏教授）
毛　利　正　直

グリオーマの化学療法の効果を規定する因子として薬剤耐性は重要であり，現在までにさまざまな薬剤耐性関連蛋白が同定されている．また，腫瘍細胞にみられる多剤耐性機構のなかでP糖蛋白の関与しない多剤耐性細胞には，多剤耐性関連蛋白 (multidrug resistance-associated protein, MRP) が発現して耐性を担っていることが知られている．本研究では，グリオーマの薬剤耐性におけるMRPの役割を知るために，手術標本とヒトグリオーマ細胞株におけるその発現と薬剤感受性の関係について検索した．対象は，手術時に採取されたグリオーマ組織20例（膠芽腫11例，退形成星状細胞腫6例，星状細胞腫3例），正常脳組織3例およびヒトグリオーマ細胞株4種類 (U87MG, U251MG, U373MG, T98G) を用いた．手術標本では，MRP mRNAの発現と蛋白レベルの局在を逆転写 (reverse transcriptition, RT)-PCRと免疫組織化学を用いて観察した．その結果，MRP mRNAの発現は膠芽腫11例中9例，退形成星状細胞腫6例中3例にみられ，免疫組織化学的にはMRPは膠芽腫11例中9例，退形成星状細胞腫6例中3例に陽性であり腫瘍細胞の細胞質内に顆粒状に発現していた．星状細胞腫および正常脳組織においては陽性所見はみられなかった．腫瘍の悪性度に伴いMRP陽性腫瘍細胞数が増加する傾向がみられた．細胞株では，MRPのmRNAと蛋白の発現量をそれぞれ定量的RT-PCRとウエスタンブロット法を用いて半定量化した．すべての細胞株においてMRPのmRNAと蛋白の発現がみられた．細胞株間のMRPのmRNAおよび蛋白の発現量はいずれの方法においてもU87MGでの発現が最も少なく，ついでU251MG, U373MG, T98Gの順に発現量は増加していた．T98GのMRPのmRNAと蛋白の発現量はともにU87MGの発現量の約4.5倍であった．4種類の薬剤［アドリアマイシン (adriamycin, ADM)，VP-16 (エトポシド)，シスプラチン (cis-diamminedichloroplatinum, CDDP)，ニムスチン[nimustine, 1-(4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl)methyl-3-(2-chloroethyl)-3-nitrosourea, ACNU]］に対する薬剤感受性試験では，いずれの薬剤に対してもU87MGの50％増殖抑制濃度 (50% inhibitory concentration of cell growth, IC_{50}) が最も低かった．T98Gは耐性度が最も高くU87MGに比べてADMに対して28倍，VP-16に49倍，CDDPに8.3倍，ACNUに17倍の相対耐性度を有していた．ADM，VP-16とCDDPに対する薬剤耐性度は，U87MG, U251MG, U373MG, T98Gの順に増加しており各細胞株間のMRPのmRNAおよび蛋白の発現量とよく相関していた．しかし，ACNUに対する薬剤耐性度とMRPの発現量の間には明らかな関連性は認められなかった．MRPの発現量が最も多いT98Gを使用してMRPに特異的なアンチセンスオリゴヌクレオチドを投与し，MRPの発現抑制に伴う薬剤感受性の変化をアンチセンスオリゴ法にて検討した．アンチセンスオリゴヌクレオチド投与によるMRP蛋白の発現量はコントロールの発現量に比して約25％に減少していた．アンチセンスオリゴヌクレオチド投与後のADM，VP-16とCDDPに対するIC_{50}値はコントロールのIC_{50}値に比して有意に低下しており，それぞれの薬剤に対する感受性はコントロールに比して6.2倍，6.6倍，4.3倍に増加していた．ACNUに対する感受性には変化はみられなかった．以上の結果から，グリオーマ組織におけるMRPの発現はその悪性度と薬剤自然耐性に関連しているものと推定された．一方，ヒトグリオーマ細胞株においてはMRPが多剤耐性に関与していることが示唆された．

Key words multidrug resistance-associated protein, glioma, chemotherapy, antisence oligonucleotide

グリオーマは，原発性悪性脳腫瘍であり浸潤性に発育するため外科的治療による全摘出は困難であり，放射線療法，化学療法および免疫療法の併用による集学的治療が行われている．しかし，これらの治療に対する反応性が低いため現在の治療成績は必ずしも満足できるレベルに達していない．中でもグリオーマの化学療法剤に対する感受性はきわめて低く，血液脳関門の存在による薬剤到達性の問題[1]や腫瘍細胞自身が薬剤耐性を有していることが臨床上の大きな問題点となっている．

薬剤耐性に関与する機序として腫瘍細胞のP糖蛋白の発現が知られているが，P糖蛋白はATPをエネルギー源として薬剤を細胞外に排出して耐性を獲得していることが知られている[2)3)]．現在までにグリオーマにおけるP糖蛋白の発現については一部

平成9年11月12日受付，平成10年1月16日受理

Abbreviations：ACNU, 1-(4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl) methyl-3-(2-chloroethyl)-3-nitrosourea; ADM, adriamycin; bp, base pairs; CDDP, cis-diamminedichloroplatinum; FBS, fetal bovine serum; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; IC_{50}, 50% inhibitory concentration of cell growth; MDR1, multidrug resistance 1; MRP,

の腫瘍細胞および腫瘍と正常の境界に存在する血管内皮に陽性であるという報告がある[4)5)]．しかしながら，P糖蛋白は腫瘍内の血管内皮には発現を認めないことやP糖蛋白陽性腫瘍細胞の割合が少ないことよりグリオーマにおける薬剤耐性には他の耐性因子の存在が考えられる．グリオーマにおけるその他の薬剤耐性因子として，細胞内での薬剤不活性化物質として作用し薬剤耐性に関与しているメタロチオネイン[6)]やグルタチオンS-トランスフェラーゼ[7)]の発現，薬剤の標的物質であるトポイソメラーゼの遺伝子変化や遺伝子増幅によるトポイソメラーゼ阻害剤に対する耐性[8)]，DNA修復酵素であるO^6-メチルグアニン-DNAメチルトランスフェファーゼ活性の上昇に伴うアルキル化剤耐性[9)]などが報告されており様々な方面から研究が進められている．

最近，P糖蛋白が関与していない多剤耐性細胞株の細胞膜や小胞体膜に分子量190kDaの膜蛋白が発現していることが報告され多剤耐性関連蛋白 (multidrug resistance-associated protein, MRP) と命名された[10)]．MRPはP糖蛋白と同じATP結合膜輸送蛋白のスーパーファミリーに属するがMRPのアミノ酸配列はP糖蛋白のアミノ酸配列と相同性は低く，正常組織における分布も異なっていることが知られている．MRPは比較的新しくその存在が知られるようになった蛋白で様々な細胞株や臨床材料でのMRPの発現と薬剤耐性への関与の研究[11)12)]が進められているが，グリオーマにおけるその発現や薬剤耐性に関する機序は十分解明されていない．そこで本研究では，グリオーマ組織標本におけるMRPの発現を逆転写 (reverse transcription, RT)-PCR と免疫組織化学的手法を用いて検索した．また，MRPの発現とその薬剤耐性への関与を検討するためにMRPに特異的なアンチセンスオリゴヌクレオチド投与によるMRP発現抑制とそれに伴う薬剤感受性の変化をヒトグリオーマ細胞株を用いて検索した．

材料および方法

Ⅰ．材料

1996年から1997年までの間に手術標本が採取された20例のグリオーマを用いた．その病理組織学的分類については，世界保健機構 (World Health Organization) 脳腫瘍分類に従った[13)]．内訳は膠芽腫 (glioblastoma, grade Ⅳ) 11例，退形成星状細胞腫 (anaplastic astrocytoma, grade Ⅲ) 6例，星状細胞腫 (astrocytoma, grade Ⅱ) 3例であった．対照としては，3例の脳腫瘍以外の手術で得られた正常脳組織を用いた．RNAと蛋白の抽出用標本は手術摘出後速やかに液体窒素で凍結し，−135℃で保存した．免疫組織化学用には，4％パラホルムアルデヒドにて標本を固定後パラフィンにて包埋した．ヒトグリオーマ由来の細胞株としてU87MG, U251MG, U373MG, T98Gの4種類を使用した．各細胞株の培養には，10％牛胎児血清 (fetal bovine serum, FBS) (Gibco, Grand Isrand, USA)，0.3 mg/mlグルタミン (日水製薬，東京)，100 U/mlペニシリン (和光純薬，大阪)，100 mg/mlストレプトマイシン (和光純薬) を含んだRPMI 1640 (日水製薬) 培地にて湿潤37℃，5％CO_2の条件下で培養した．

Ⅱ．手術摘出標本における実験

1．RT-PCR

1) PCR用プライマー

ヒトMRPの塩基配列[10)14)15)]より，MRPに特異的なセンスプライマーとして5'-AGAACCTCAGTGTCGGGCAGCG-3' (4479-4499)，アンチセンスプライマーとして5'-TCGCATCTCTGTCTCTCCTGGG-3' (4985-5005)を設計し，合成は日本バイオサービス (埼玉) に依託した．内部コントロールにはグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) を用い，プライマーとしては既製品 (Stratagene, La Jolla, USA) を使用した．その塩基配列は，センスプライマーは5'-CCACCCATGGCAAATTCCATGGCA-3'(213-236)，アンチセンスプライマーは5'-TCTAGACGGCAGGTCAGGTCCACC-3' (787-810)であった．

2) 総RNAの分離とRT-PCR

総RNAの抽出精製は，Chomczynskiら[16)]の方法に基づいて，Isogen (ニッポンジーン，東京) を用いた．RT-PCR反応は，RNA PCR キット (Perkin-Elmer, Branchburg, USA) を用いた．すなわち，0.6 μgの総RNAを鋳型とし,ランダムヘキサマーをプライマーとして逆転写酵素にてcDNAを合成した．次に各mRNAに特異的なプライマーを用いて，TaqポリメラーゼにてcDNA断片の増幅を行った．PCR反応にはDNA Thermal Cycler 480 (Perkin-Elmer) を使用した．反応は，94℃で3分間の熱変性後，94℃で1分間，60℃で1分間，72℃で1分間の3ステップを1サイクルとして30回増幅した．増幅後のPCR反応産物は2％アガロースゲルにて電気泳動し，エチジウムブロマイドにて染色後，紫外線照射装置Fas-Ⅱ (Toyobo，大阪) を用いて検出した．

2．免疫組織化学

4％パラホルムアルデヒドで固定後，パラフィンに包埋した標本より厚さ4 mmの切片を作製し，ポリ-Lリジン (和光純薬) 処理スライドグラス上に張り付け乾燥させた．キシレンを用いて脱パラフィンし，リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline, PBS) で洗浄後，マイクロウェーブ処理を行った．0.3％過酸化水素加メタノールで内因性ペルオキシダーゼを失活させ，PBSで洗浄後，非特異的反応抑制のため，ブロッキング抗体 (正常ウサギ血清) を室温で20分間作用させた．次に，一次抗体として40倍に希釈したラット抗ヒトMRPモノクローナル抗体 MRPr1[17)] (ニチレイ，東京) を室温で1時間反応させた後，二次抗体のビオチン化ウサギ抗ラットIgG抗体 (Vector Lavoratories Inc., Burlingame, USA) を室温で30分反応させた．アビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合体 (avidine-biotin-peroxidase complex) 法と0.005％過酸化水素加0.02％ジアミノベンチジン(3-3'-diaminobenzidine) (Sigma, St.Louis, USA) 処理により発色させ，ヘマトキシリンで核染色を行った．

Ⅲ．ヒトグリオーマ細胞株における実験

1．定量的RT-PCR

MRP mRNAの細胞株における発現を定量化するため定量的RT-PCRを行った．前述と同様のプライマーを用いてMRPとGAPDHについて反応サイクル数が20～36回のRT-PCRを行い，検定曲線を作成した[18)19)]．増幅後のPCR反応産物は2％ア

---

multidrug resistance-associated protein; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; PBS,phosphate-buffered saline; RT,reverse transcription

ガロースゲルにて電気泳動し，エチジウムブロマイドにて染色後，紫外線照射装置Fas-Ⅱ (Toyobo) を用いて検出した．MRP mRNAの定量の際には，アガロースゲル上のPCR反応産物を，画像解析ソフト (Quantity One, Proteinbases Inc., Hungtington, USA) にて測定し，内部コントロールのGAPDHに対するMRPの比で半定量化した．

2. ウエスタンブロット

各細胞株の細胞数を2.5×10^5個にそれぞれ調節し，PBS (pH7.4) で洗浄後，5% 2-メルカプトエタノールを含むSDS緩衝液500 μlで溶解後に，音波処理し，緩衝液内で3分間温浴させた．電気泳動はLaemmli[20]のSDS-PAGE法により行った．アクリルアミドゲルの濃度は7.5%とし各試料10 μlを泳動した．電気泳動終了後アクリルアミドゲル上に分離された蛋白をニトロセルロース膜 (Clear Blot Membrane-P, アトー，東京) に転写し，0.1%ツィーン20と1%牛血清アルブミンを含んだトリス塩酸緩衝液でブロッキングを行った後，40倍に希釈したラット抗ヒトMRPモノクローナル抗体MRPr1を4時間反応させた．その後，アルカリホスファターゼ標識抗ラットIgG抗体と1時間反応させ，アルカリホスファターゼ基質キット (Vector Laboratories Inc.) を用いて発色を行った．得られたバンドを画像解析ソフト (Quantity One) にて測定し，MRP蛋白発現量を半定量化した．

3. 各細胞株の薬剤感受性

1) 使用した薬剤

薬剤感受性試験には，アドリアマイシン (adriamycin, ADM) (協和発酵，東京)，VP-16 (エトポジド) (ブリストル・マイヤーズスクイブ，東京)，シスプラチン (cis-diamminedichloroplatinum, CDDP) (ブリストル・マイヤーズスクイブ)，ニムスチン［nimustine, 1-(4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl)methyl-3-(2-chloroethyl)-3-nitrosourea, ACNU］(三共，東京) を用いた．

2) 薬剤感受性試験

細胞株の各種薬剤に対する感受性はMosmann[21]の方法に若干の変更を加えた以下の方法により行った．対数増殖期にある細胞をトリプシン-EDTA処理後，2×10^4/mlに調整し，この細胞浮遊液を96穴平底プレートに各穴180 μlずつ蒔き，同時に各種薬剤の希釈系列を加えた系と薬剤を加えないコントロールを，湿潤37℃，5%CO_2存在下で72時間培養した．培養後PBSに溶解し2 mg/mlとした3-［4,5-ジメチルチアゾール-2-yl］-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド (3-［4,5-dimethylthiazol-2-yl］-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, MTT) (Sigma) 溶液を各穴に25 μlずつ加えて4時間培養し，上清を吸引し，ジメチルスルフォキシド (dimethyl sulfoxide) を各穴200 μlずつ加えてプレート振盪器で5分間振盪した．各穴の吸光度を自動吸光度計モデル550マイクロプレートリーダー (Bio-Rad, California, USA) を用いて測定波長540nm，対象波長630nmで測定した．薬剤を含まないものの吸光度をコントロールとして，各種薬剤の希釈系列を加えた系の吸光度をコントロールに対するパーセンテージで表し，生存率 (%) とした．1回の実験は2穴の吸光度の平均値をもってその実験における生存率の値とした．コントロールの吸光度を100%として細胞生存率曲線を描き，幾何学的に50%増殖抑制濃度 (50% inhibitory concentration of cell growth, IC_{50}) を求め薬剤感受性の指標とした．感受性試験はすべて3回行ない，それぞれの試験ごとに求めたIC_{50}値の算術平均を各細胞株の各薬剤に対するIC_{50}とし各細胞株間で比較検討した．各細胞株間の薬剤耐性度の指標として，各細胞株のIC_{50}値を最も耐性度の低い細胞株のIC_{50}値で除した値で相対耐性度 (relative resistance) を求めた．

4. アンチセンスオリゴ法

1) アンチセンスおよびセンスオリゴヌクレオチド

ヒトMRP mRNAの開始コドンを含む5'領域に相補的な20塩基対 (base pairs, bp) のフォスフォロチオエート型アンチセンスオリゴヌクレオチドとして5'-AGCCCCGGAGCGCCATGCCG-3'および対照となるセンスオリゴヌクレオチドとして5'-CGGCATGGCGCTCCGGGGCT-3'を設計した[10)14)22)]．合成は東亜合成 (東京) に依託した．

2) アンチセンスオリゴヌクレオチド投与後のMRP蛋白の発現量の測定と薬剤感受性試験

T98GのMRPの発現抑制による薬剤感受性に対する影響をアンチセンスオリゴ法で検討した[22)23)]．オリゴヌクレオチドの濃度は0.25 μMとしオリゴヌクレオチドの導入効率を上げるため正電荷リポソームのリポフェクチン (5 μg/ml, Gibco) を使用した．アンチセンスオリゴヌクレオチドのMRPの抑制効果はMRPの蛋白レベルでの発現量で確かめた．すなわち2×10^4/mlに調整したT98Gを直径10 cmの培養シャーレに10 mlずつ分注し10%FBS加RPMI 1640培地で24時間培養し，無血清培地にて2回洗浄後アンチセンスオリゴヌクレオチドとリポフェクチ

Table 1. RT-PCR and IHC[a)] for MRP in surgical specimens

	Patient no.	Age	Sex	MRP	
				RT-PCR	IHC
Glioblastoma					
	1	17	M	−	−
	2	45	M	+	+
	3	48	M	+	+
	4	59	M	+	+
	5	64	F	+	+
	6	64	F	+	+
	7	67	F	+	+
	8	72	M	+	+
	9	73	M	+	+
	10	73	F	+	+
	11	78	F	−	−
Anaplastic astrocytoma					
	12	35	F	−	−
	13	67	F	+	+
	14	73	M	−	−
	15	73	F	+	+
	16	78	F	+	+
	17	73	F	−	−
Astrocytoma					
	18	35	M	−	−
	19	38	M	−	−
	20	42	M	−	−
Control brain					
	21	16	F	−	−
	22	38	F	−	−
	23	55	F	−	−

M, male; F, female; +, positive; −, negative.
[a)]IHC, immunohistochemistry.

ンを混合した無血清培地中で3時間培養した．その後10％FBS加RPMI 1640培地にて1回洗浄後10％FBS加RPMI 1640培地で48時間培養後，再び同様の処理を行った．2度目の処理の24時間後，細胞を1.25×10^6個に調節しSDS緩衝液250 μlで溶解後，それ以降の処理は前述の方法にしたがい，ウエスタンブロットを行い発現量を半定量化した．コントロールとして，0.25 μMのセンスオリゴヌクレオチドと5 μg/mlのリポフェクチンを混合して同様に処理したものと無血清培地のみを加えたものを用い，MRP蛋白の発現量を半定量化し比較検討した．MRP発現抑制における薬剤感受性への影響は次のように行った．すなわち96穴平底プレートに2×10^4/mlに調整した細胞浮遊液を各穴200 μlずつ蒔き，10％FBS加RPMI 1640培地で24時間培養後，無血清培地にて2回洗浄後0.25 μMのアンチセンスオリゴヌクレオチドと5 μg/mlのリポフェクチンを混合した培地中で3時間培養した．その後10％FBS加RPMI 1640培地にて1回洗浄後48時間同培地で培養し再び同様のアンチセンスヌクレオチドの処理を行った．その後，薬剤の希釈系列を加えた系と薬剤を加えない系で48時間培養し，ついでMTT溶液を用いてIC_{50}値を求めた．

5. 統計学的処理

統計学的有意差は，F検定による等分散の検定を行い，分散が等しいときにはStudent'sのt検定を，等しくない時にはWeich'sのt検定を行った．危険率5％未満をもって有意差有りと判定した．

成　　績

Ⅰ．手術摘出標本

1. RT-PCR (表1)

MRPとGAPDHのcDNAはそれぞれ527bpと600bpのバンドとして検出された．MRP mRNAの発現はグリオーマの20例中12例にみられた．病理組織別では，膠芽腫では11例中9例に，退形成星状細胞腫では6例中3例にみられたが，星状細胞腫には発現はみられなかった．また，正常脳組織では，MRP mRNAの発現はみられなかった (図1)．

2. 免疫組織化学 (表1)

グリオーマにおけるMRPの発現は腫瘍細胞の細胞質に顆粒状に陽性シグナルとしてみられた．グリオーマの組織別では，膠芽腫では11例中9例，退形成星状細胞腫では6例中3例に陽性であったが，星状細胞腫には発現はみられなかった (図2)．また，正常脳組織では，MRPの発現はみられなかった．

Ⅱ．ヒトグリオーマ細胞株

1. 定量的RT-PCR

各細胞株間でのMRPのmRNAレベルでの発現量を定量的RT-PCR法で測定した．横軸にサイクル数，縦軸には増幅産物のシグナル強度をプロットした検定曲線では，527bpのMRP cDNA断片の増幅は20サイクルから30サイクルまでは直線的に進行したがそれ以降は平坦化した (図3-A)．従って，MRPのRT-PCRは，定量性を持つと考えられる増幅サイクル数26回の条件で行った．補正比較の方法として，GAPDHを内部コントロールとして用いた．対照のGAPDHについても同様な検定曲線を作成し，増幅サイクル数24回の条件でコントロール反応のRT-PCRを行った．MRP mRNAの発現量はU87MGが最も少なく，ついでU251MG, U373MG, T98Gの順に多く発現しており，T98Gの発現量はU87MGの発現量の約4.5倍であった (図3-B)．

2. ウエスタンブロット (図4)

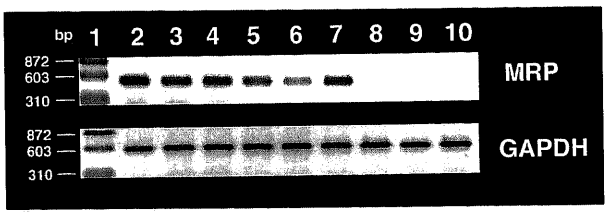

Fig.1. Reverse transcriptition-PCR (RT-PCR) analysis of mRNA for multidrug resistance-associated protein (MRP) in human gliomas and control brain.cDNA was synthesized from 0.6 μg of total RNA. Expression of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was also studied as an internal control. MRP and GAPDH were subjected to 30 cycles of PCR, and the products were resolved on 2% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining. Lane 1, marker; lane 2-5, glioblastomas; lane 6-7, anaplastic astrocytomas; lane 8-9, astrocytomas; lane 10, control brain.

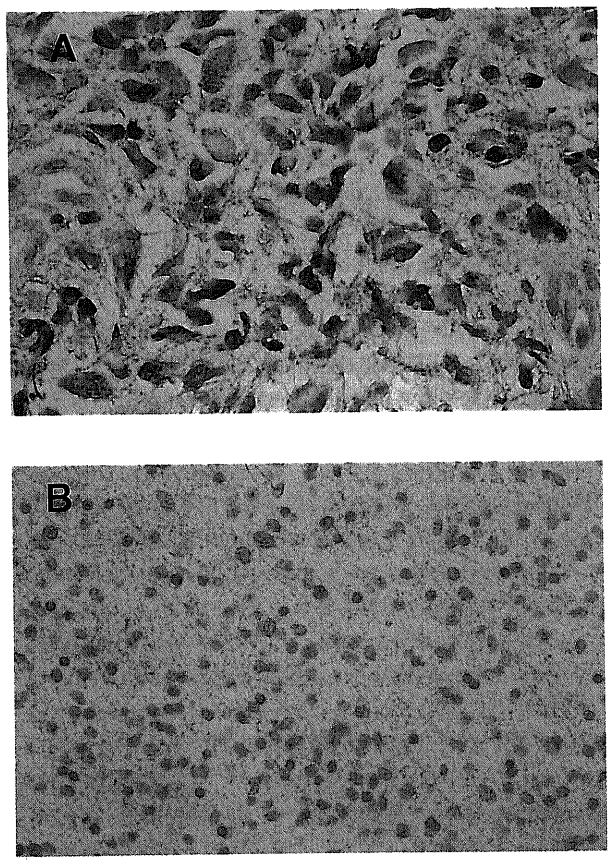

Fig.2. Immunohistochemical staining for multidrug resistance-associated protein (MRP) in the human gliomas. MRP was reacted with rat monoclonal antibody MRPr1 using biotinylated anti-rat IgG and avitdin-biotin-peroxidase complex, and was counterstained with hematoxylin. (A) Glioblastoma. (B) Astrocytoma. (A), ×200 ; (B), ×150.

MRP蛋白は，190kDaのバンドとして検出され，すべての細胞株において発現がみられた．その発現量はU87MGが最も少なく，ついでU251MG, U373MG, T98Gの順に多く発現しており，T98Gの発現量はU87MGの発現量の約4.4倍であった．

3．薬剤感受性試験 (図5)

各種薬剤に対する細胞株の感受性をIC_{50}値で表した (表2)．

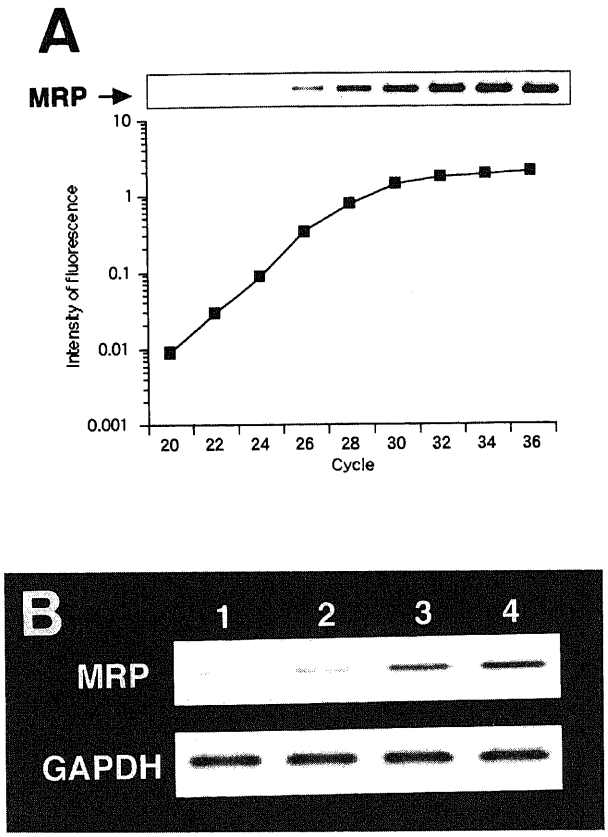

Fig. 3. Quantitative RT-PCR analysis of MRP mRNA in glioma cell lines. PCR was performed for 20 to 36 cycles at 2-cycle interval in U251MG cells, the intensities of the products were measured(A). MRP was subjected to 26 cycles of PCR. GAPDH as an internal control was subjected to 24 cycles of PCR(B). Lane 1, U87MG; lane 2, U251MG; lane 3, U373MG; lane 4, T98G. The relative amount of MRP mRNA were analyzed by quantitative RT-PCR method and standardized by the amount of GAPDH mRNA.

いずれの薬剤に対してもU87MGのIC_{50}値が最も低く，他の細胞株のIC_{50}値をU87MGのIC_{50}値で除してU87MGに対する相対耐性度をそれぞれ求めた．いずれの薬剤に対してもT98Gは耐性度が最も高くADMに対して28倍，VP-16に49倍，CDDPに8.3倍，ACNUに17倍の相対耐性度を有していた．ADM, VP-16, CDDPの3種類の薬剤に関しては、U87MG, U251MG, U373MG, T98Gの順に耐性度が高くなっていた．ACNUの感受性はU87MG, U373MG, U251MG, T98Gの順に耐性度が高くなっていた．

4．アンチセンスオリゴ法

1) MRP蛋白の発現量の変化

アンチセンス及びセンスオリゴヌクレオチドをT98Gに投与し，MRP蛋白の発現量の変化をウエスタンブロット法を行い検討した．それぞれのオリゴヌクレオチドの濃度は0.5 μM以上の濃度では細胞毒性が強いため0.25 μMとした．その結果アンチセンスオリゴヌクレオチド投与によりMRP蛋白発現量はセンスオリゴヌクレオチド投与時の約25％に抑制された (図6)．センスオリゴヌクレオチドの投与ではMRP蛋白の発現量は抑制されず，オリゴヌクレオチド非投与の無血清培地での発現量と同等であった．

2) アンチセンスオリゴヌクレオチド投与による薬剤感受性の変化 (図7)

アンチセンスオリゴヌクレオチド投与後のT98Gにおける薬剤感受性の変化をMTT溶液を用いた方法で検討した．アンチセンスオリゴヌクレオチド投与後のADM, VP-16, CDDPに対するIC_{50}値はセンスオリゴヌクレオチド投与後のIC_{50}値に比して有意に低下しており，それぞれの薬剤に対する感受性は6.2倍，6.6倍，4.3倍に増加していた (表3)．しかし，アンチセンスオ

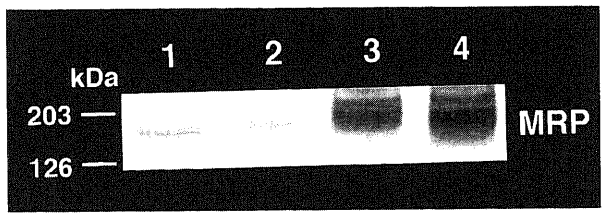

Fig.4. Western blot analysis of MRP in glioma cell lines. Cell lysates were loaded on 7.5% polyacrylamide gel, transferred onto nitrocellulose membrane, and were detected by rat monoclonal antibody against MRP. Lane 1,U87MG; lane 2, U251MG; lane 3, U373MG; lane 4, T98G.

Table 2. Sensitivity of human glioma cell lines to four anticancer agents

Drugs	U87MG	U251MG		U373MG		T98G	
	IC_{50} [a] (μM)	IC_{50} (μM)	RR [c]	IC_{50} (μM)	RR	IC_{50} (μM)	RR
ADM	0.036±0.0028 [b]	0.064±0.0098	1.8	0.93±0.19	26	1.0±0.10	28
VP-16	0.85±0.10	6.7±2.2	7.9	26±7.1	31	42±3.9	49
CDDP	1.2±0.22	2.2±0.66	1.8	4.7±0.25	3.9	10±1.5	8.3
ACNU	45±7.1	490±12	1.1	290±58	6.5	750±34	17

a) IC_{50}, 50% inhibitory concentration of cell growth.
b) Each value is $\bar{x}$±SD of three experiments.
c) RR (relative resistance) means IC_{50} of other cells/IC_{50} of U87MG cells.

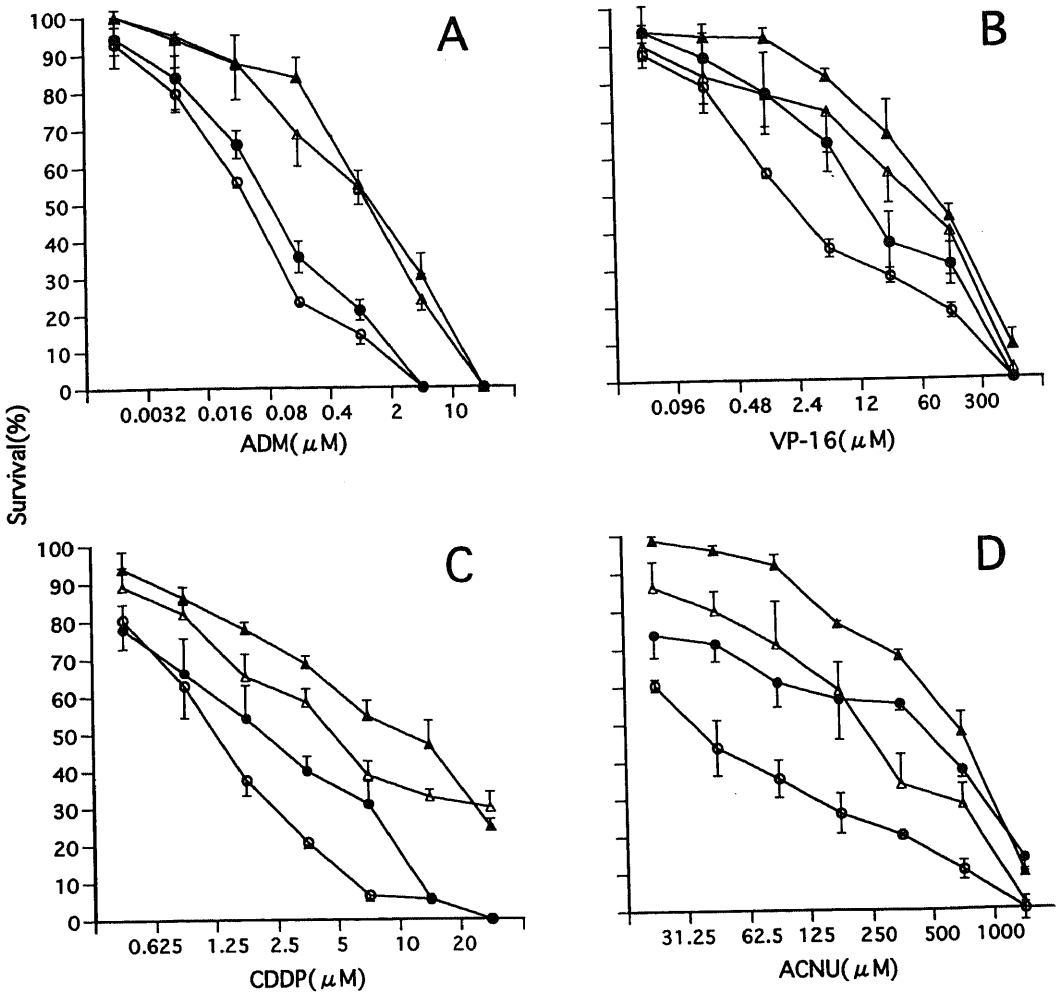

Fig.5. Growth inhibition curve of glioma cell lines to ADM (A), VP-16 (B), CDDP (C) and ACNU (D). Surviving fractions were determined by MTT assay as described in Materials and Methods. ○, U87MG; ●, U251MG; △ U373MG; ▲, T98G.

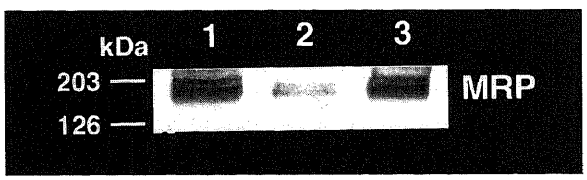

Fig.6. Effect of antisense oligonucleotide treatment on MRP protein level in T98G cells (Western blot analysis). T98G cells were treated twice with antisense or sense oligonucleotide complexed with lipofectin for a period of 3 hr with an interval of 48 hr between exposures. Protein was isolated and the levels of MRP protein were quantitated 24 hr after the second treatment. Lane 1, serum free condition without oligonucleotide treatment; lane 2, antisense oligonucleotide treatment; lane 3, sense oligonucleotide treatment.

Table 3. Effect of antisense treatment on T98G cells

Drugs	IC_{50} [a] (μM)	
	Antisense	Sense
ADM	0.34±0.10*	2.1±0.60[b]
VP-16	9.3±4.9*	61±10
CDDP	4.2±1.9*	18±5.6
ACNU	850±160	920±180

a) IC_{50}, 50% inhibitory concentration of cell growth.
b) Each value is $\bar{x}$±SD of three experiments.
*P<0.05 as compared to IC_{50} of sense.

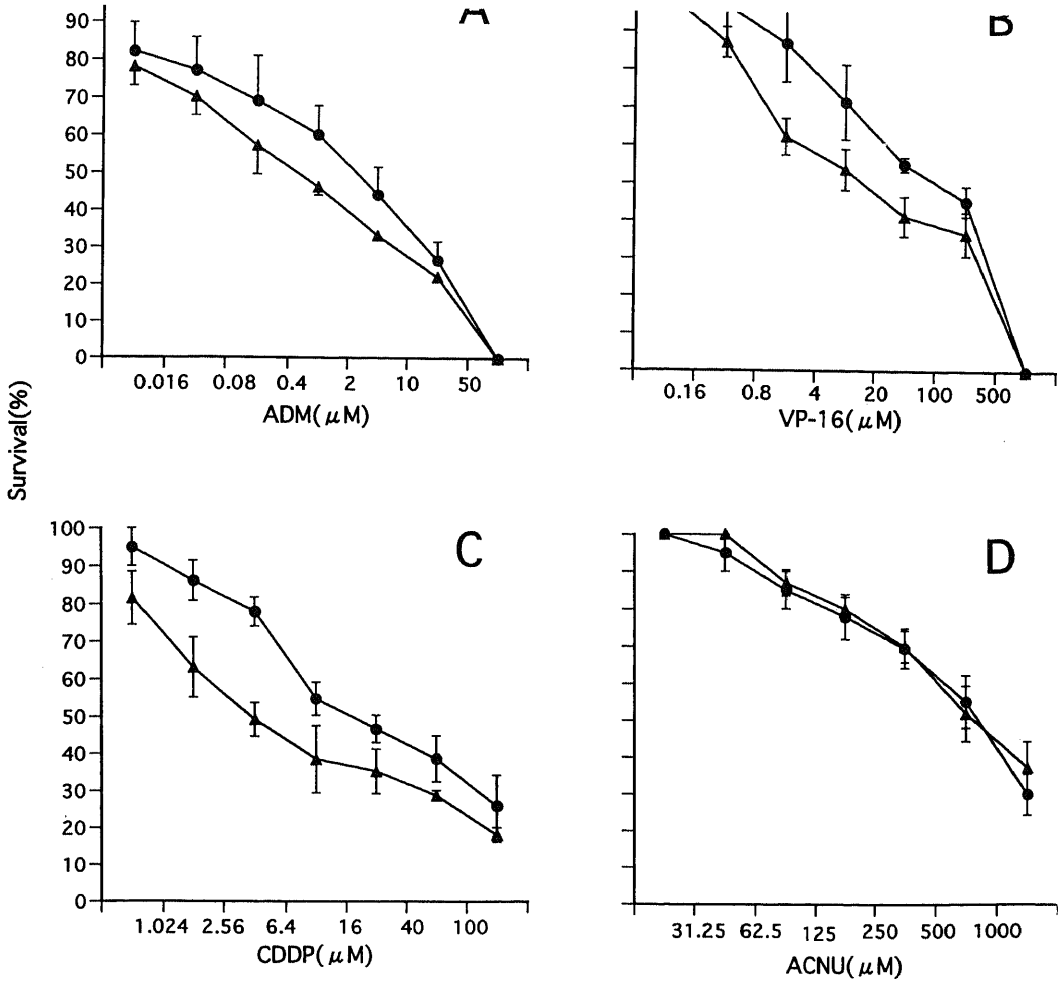

Fig.7. Effect of antisense oligonucleotide treatment on the sensitivity of T98G cells to ADM (A), VP-16 (B), CDDP (C) and ACNU (D). T98G cells were treated twice with antisense or sense oligonucleotide complexed with lipofectin for a period of 3 hr with an interval of 48 hr between exposures and growth inhibition were measured by MTT assay as descrived in Materials and Methods. ▲, antisense oligonucleotide treatment; ●, sense oligonucleotide treatment.

リゴヌクレオチド投与においても，ACNUの耐性度には有意な変化はみられなかった．

考　　察

腫瘍細胞の薬剤耐性に関する様々な分子機構として，細胞膜の変化により細胞外への薬剤の排出亢進によるものとしてP糖蛋白の発現[3]，薬剤の標的が変化し，薬剤の阻害効果を逃れる機構としてトポイソメラーゼ阻害剤に対する耐性機構[24]，細胞内に移行した薬剤を不活化する解毒機構としてメタロチオネイン[25]やグルタチオンS-トランスフェラーゼ[26]の発現，メトトレキセートの標的酵素であるジヒドロ葉酸還元酵素の遺伝子増幅によるメトトレキセート耐性[27]，アルキル化剤によるDNA損傷を修復するO^6-メチルグアニン-DNAメチルトランスフェラーゼ活性の上昇によるアルキル化剤耐性[28]などが知られている．

多剤耐性の原因となっている蛋白として発見されたP糖蛋白は構造に類似性のない薬剤と直接結合し，ATP加水分解のエネルギーを用いて細胞外へ薬剤を能動輸送し細胞の薬剤耐性獲得に関与することが知られている[3]．このP糖蛋白は主に細胞膜に発現し，多剤耐性遺伝子 (multidrug resistance 1, MDR1) によりコードされることが明らかになっている[29]．臨床的には免疫組織化学的にP糖蛋白の検索やRT-PCR法を用いたMDR1 mRNAの検索などが行われており，血液腫瘍や固形腫瘍でその発現や臨床における薬剤耐性との関係が報告されている[30]．中枢神経系においては脳の毛細血管内皮細胞に特異的に発現していることが知られている[31]．また，グリオーマにおいてはP糖蛋白が腫瘍細胞膜自身に発現しているとの報告[4]や腫瘍と正常の境界の毛細血管内皮の発現の報告[5]がある．これらのことから，P糖蛋白がグリオーマの薬剤耐性の一因となっていることが示唆されているが，P糖蛋白の発現している腫瘍細胞の割合が少ないことや腫瘍内の血管内皮には発現がみられないことからグリオーマには他の耐性機構が存在していることが考えられる．そこで，本研究ではP糖蛋白の関与しない多剤耐性細胞より見つけられたMRPに着目してグリオーマにおける薬剤耐性に対するMRPの役割を検討した．

MRPはP糖蛋白の関与しない多剤耐性蛋白の1つとして，Coleら[10]によりヒト肺小細胞癌のADM耐性細胞株よりそのcDNAが分離された．MRPもP糖蛋白と同様にATP結合カセッ

トスーパーファミリーの一員であるが，P糖蛋白とは異なり抗癌剤や耐性克服剤とは直接結合せず，その細胞内局在は細胞膜よりもむしろ小胞体に存在することが明らかになっている[32]．また，MRPのアミノ酸配列はP糖蛋白のアミノ酸配列と相同性は低く，正常組織における分布も異なっていることが知られている[10]．Grantら[11]は，培養細胞にMRP cDNAを導入してMRPを発現させたところ，導入細胞はADM, VP-16, ビンクリスチンに耐性となり多剤耐性になったことを報告している．臨床例においても蛋白およびmRNAレベルにおける検索がなされ，膀胱癌[33]，消化器癌[34]，肺癌[35]，乳癌[36]，網膜芽細胞腫[37]，急性白血病[38]などでその発現と予後などとの関係が報告されている．中枢神経系においては，正常脳組織ではMRP蛋白およびMRP mRNAの発現がきわめて低いことが[12)39]，またグリオーマ細胞株においてはMRP mRNA高発現と薬剤耐性の関与などが報告されている[40]．本研究のグリオーマ組織標本におけるMRPの発現は，RT-PCR法におけるmRNAレベルの発現と免疫組織化学における蛋白レベルの発現は一致しており，また正常脳組織では発現はみられなかった．免疫組織学的検索においてはグリオーマの悪性度に伴いMRP陽性腫瘍細胞数が増加する傾向がみられた．今回の手術摘出標本はすべて初発例であり腫瘍細胞にみられたMRPの発現が悪性グリオーマにおける薬剤自然耐性の一部に関与していることが推定された．これまでにMRPの発現はADM, VP-16, ビンクリスチンの耐性に関与しているといわれているが[11)41]，最近になりMRPがATP依存性にグルタチオン抱合体を輸送するグルタチオン抱合体排出ポンプの1つをコードしていることが明らかになった[42)~44]．グルタチオン抱合体排出ポンプはグルタチオン抱合体，酸化型グルタチオン，システイニルロイコトリエンなどを輸送することにより，炎症の際に生ずる酸化物の代謝や，化学物質の代謝などに生理的に重要な役割を果たしているとされ，CDDPに対する耐性への関与も示唆されている[45]．

本研究に用いられた4種類の細胞株間のMRPの発現量を検討するとmRNAおよび蛋白レベルにおいて，その発現量はほぼ一致していた．また，それぞれの細胞株の薬剤感受性を検討するとMRPの発現量と各細胞株のADM, VP-16, CDDPに対する相対耐性度がよく相関していた．この結果は，MRPの発現がこれらの薬剤耐性と密接な関係にあることを示唆しているがMRPが直接的にこれらの薬剤における耐性を担っているかは示されていない．そこで次に，MRP発現の薬剤耐性への関与を検討するためMRPに特異的なアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いたMRP発現抑制実験を行い，MRPの薬剤感受性に及ぼす影響を検討した．今回使用したフォスフォロチオエート型オリゴヌクレオチドは通常のオリゴヌクレオチドに比しヌクレアーゼ耐性で安定性が高く，水溶性溶媒に溶けやすいことが，また正電荷リポソームはオリゴヌクレオチドの導入効率を上げることが知られている[23)46]．Stewartら[22]は，MRP cDNAを遺伝子導入した細胞にMRPのアンチセンスオリゴヌクレオチドを投与することによりMRPの発現がmRNAと蛋白レベルで抑制され，ADMの感受性が高まることを報告している．MRPの半減期はMRP cDNAを遺伝子導入した細胞では19時間，薬剤負荷によりMRPを誘導発現させた細胞では15～18時間と考えられていることより[47]，今回の実験ではアンチセンスオリゴヌクレオチド初回投与後48時間後に2回目の投与を行いアンチセンスオリゴヌクレオチドの2回投与によるMRP発現抑制効果を検討した．発現抑制にはMRPの発現量が最も多く相対耐性度が最も高いT98Gを使用した．その結果，アンチセンスオリゴヌクレオチドの2回投与によるMRP蛋白の発現抑制の程度は初回投与より78時間後でセンスオリゴヌクレオチド投与群の約25％に減少していた．また，薬剤感受性に関しては，ADM, VP-16, CDDPに対するIC_{50}がセンスオリゴヌクレオチド投与時のIC_{50}に比べて有意に低下していた．この結果はMRPの発現が，ADM, VP-16, CDDPに対するの耐性に関与していることを示唆している．今回の実験ではオリゴヌクレオチドの濃度を0.25 μMとしたがこれ以上の濃度では細胞毒性が強くなるため，アンチセンスオリゴヌクレオチド投与によりMRPの発現レベルをさらに低下させるためには別の標的配列や他の導入法などを検討する必要があろう．

本研究の結果，グリオーマ組織においては腫瘍細胞でのMRPの発現は組織学的悪性度に相関する傾向がみられ，ヒトグリオーマ細胞株においてはその発現が多剤耐性に関与していることが推測された．治療前にすでにMRPが発現し，多剤耐性の形質を獲得していることが臨床上の悪性グリオーマの化学療法抵抗性に強く関わっていることが示唆された．MRPに特異的なアンチセンスオリゴヌクレオチドを腫瘍内に局所投与することによってMRPの発現を抑制することができれば，現在の化学療法の限界を克服できる可能性がある．

結　　論

グリオーマ摘出標本および4種類のヒトグリオーマ細胞株におけるMRPの発現とその意義について検討するためRT-PCR, 免疫組織化学，ウエスタンブロット，薬剤感受性試験およびアンチセンスオリゴ法を用いて検索し以下の結果を得た．

1．グリオーマ摘出標本において，MRP mRNAとMRP蛋白は膠芽腫と退形成星状細胞腫にみられたが，星状細胞腫と正常脳組織にはみられなかった．免疫組織化学的にはMRP蛋白は腫瘍細胞内に顆粒状にみられ，悪性度に伴い陽性細胞数が増加する傾向がみられた．

2．ヒトグリオーマ細胞株においては，MRPの発現量とADM, VP-16, CDDPに対する薬剤耐性度との間には強い関連性がみられた．

3．アンチセンスオリゴ法によるMRP発現抑制によってADM, VP-16, CDDPに対する薬剤感受性が増強したが，ACNUに対する感受性に変化はみられなかった．

以上より，グリオーマに発現しているMRPは自然多剤耐性に重要な役割を果たしていることが示唆された．

謝　　辞

稿を終えるに臨み，御指導と御校閲を賜りました金沢大学医学部脳神経外科学講座の山下純宏教授に深甚なる謝意を表します．また，終始直接の御指導を賜りました同教室の新多　寿助手に心から感謝いたします．さらに，御支援と御協力を頂きました金沢大学医学部脳神経外科学講座の皆様に深く御礼申し上げます．
なお，本研究の一部は第15回日本脳腫瘍病理学会（1997，佐賀），第56回日本脳神経外科学会総会（1997，大阪），第6回日本脳腫瘍カンファランス（1997，熊本）において発表した．

文　　献

1）Levin VA, Hoffman WF, Pischer TL, Seager ML, Boldrey EB ,Wilson CB. BCNU-5-fluorouracil combination therapy for recurrent malignant brain tumors. Cancer Treat Rep 62: 2071-6,

1978

2) Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. Biochim Biophys Acta 455: 152-62, 1976

3) Chen CJ, Chin JE, Ueda K, Clark DP, Pastan I, Gottesman MM ,Roninson IB. Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the mdr1 (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. Cell 47: 381-9, 1986

4) Matsumoto T, Tani E, Kaba K, Shindo H ,Miyaji K. Expression of P-glycoprotein in human glioma cell lines and surgical glioma specimens. J Neurosurg 74: 460-6, 1991

5) Toth K, Vaughan MM, Peress NS, Slocum HK ,Rustum YM. MDR1 P-glycoprotein is expressed by endothelial cells of newly formed capillaries in human gliomas but is not expressed in the neovasculature of other primary tumors. Am J Pathol 149: 853-8, 1996

6) Nitta H, Hayashi Y, Okada Y, Tachibana O, Mouri M, Yamashima T ,Yamashita J. Metallothionein in glioma. In Nagai M (eds), Brain tumor research and therapy. 1st ed, p61-67, Springer-Verlag, Tokyo, 1996

7) Hara A, Yamada H, Sakai N, Hirayama H, Tanaka T ,Mori H. Immunohistochemical demonstration of the placental form of glutathione S-transferase, a detoxifying enzyme in human gliomas. Cancer 66: 2563-8, 1990

8) Mousseau M, Chauvin C, Nissou MF, Chaffanet M, Plantaz D, Pasquier B, Schaerer R, Benabid A. A study of the expression of four chemoresistance-related genes in human primary and metastatic brain tumors. Eur J Cancer 29A: 153-9, 1993

9) Nagane M, Asai A, Shibui S, Nomura K, Matsutani M, Kuchino Y. Expression of O^6-methylguanine-DNA methyltransferase and chloroethylnitrosourea resistance of human brain tumors. Jpn J Clin Oncol 22: 143-9, 1992

10) Cole SPC, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC, Stewart AJ, Kurz EU, Duncan AM, Deeley RG. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line [see comments]. Science 258: 1650-4, 1992

11) Grant CE, Valdimarsson G, Hipfner DR, Almquist KC, Cole SP, Deeley RG. Overexpression of multidrug resistance-associated protein (MRP) increases resistance to natural product drugs. Cancer Res 54: 357-61, 1994

12) Flens MJ, Zaman GJ, van dVP, Izquierdo MA, Schroeijers AB, Scheffer GL, van dGP, de HM, Meijer CJ, Scheper RJ. Tissue distribution of the multidrug resistance protein. Am J Pathol 148: 1237-47, 1996

13) Kleihues P, Burger PC, Scheithauer BW.Histological Typing of Tumors of the Central Nervous System. 2nd ed, p 11-30, Springer-Verlag, Berlin, 1993

14) Cole SPC, Deeley RG. Multidrug resistance-associated protein: sequence correction [letter; comment]. Science 260: 879, 1993

15) Schadendorf D, Makki A, Stahr C, van DA, Wanner R, Scheffer GL, Flens MJ, Scheper R, Henz BM. Membrane transport proteins associated with drug resistance expressed in human melanoma. Am J Pathol 147: 1545-52, 1995

16) Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 162: 156-9, 1987

17) Flens MJ, Izquierdo MA, Scheffer GL, Fritz JM, Meijer CJ, Scheper RJ, Zaman GJ. Immunochemical detection of the multidrug resistance-associated protein MRP in human multidrug-resistant tumor cells by monoclonal antibodies. Cancer Res 54: 4557-63, 1994

18) Noonan KE, Beck C, Holzmayer TA, Chin JE, Wunder JS, Andrulis IL, Gazdar AF, Willman CL, Griffith B, Von HD, Roninson IB. Quantitative analysis of MDR1 (multidrug resistance) gene expression in human tumors by polymerase chain reaction. Proc Natl Acad Sci U S A 87: 7160-4, 1990

19) Nakayama H, Yokoi H, Fujita J. Quantification of mRNA by non-radioactive RT-PCR and CCD imaging system. Nucleic Acids Res 20: 4939, 1992

20) Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685, 1970

21) Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 65: 55-63, 1983

22) Stewart AJ, Canitrot Y, Baracchini E, Dean NM, Deeley RG, Cole SPC. Reduction of expression of the multidrug resistance protein (MRP) in human tumor cells by antisense phosphorothioate oligonucleotides. Biochem Pharmacol 51: 461-9, 1996

23) Thierry AR, Rahman A, Dritschilo A. Overcoming multidrug resistance in human tumor cells using free and liposomally encapsulated antisense oligodeoxynucleotides. Biochem Biophys Res Commun 190: 952-60, 1993

24) Takano H, Kohno K, Ono M, Uchida Y,Kuwano M. Increased phosphorylation of DNA topoisomerase II in etoposide-resistant mutants of human cancer KB cells. Cancer Res 51: 3951-7, 1991

25) Kelley SL, Basu A, Teicher BA, Hacker MP, Hamer DH, Lazo JS. Overexpression of metallothionein confers resistance to anticancer drugs. Science 241: 1813-5, 1988

26) Black SM, Beggs JD, Hayes JD, Bartoszek A, Muramatsu M, Sakai M ,Wolf CR. Expression of human glutathione S-transferases in Saccharomyces cerevisiae confers resistance to the anticancer drugs adriamycin and chlorambucil. Biochem J 268: 309-15, 1990

27) Taira K ,Benkovic SJ. Evaluation of the importance of hydrophobic interactions in drug binding to dihydrofolate reductase. J Med Chem 31: 129-37, 1988

28) Pegg AE. Mammalian O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase: regulation and importance in response to alkylating carcinogenic and therapeutic agents. Cancer Res 50: 6119-29, 1990

29) Ueda K, Clark DP, Chen CJ, Roninson IB, Gottesman MM, Pastan I. The human multidrug resistance (mdr1) gene. cDNA cloning and transcription initiation. J Biol Chem 262: 505-8, 1987

30) Nooter K, Herweijer H. Multidrug resistance (mdr) genes

in human cancer. Br J Cancer 63: 663-669, 1991
31) Cordon CC, O'Brien JP, Casals D, Rittman GL, Biedler JL, Melamed MR ,Bertino JR. Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. Proc Natl Acad Sci U S A 86: 695-8, 1989
32) Krishnamachary N, Center MS. The MRP gene associated with a non-P-glycoprotein multidrug resistance encodes a 190-kDa membrane bound glycoprotein. Cancer Res 53: 3658-61, 1993
33) Nakagawa M, Emoto A, Nasu N, Handa T, Kuwano M, Cole SPC. Clinical significance of multi-drug resistance associated protein and p-glycoprotein in patients with bradder cancer. J Urol 157: 1260-1265, 1997
34) Fillpits M, Suchomel RW, Dekan G, Stiglbauer W, Haider K, Depisch D, Pirker R. Expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) gene in colorectal carcinomas. Br J Cancer 75: 208-12, 1997
35) Campling BG, Young LC, Bear KA, Lam YM, Deeley RG, Cole SPC ,Gerlach JH. Expression of the MRP and MDR1 multidrug resistance genes in small cell lung cancer. Clin Cancer Res 3: 115-122, 1997
36) Filipits M, Suchomel RW, Dekan G, Haider K, Valdimarsson G, Depisch D, Pirker R. MRP and MDR1 gene expression in primary breast carcinomas. Clin Cancer Res 2: 1231-1237, 1996
37) Chan HSL, Lu Y, Grogan TM, Haddad G, Hipfner DR, Cole SPC, Deeley RG, Ling V, Gallie BL. Multidrug resistance protein (MRP) expression in retinoblastoma correlates with the rare failure of chemotherapy despite cyclosporine for reversal of p-glycoprotein. Cancer Res 57: 2325-2330, 1997
38) Kuss BJ, Deeley RG, Cole SPC, Willman CL, Kopecky KJ, Wolman SR, Eyre HJ, Lane SA, Nancarrow JK, Whitmore SA, Callen DF. Deletion of gene for multidrug resistance in acute myeloid leukaemia with inversion in chromosome 16: prognostic implications. Lancet 343: 1531-4, 1994
39) Zaman GJ, Versantvoort CH, Smit JJ, Eijdems EW, de HM, Smith AJ, Broxterman HJ, Mulder NH, de VE, Baas F, et al. Analysis of the expression of MRP, the gene for a new putative transmembrane drug transporter, in human multidrug resistant lung cancer cell lines. Cancer Res 53: 1747-50, 1993
40) Abe T, Hasegawa S, Taniguchi K, Yokomizo A, Kuwano T, Ono M, Mori T, Hori S, Kohno K, Kuwano M. Possible involvement of multidrug-resistance-associated protein (MRP) gene expression in spontaneous drug resistance to vincristine, etoposide and adriamycin in human glioma cells. Int J Cancer 58: 860-4, 1994
41) Kruh GD, Chan A, Myers K, Gaughan K, Miki T ,Aaronson SA. Expression complementary DNA library transfer establishes mrp as a multidrug resistance gene. Cancer Res 54: 1649-52, 1994
42) Leier I, Jedlitschky G, Buchholz U, Cole SP, Deeley RG, Keppler D. The MRP gene encodes an ATP-dependent export pump for leukotriene C4 and structurally related conjugates. J Biol Chem 269: 27807-10, 1994
43) Muller M, Meijer C, Zaman GJ, Borst P, Scheper RJ, Mulder NH, de VE ,Jansen PL. Overexpression of the gene encoding the multidrug resistance-associated protein results in increased ATP-dependent glutathione S-conjugate transport. Proc Natl Acad Sci U S A 91: 13033-7, 1994
44) Jedlitschky G, Leier I, Buchholz U, Barnouin K, Kurz G, Keppler D. Transport of glutathione, glucuronate, and sulfate conjugates by the MRP gene-encoded conjugate export pump. Cancer Res 56: 988-94, 1996
45) Ishikawa T, Bao JJ, Yamane Y, Akimaru K, Frindrich K, Wright CD, Kuo MT. Coordinated induction of MRP/GS-X pump and gamma-glutamylcysteine synthetase by heavy metals in human leukemia cells. J Biol Chem 271: 14981-8, 1996
46) Matsukura M, Shinozuka K, Zon G, Mitsuya H, Reitz M, Cohen JS, Broder S. Phosphorothioate analogs of oligodeoxynucleotides: inhibitors of replication and cytopathic effects of human immunodeficiency virus. Proc Natl Acad Sci U S A 84: 7706-10, 1987
47) Almquist KC, Loe DW, Hipfner DR, Mackie JE, Cole SP, Deeley RG. Characterization of the Mr 190,000 multidrug resistance protein (MRP) in drug-selected and transfected human tumor cell. Cancer Res 55: 102-10, 1995

Expression of Multidrug Resistance-associated Protein (MRP) in human Gliomas Masanao Mohri, Department of Neurosurgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — J. Juzen Med Soc., **107**, 33 — 43 (1998)

Key Words multidrug resistance-associated protein, glioma, chemotherapy, antisence oligonucleotide

Abstract

The present study was performed to investigate whether multidrug resistance-associated protein (MRP) is involved in intrinsic drug resistance of human gliomas. Expression of MRP were studied by reverse transcription-PCR (RT-PCR) and immunohistochemistry in surgical specimens of 20 gliomas (11 glioblastomas, 6 anaplastic astrocytomas and 3 astrosytomas), 3 brain tissues and 4 glioma cell lines (U87MG, U251MG, U373MG and T98G). MRP expression levels in the human glioma cell lines were assessed by quantitative RT-PCR and Western blot analyses. Chemosensitivity to adriamycin (ADM), etoposide (VP-16), cis-diamminedichloroplatinum (CDDP) and nimustine [1-(4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl) methyl-3-(2-chloroethyl)-3-nitrosourea, ACNU],determined by MTT assay, was evaluated in the cell lines. Expression of MRP in surgical specimens was detected in 9 of 11 glioblastomas and 3 of 6 anaplastic astrocytomas by RT-PCR and immunohistochemistry. MRP was not detected in all astrocytomas and normal brain tissues. Immunohistochemical examination revealed that MRP appeared as granular cytoplasmic staining in tumor cells. Quantitative analyses in human glioma cell lines revealed that the MRP mRNA and protein levels were increased 4.5-fold in the T98G cells as compared to U87MG. In the glioma cell lines, the degree of sensitivity to ADM, VP-16 and CDDP appeared to correlate with their respective MRP expression levels. T98G cells showed relative resistant 28-fold (the ratio of IC_{50} of the most resistant T98G cells to that of most sensitive U87MG cells) for ADM, and also cross-resistant to other drugs, including VP-16 (49-fold), CDDP (8.3-fold) and ACNU (17-fold). Treatment with the antisense oligonucleotide targeted to the initiation codon region of the MRP mRNA reduced the level of MRP protein to 25% of sense oligonucleotide treatment in Western blot analysis in T98G cells. Sensitivity to ADM, VP-16 and CDDP was significantly increased in antisense treatment cells as compared to sense treatment cells. In contrast, no change in sensitivity to ACNU existed in T98G cells even with antisense treatment. These results indicate that MRP expression is related to intrinsic multidrug resistance in human gliomas.