

# Establishment and Characterization of a HL60 Cell Line Overexpressing Multidrug Multidrug Resistance-associated Protein

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/9261">http://hdl.handle.net/2297/9261</a>

## 多剤耐性関連蛋白を過剰発現する多剤耐性白血病細胞株の樹立とその性状の検討

金沢大学医学部医学科小児科学講座 (主任: 小泉晶一教授)

和田 英 男

悪性腫瘍の治療中にみられる、腫瘍細胞の多剤耐性機構のなかで P 糖蛋白以外の多剤耐性機構の一種として多剤耐性関連蛋白 (multidrug resistance-associated protein, MRP) が知られている。本研究では MRP の多剤耐性機構を解析する目的で MRP 過剰発現多剤耐性白血病細胞株 HL60/ADR4 および HL60/ADR13 を樹立しその性状について検討した。ヒト前骨髄球性白血病細胞株である HL60 をアドリアマイシン (adriamycin, ADR) とセファランチン存在下で 1 年間継代培養を行い多剤耐性細胞株 HL60/ADR4 を、さらに 1 年間継代培養し HL60/ADR13 を樹立した。コロニーアッセイ法による薬剤感受性試験では HL60/ADR4 細胞は親株の HL60 細胞と比較しビンクリスチンに対し 4.6 倍、ADR に 4.0 倍、ピラルピシンに 2.3 倍、エトポシドに 5.7 倍と多剤耐性を示した。P 糖蛋白に対するマウスモノクローナル抗体 P-glycoCHEK C219<sup>TM</sup> および MRP に対するラットモノクローナル抗体 MRP1 を用いた免疫染色では HL60/ADR4 細胞は MRP 陽性、P 糖蛋白陰性であった。ADR を用いた細胞内への取り込み、および細胞外への排出の検討では HL60/ADR4 細胞で ADR の細胞外排出の亢進が認められ、MRP の薬剤排出ポンプとしての働きが示唆された。またこの ADR 排泄の促進はカルシウム拮抗剤であるベラパミルにより阻害された。サザンブロット法による検討では HL60/ADR4 細胞では MRP DNA の増幅が認められた。競合逆転写 PCR (competitive reverse transcription-PCR, CRT-PCR) 法による MRP mRNA の定量では HL60/ADR4 細胞は HL60 細胞に比較して 8 倍の MRP mRNA の発現増幅が示された。ADR の標的酵素である DNA トポイソメラーゼ II  $\alpha$  (DNA topoisomerase II  $\alpha$ , Topo II  $\alpha$ ) と DNA トポイソメラーゼ II  $\beta$  (DNA topoisomerase II  $\beta$ , Topo II  $\beta$ ) の CRT-PCR 法による mRNA の定量では、いずれも HL60 細胞、HL60/ADR4 細胞間で差はなかった。また DNA トポイソメラーゼ I (DNA topoisomerase I, Topo I),  $\gamma$ -グルタミルシステインシンセターゼ ( $\gamma$ -glutamylcystein synthetase,  $\gamma$ -GCS) についても mRNA 量に差はなかった。今回樹立した HL60/ADR 細胞での多剤耐性機構の一つとして MRP による薬剤排泄の促進が示唆され、MRP の発現は DNA レベルでの増幅および転写の亢進により調節されているものと考えられた。

**Key words** multidrug resistance-associated protein, multidrug resistance 1, P-glycoprotein, DNA topoisomerase,  $\gamma$ -glutamylcystein synthetase

白血病、悪性リンパ腫などに代表される小児癌の治療成績は化学療法および支持療法の進歩に伴い飛躍的に向上しているが、一方で再発症例やはじめから治療に対し反応の悪い治療抵抗性の症例は存在しており、化学療法における臨床上の大きな問題となっている。

腫瘍細胞が以前に用いたことのない抗癌剤を含め多種類の抗癌剤に対して薬剤耐性を獲得するという現象が臨床的にも多く観察されており、この多剤耐性機構が化学療法における治療抵抗性の重要な部分を占めていると考えられる。1976年、抗癌剤耐性となった培養細胞の細胞膜に分子量 170kD の糖蛋白質が強く発現していることが報告され P 糖蛋白と名付けられた<sup>1)</sup>。その後 P 糖蛋白をコードする遺伝子が単離され多剤耐性遺伝子 1 (multidrug resistance 1, MDR1) と名付けられた<sup>2)</sup>。P 糖蛋白は膜を 12 回貫通する構造を持つ 1,280 個のアミノ酸よりなる糖

蛋白質であり、ATP 結合領域を持つ ATP 結合カセットスーパーファミリー (ATP binding cassette superfamily) の一員である<sup>3)</sup>。P 糖蛋白は ATP をエネルギー源として各種抗癌剤を細胞外へ排出する薬剤排出ポンプとして働くことが知られており<sup>4)</sup>、P 糖蛋白を発現する腫瘍細胞はこのような機序により細胞内薬物濃度を低下させ、耐性を獲得していると考えられている。

近年、P 糖蛋白陰性であるが、多剤耐性を示す腫瘍細胞の細胞膜および小胞体に、分子量 190kD の膜蛋白質が強く発現していることが認められ、多剤耐性関連蛋白 (multidrug resistance-associated protein, MRP) と名付けられた。MRP は P 糖蛋白同様に膜を 12 回貫通する構造を持ち ATP 結合カセットスーパーファミリーに属するが、そのアミノ酸配列では P 糖蛋白との相同性は低い<sup>6)</sup>。MRP は比較的新しく知られるようになった耐性関連因子であり、その機能や臨床面との関わりな

平成 8 年 11 月 26 日 受付, 平成 9 年 1 月 8 日 受理

Abbreviations: AB-AP, avidin-biotin-alkaline phosphatase; ADR, adriamycin; bp, base pairs; BSA, bovine serum albumin; cMOAT, canalicular multispecific organic anion transporter; CRT-PCR, competitive reverse transcription-PCR; DEPC, diethylpyrocarbonate; DIG, digoxigenin; dNTP, deoxyribonucleotide triphosphate; DTT, dithiothreitol; FCS, fetal calf serum;  $\gamma$ -GCS,  $\gamma$ -glutamylcystein synthetase; GS-X pump, ATP dependent glutathione S-conjugate

十分に解明されていない点が多い。本研究では MRP の多剤耐性に関わるメカニズムを解明する目的で、ヒト前骨髄球性白血病細胞株である HL60 をアドリアマイシン (adriamycin, ADR) 存在下に培養することにより MRP 発現多剤耐性細胞株 HL60/ADR4 および HL60/ADR13 を樹立し、その性状をコロニーアッセイ法による薬剤感受性、ADR の蛍光を利用した機能解析、MRP に対するモノクローナル抗体による免疫染色、サザンブロット法、競合逆転写 PCR (competitive reverse transcription-PCR, CRT-PCR) 法などの手法を用いて検討を行った。

## 対象および方法

### I. 細胞培養

使用した培養細胞株は親株のヒト赤白血病細胞株 K562 (American Type Culture Collection, Rockville, USA), メソトレキセート (methotrexate, MTX) (日本レダリー, 東京) 耐性の K562/MTX, ADR (協和発酵, 東京) で誘導した多剤耐性株 K562/ADR, ビンクリスチン (vincristine, VCR) (塩野義製薬, 大阪) で誘導した多剤耐性株 K562/VCR, ヒト乳癌細胞親株 MCF7/WT (National Cancer Institute, Dr. Schneider より供与), MCF7/WT をエトポシドで誘導した多剤耐性株 MCF7/VP (National Cancer Institute, Dr. Schneider より供与), ヒト前骨髄球性白血病細胞株 HL60 (American Type Culture Collection), HL60 を ADR で誘導した多剤耐性株 HL60/ADR4 および HL60/ADR13 である。細胞はすべて10%牛胎児血清 (fetal calf serum, FCS) (Flow Laboratories, McLean, USA) 加 RPMI1640 (Gibco, Grand Island, USA) 培養液にて湿潤37°C, 5% CO<sub>2</sub> 存在下で継代培養した。

### II. 多剤耐性細胞株 HL60/ADR4 および HL60/ADR13 の樹立

HL60 細胞を 10nM の ADR を加えた10% FCS 加 RPMI1640 培養液で37°C, 5% CO<sub>2</sub> 存在下で継代培養を行った。その際 P 糖蛋白の発現を防ぐ目的で培養液に MDR1 克服剤であるセファランチン (和光純薬工業, 大阪) を 1 $\mu$ M 加えて培養を継代した。ADR の濃度を 100nM まで増加させた時点で限界希釈法でクローニングし、細胞株を検討した。ADR を加えて1年間培養した細胞株を HL60/ADR4, さらに1年間培養した細胞株を HL60/ADR13 とした。

### III. 薬剤感受性試験

#### 1. 各種抗癌剤に対する薬剤感受性の検討

薬剤感受性はコロニーアッセイ法で求めた。すなわち HL60 細胞, HL60/ADR4 細胞を10%FCS 加 RPMI1640 培養液に浮遊させ、各種抗癌剤の希釈系列 [ADR 3nM~3 $\mu$ M, VCR 0.1nM~1 $\mu$ M, ピラルピシン (明治製薬, 東京) 1nM~100nM, エトポシド (日本化薬, 東京) 300nM~30 $\mu$ M] を加えた系と、薬剤を加えないコントロールを、湿潤37°C, 5% CO<sub>2</sub> 存在下で24時間培養を行った。24時間後細胞を冷却した 10mM リン酸緩衝液 (phosphate-buffered saline, PBS) (pH7.4) で洗浄し、HL60 細胞は 2 $\times$ 10<sup>5</sup>/ml, HL60/ADR4 細胞は 5 $\times$ 10<sup>5</sup>/ml となるように、メチルセルロース (Fisher, Fair Lawn, USA) を30%添加

した10% FCS 加 RPMI1640 培養液で調整した。それぞれ 0.3ml を3検体ずつ24穴マイクロプレート (Costar, Cambridge, USA) の各ウェルに注ぎ、37°C, 5% CO<sub>2</sub> 存在下で7~9日間培養を行った。各ウェル内のコロニー数を顕微鏡下に計測し、それぞれコントロールのコロニー数を100%として細胞生存率曲線を描き、幾何学的に50%増殖阻害濃度 (50% inhibition of cell growth, IC<sub>50</sub>) を求め薬剤感受性の指標とした。耐性度 (fold resistance) はそれぞれの薬剤での HL60/ADR4 細胞の IC<sub>50</sub> 値を HL60 細胞の IC<sub>50</sub> 値で除した値で表した。感受性試験はすべて3回行った。

#### 2. ADR 耐性におけるベラパミルの影響

ADR 感受性における、カルシウム拮抗剤ベラパミルの影響をコロニー法で検討した。HL60 細胞, HL60/ADR13 細胞を10% FCS 加 RPMI1640 培養液に浮遊させ、各種濃度系列の ADR を添加し、37°C, 5% CO<sub>2</sub> 存在下で24時間培養を行った。その際それぞれに 10 $\mu$ M のベラパミル (エーザイ, 東京) を添加し、IC<sub>50</sub> 値および耐性度の変動を観察した。

### IV. 免疫染色

#### 1. 細胞塗抹標本の作製

各細胞株を冷却した PBS で2回洗浄した後、細胞遠心沈降装置 (Cytospin 2, Shandon Southern Products Ltd., Cheshire, England) を使用して、5分間、800回転にてスライドガラス上に遠沈し、塗抹標本を作製した。

#### 2. 免疫染色

免疫染色はアビジンビオチンアルカリフォスファターゼ (avidin-biotin-alkaline phosphatase, AB-AP) 法で染色する方法をとった。P 糖蛋白に対する抗体はマウスモノクローナル抗体である P-glycoCHEK C219<sup>TM</sup> (C219, Centocor Diagnostics, Malvern, USA) を用い、MRP に対する抗体はラットモノクローナル抗体 MRPr1 (オランダ Free University Hospital, Dr. Scheper より供与)<sup>9)</sup>を用いた。使用した各抗体の希釈は牛血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA, Sigma, St. Louis, USA) 0.1%加トリス塩酸緩衝液 (Tris-buffered saline, TBS) (pH7.4) にて行い、反応は室温、湿潤箱中で乾燥を防止して行った。スライド標本をアセトンで10分間固定後ドライヤーにて数分間風乾した。4%正常ウサギ免疫グロブリン (DAKO, Glostrup, Denmark) にて20分間反応後、標本上のものを除去し、洗浄せずに20倍希釈した C219, もしくは100倍希釈した MRPr1 と60分間反応させた。TBS にて5分間3回洗浄後、C219 の場合200倍希釈したビオチン化抗マウスウサギ免疫グロブリン (DAKO) と、MRPr1 の場合200倍希釈したビオチン化抗ラットウサギ免疫グロブリン (DAKO) と30分間反応させた。TBS にて3回洗浄後、200倍希釈アルカリフォスファターゼ標識ストレプトアビジン (DAKO) と30分間反応させた後、アルカリフォスファターゼ発色試薬 (Fast red TR salt, Sigma) を用いて赤色に発色させた。その際基質溶液中には 1mM レバミゾールを加え、内因性アルカリフォスファターゼ活性を阻止した。発色後にカラッチヘマトキシリン核染色液にて核染色を行った。

### V. ADR の細胞内への取り込み、細胞外への排出の測定

ADR の発する蛍光を利用して細胞内への取り込み、および

export pump; IC<sub>50</sub>, 50% inhibition of cell growth; MDR1, multidrug resistance 1; MRP, multidrug resistance-associated protein; MTX, methotrexate; PBS, phosphate-buffered saline; TBS, tris-buffered saline; TE, tris-EDTA; Topo I, DNA topoisomerase I; Topo II $\alpha$ , DNA topoisomerase II $\alpha$ ; Topo II $\beta$ , DNA topoisomerase II $\beta$ ; VCR, vincristine

細胞外への排出をフローサイトメーター (Cytoron Absolute, Ortho Diagnostic Systems, Raritan, USA) を用いて定量した。

#### 1. 細胞内への取り込み

HL60 細胞, HL60/ADR4 細胞を10% FCS 加 RPMI1640 培養液に  $10\mu\text{M}$  の ADR を加え,  $37^\circ\text{C}$  で培養を行った。ADR 添加直後, 10分後, 20分後, 40分後, 60分後にそれぞれの細胞を冷却した PBS で2回洗浄後, 10% FCS 加 RPMI1640 培養液に再浮遊し, フローサイトメーターで平均蛍光強度 (mean fluorescence intensity) を測定した。

#### 2. 細胞外への排出

HL60 細胞, HL60/ADR4 細胞を10% FCS 加 RPMI1640 培養液に  $10\mu\text{M}$  の ADR を加え,  $37^\circ\text{C}$  で2時間以上培養し, 薬剤を充分細胞内に取り込ませた。その後冷却した PBS で2回洗浄後に10% FCS 加 RPMI1640 培養液に再浮遊させて $37^\circ\text{C}$  で培養を続行した。再浮遊直後, 10分後, 20分後, 30分後, 60分後, 90分後, 120分後に細胞の平均蛍光強度を同様にフローサイトメーターにて測定した。それぞれの細胞株の再浮遊直後の平均蛍光強度を100%とし, それぞれの時間での平均蛍光強度をパーセントで表した。ベラパミルの影響を検討するために, 再浮遊直後の培養液にベラパミルを  $10\mu\text{M}$  加え, 同様な方法で ADR の細胞内濃度の減衰を測定した。

### VI. サザンブロットハイブリダイゼーション

#### 1. DNA の抽出

各種細胞株の試料細胞を PBS1ml に浮遊させ, プロテナーゼ K (10mg/ml, 和光純薬工業) を  $100\mu\text{l}$  添加後, DNA/RNA/プラスミド抽出システムモデル341 (Perkin-Elmer Applied Biosystems Division, Foster, USA) にて各細胞より染色体 DNA を抽出した。得られた DNA を RNaseA (ニッポンジーン, 富山) にて RNA を分解し, フェノール/クロロホルム抽出, エタノール沈殿にて DNA を回収した。得られた DNA は  $0.2\times$  Tris-EDTA (TE) 緩衝液 (2mM トリスアミノメタン, 0.2mM EDTA, pH7.0) に溶解した。その一部を取り  $260\text{nm}$  の吸光度を測定して DNA 濃度を計算した。

#### 2. サザンブロット法

それぞれの細胞株より得られた DNA  $10\mu\text{g}$  を制限酵素 Pst I

(宝酒造, 東京) にて $37^\circ\text{C}$  で2時間消化後, 0.9% アガロースゲル (H14-Takara, 宝酒造) にて電気泳動した。アガロースゲルをエチジウムブロマイドにて染色し, 紫外線照射下に各 DNA 量がほぼ同一であることを確認した。その後アガロースゲルを陽性荷電ナイロンメンブレン (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) に転写し,  $120^\circ\text{C}$ , 15分間の熱処理によって DNA をメンブレンに固定した。MRP に対する特異的なプライマーである MRP-2F, MRP-2R (表1) を用いて増幅した (条件は後述) PCR 産物を鋳型とし, DNA Labeling Kit (Boehringer Mannheim) を用いてジゴキシゲニン (digoxigenin, DIG)-dUTP で標識したプローブを作製した。メンブレンをプレハイブリダイゼーション液 [50%ホルムアミド,  $5\times\text{SSC}$ , 2%ブロッキング試薬 (Boehringer Mannheim), 0.1%N-ラウロイルサルコシン酸ナトリウム, 0.02%SDS] と  $42^\circ\text{C}$ , 2時間反応させた後, 上記プローブをプレハイブリダイゼーション液に加えたものに変え $42^\circ\text{C}$ , 20時間反応させた。反応終了後メンブレンを  $2\times\text{SSC}$ , 0.1% SDS 溶液で室温10分間洗浄, さらに  $0.1\times\text{SSC}$ , 0.1% SDS 溶液で  $70^\circ\text{C}$ , 45分間洗浄した。検出には DIG Luminescent Detection Kit (Boehringer Mannheim) を用い, 抗 DIG-アルカリフォスファターゼ抗体と反応後, アルカリフォスファターゼの基質である Disodium 3-(4-methoxyphosphoryl)-1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro) tricyclo [3.3.1.1<sup>2,7</sup>] decan-4-yl phenyl phosphate (CSPD, Boehringer Mannheim) の化学発光を X 線フィルム (Fuji Medical X-ray Film New RX, 富士写真フィルム, 神奈川) にて検出した。

### VII. CRT-PCR 法

mRNA の定量には CRT-PCR 法を用いた<sup>9)</sup>。

#### 1. 総 RNA の抽出

総 RNA の抽出は Chomczynski らの方法<sup>10)</sup>を以下のように改良して行った。1容量の D 液 (4M グアニジンチオシアネート, 25mM クエン酸ナトリウム pH7.0, 0.1M 2-メルカプトエタノール, 0.5%N-ラウロイルサルコシン酸ナトリウム) に  $1/10$  容量の 2M 酢酸ナトリウム (pH4.0) と, 1容量の二炭酸ジエチル (diethylpyrocarbonate, DEPC) 処理水にて飽和したフェノールを混合し X 液を作製した。試料細胞  $5\times 10^6$  個に対し X 液 1ml

Table 1. PCR primers for  $\beta$ -Actin gene, MRP gene, DNA topoisomerase I gene, DNA topoisomerase II  $\alpha$  gene, DNA topoisomerase II  $\beta$  gene and  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase gene

Gene	Primer	Sequence	Target size (bp)	Restriction enzyme	Control size (bp)
$\beta$ -Actin	BA5	5'-TGGAAGTTCGAGCAAGAGATG-3'	320		415
	BA3	5'-GATCTTCATTGTGCTGGGTG-3'			
MRP	MRP-2F	5'-AGAAGTCTGGACGTCCTG-3'	404	Mbo I	260
	MRP-2R	5'-ACACCAAGCCGGCGTCTTT-3'			
Topo I	Topo I -F	5'-CAGAGAACATCCAAGGTTCC-3'	329	Taq I	267
	Topo I -R	5'-CTCTACCACATATTCCTGAC-3'			
Topo II $\alpha$	Topo II $\alpha$ -F	5'-GCTGTTTCAGGCCTTGGTG-3'	309	Mbo I	190
	Topo II $\alpha$ -R	5'-CTCCAGAAAACGATGTCGC-3'			
Topo II $\beta$	Topo II $\beta$ -F	5'-ACTTGAACACATTCTTCTCG-3'	332	Mbo I	249
	Topo II $\beta$ -R	5'-TACTGGATGTTAAAAGCTGTC-3'			
$\gamma$ -GCS	GCS-F	5'-GACATAGGAGAGAGAAAAG-3'	329	Mbo I	230
	GCS-R	5'-AGATGCAGAAATCACTCCCC-3'			

bp, base pairs; MRP, multidrug resistance-associated protein; Topo I, DNA topoisomerase I; Topo II  $\alpha$ , DNA topoisomerase II  $\alpha$ ; Topo II  $\beta$ , DNA topoisomerase II  $\beta$ ;  $\gamma$ -GCS,  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase.

を加えて良く混合した。0.2mlのクロロホルム(イソアミルアルコールを加えないもの)を加えボルテックスミキサーにて20~30秒間懸濁した。室温で5分間静置後、微量高速冷却遠心器(トミー精工, 東京)にて15,000rpm, 20分間, 4℃で遠心分離した。上層に等量のイソプロパノールを加え良く混和し, 室温で5分間静置後再び15,000 rpm, 20分間, 4℃で遠心分離した。遠心後上清を捨て, 沈殿(RNA)を75%エタノール1mlに再浮遊させ洗浄した。15,000rpm, 5分間, 4℃で遠心し沈殿を回収後, 上清を完全に除き室温で5分間放置し乾燥させた。1×TE緩衝液(10mMトリスアミノメタン, 1mM EDTA, pH6.8)に溶解し, 260nmの吸光度を測定して総RNA濃度を算定した。また260nm, 280nmの吸光度の比を測定しRNA純度の参考としたが, 本法によって得られるRNAはOD 260nm/280nm=1.9~2.0ときわめて良好であった。

## 2. 1本鎖cDNAの合成

上記によって得られた総RNAを鋳型としランダムプライマーにて1本鎖cDNAを合成した。まず総RNA 2μgにランダムヘキサヌクレオチドプライマー(宝酒造) 80μMを1.5μlに加え, 1×TE緩衝液(pH6.8)で総量25μlに調整。GeneAmp™ PCR system 9600-R(Perkin-Elmer Applied Biosystems Division)を用い65℃で10分間保持後20分かけて25℃まで冷却。この過程でRNAの変性とプライマーのアニーリングを行った。引き続き反応液[100mM Tris-HCl(pH8.3), 200mM 塩化カリウム(KCl), 20mM 塩化マグネシウム(MgCl<sub>2</sub>), 20mM ジチオスレイトール(dithiothreitol, DTT), 各2mM デオキシリボヌクレオチド三

リン酸(deoxyribonucleotide triphosphate, dNTP), RAV-2(宝酒造)10単位]25μlを加え, 42℃で60分間保持しcDNAを合成させた後, 90℃, 2分間で逆転写酵素(RAV-2)を失活させた。反応終了後1×TE緩衝液(pH7.0)50μlを加え総量100μlとし, 1回のPCR反応に5μlを鋳型として用いた。

## 3. CRT-PCRにおけるコントロール(競合)DNAの作製

薬剤耐性機序を解明するため, MRPの他DNAトポイソメラーゼI(DNA topoisomerase I, Topo I), DNAトポイソメラーゼIIα(DNA topoisomerase IIα, Topo IIα), DNAトポイソメラーゼIIβ(DNA topoisomerase IIβ, Topo IIβ), γ-グルタミルシステインシンセターゼ(γ-glutamylcystein synthetase, γ-GCS)を検討した。MRP, Topo I, Topo IIα, Topo IIβ, γ-GCSそれぞれに対する特異的なPCRプライマーを表1.に示す塩基配列で設定した。プライマーの合成はフナコシ株式会社(東京)に委託した。図1.にMRPのコントロールDNAの作製方法を示す。プライマーMRP-2F, MRP-2Rで増幅される領域の中には近接した制限酵素MboI領域が存在している。MRP-2F/MRP-2R PCR産物を制限酵素MboI(宝酒造)で消化し, 再びT4 DNAリガーゼ(宝酒造)で結合させた。この反応産物を鋳型として再びMRP-2F, MRP-2RプライマーでPCR反応を行うと2つのMboI間の144塩基対(base pairs, bp)の塩基配列を欠失した260bpの増幅産物を得ることができるはずである。電気泳動にて分離後エチジウムブロマイドにて染色し紫外線照射下にこの欠失を持つ260bpのバンドを切り出し, DNAを回収した。回収したDNAをpT7Blue T-Vector Kit(Novagen,

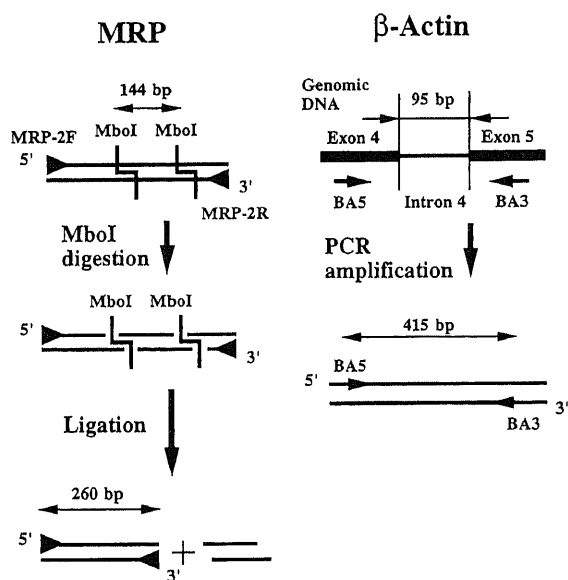


Fig. 1 The construction of the DNA clones for the quantitative analysis of MRP and  $\beta$ -actin mRNAs by the competitive RT-PCR.

The PCR product of the MRP amplified from the genomic DNA using MRP-2F and MRP-2R primers was digested with MboI and then religated. The resultant 260bp DNA template was subcloned and used as the control DNA for the competitive RT-PCR of MRP. The DNA segment including intron 4 sequence of the  $\beta$ -actin was amplified from the genomic DNA using BA5 and BA3 primers (Table 1). The resultant 415bp DNA template was subcloned and used as the control DNA for the competitive RT-PCR of  $\beta$ -actin. MRP, multidrug resistance-associated protein.

Table 2. Sensitivity of HL60 and HL60/ADR4 cells to four different anti-cancer agents

Drugs	IC <sub>50</sub> <sup>a)</sup> ( $\bar{x} \pm SD$ , n=3, nM)		Fold resistance
	HL60	HL60/ADR4	
Adriamycin	52.1 ± 5.9	210 ± 2.1	4.0 ± 0.4
Vincristine	2.7 ± 0.8	13.8 ± 0.4	4.6 ± 1.2
Pirarubicin	8.2 ± 2.6	15.5 ± 2.8	2.3 ± 0.3
Etoposide	1800 ± 300	9600 ± 2600	5.7 ± 0.7

The multidrug-resistant cell line, HL60/ADR4, was established after incubation of the parent HL60 cells with increasing concentration (up to 100nM) of adriamycin (ADR) and 1μM cephalanthine as shown in "Materials and methods".

<sup>a)</sup> IC<sub>50</sub>, drug concentration that inhibited colony formation by 50%.

Table 3. Reversal effect of verapamil on the multidrug-resistance of the HL60/ADR13 cells

Verapamil concentration (μM)	IC <sub>50</sub> <sup>a)</sup> ( $\bar{x} \pm SD$ , n=3, nM) for adriamycin		Fold resistance
	HL60	HL60/ADR13	
0	38 ± 16	471 ± 91	13.5 ± 4.3
10	39 ± 10	146 ± 18	4.0 ± 1.5

The multidrug-resistant cell line, HL60/ADR13, was established after incubation of the parent HL60 cells with increasing concentration (up to 100nM) of adriamycin (ADR) and 1μM cephalanthine as shown in "Materials and methods".

<sup>a)</sup> IC<sub>50</sub>, drug concentration that inhibited colony formation by 50%.

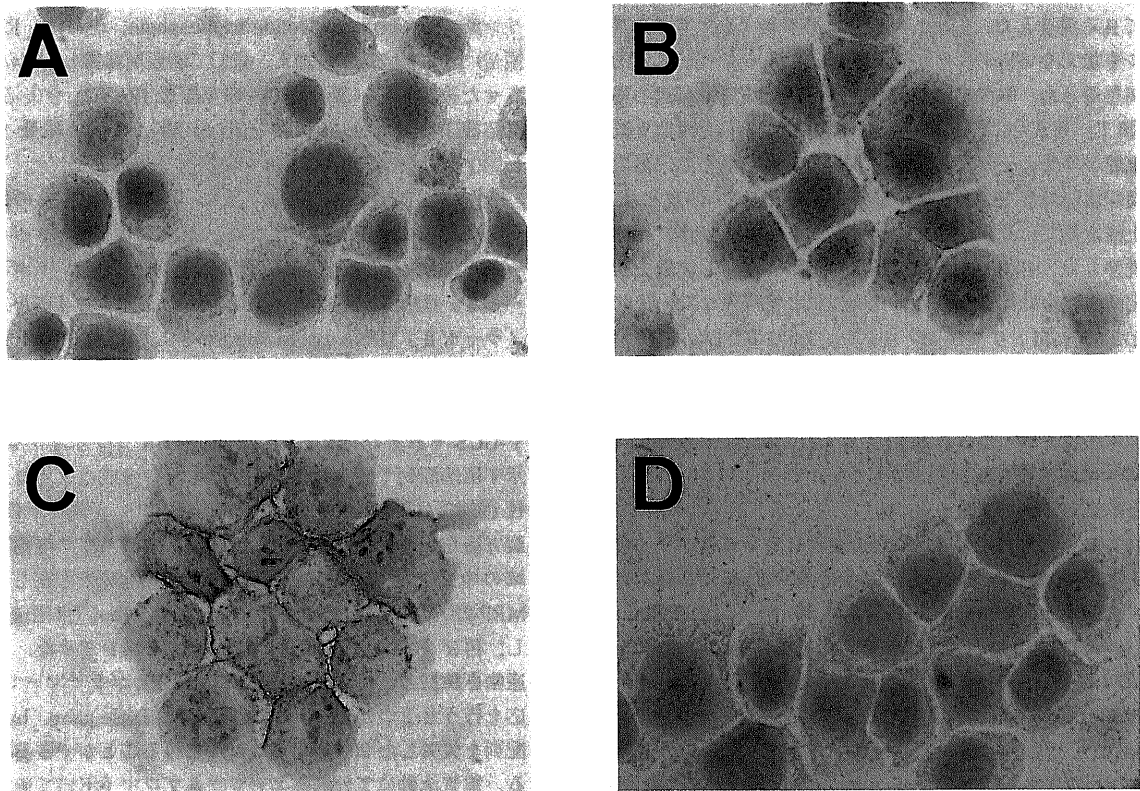


Fig. 2 Immunocytochemical staining for the detection of MRP and P-glycoprotein (P-gp) in the human tumor cell lines. (A) Drug sensitive HL60 cells. (B and D) Multidrug-resistant HL60/ADR4 cells. (C) P-gp-overexpressing multidrug-resistant K562/ADR cells. A and B were stained with a rat monoclonal antibody MRP1, and C and D were stained with a murine monoclonal antibody C219. MRP, multidrug resistance-associated protein.

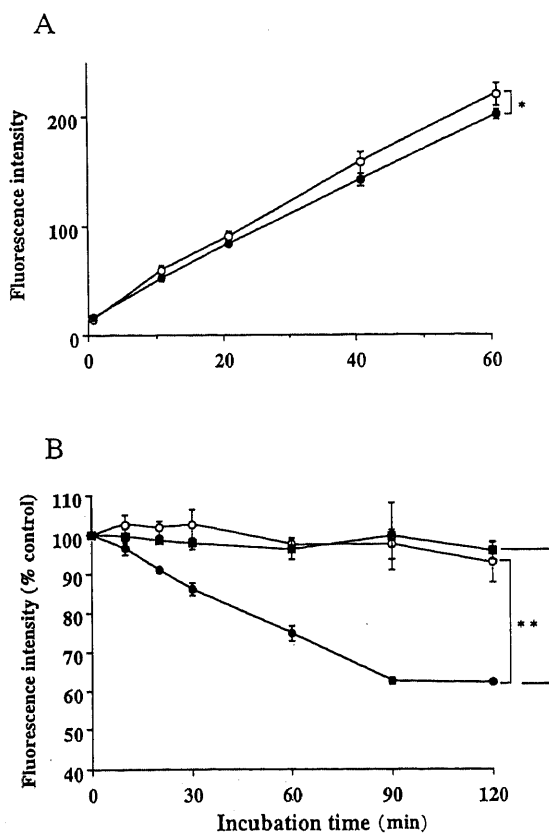


Fig. 3 Analysis of adriamycin uptake and efflux in the HL60 and the HL60/ADR4 cells. (A) Analysis of adriamycin uptake. The HL60 or the HL60/ADR4 cells were incubated at 37°C in the presence of the medium containing 10  $\mu$ M adriamycin. After incubation for various time periods cells were centrifuged and suspended in a fresh RPMI medium. The mean fluorescence intensity of the cells was analyzed by a flow cytometer. Values represent  $\bar{x} \pm$ SD of the three separate experiments.  $\circ$ , HL60;  $\bullet$ , HL60/ADR4. \* $p$ <0.05 compared by Student's t test. (B) Analysis of adriamycin efflux. The HL60 or the HL60/ADR4 cells were incubated in the presence of the medium containing 10  $\mu$ M adriamycin for 2 hrs. The cells were washed and further incubated with an adriamycin-free medium with or without 10  $\mu$ M verapamil. After incubation for various time periods the mean fluorescence intensity of the cells was analyzed by a flow cytometer. Values represent  $\bar{x} \pm$ SD of the three separate experiments.  $\circ$ , HL60 in the absence of verapamil;  $\bullet$ , HL60/ADR4 in the absence of verapamil;  $\blacksquare$ , HL60/ADR4 in the presence of verapamil. \*\* $p$ <0.01 compared by Scheffé's F test after Kruskal-Wallis test.

宝酒造) を用いてプラスミドベクターに挿入し, *E. coli* JM109 Competent Cells (宝酒造) に形質転換してクローニングした。単一コロニーを LB 培養液で培養し塩化セシウム密度勾配超遠心法にてプラスミド DNA を精製した。環状 DNA のままであ

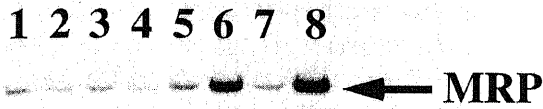


Fig. 4 Southern blot analysis of MRP gene amplification in drug sensitive and drug resistant human tumor cell lines. Genomic DNA from each cell line was digested with *Pst* I, subjected to an agarose gel electrophoresis, and then transferred to nylon membrane. The filters were hybridized with the digoxigenin-labeled probes specific for MRP gene. Lane1, the parent drug-sensitive K562 cells; lane2, methotrexate-resistant K562/MTX cells; lane3, adriamycin-induced MDR1-overexpressing multidrug-resistant K562/ADR cells; lane4, vincristine-induced MDR1-overexpressing multidrug-resistant K562/VCR cells; lane5, drug-sensitive human breast cancer cell line, MCF7/WT cells; lane6, etoposide-induced MRP-overexpressing multidrug-resistant subline, MCF7/VP cells; lane7, drug sensitive HL60 cells; lane8, adriamycin-induced multidrug-resistant HL60/ADR4 cells.

ると DNA の 3 次構造のため PCR の増幅効率にばらつきが出てくる可能性があることを考慮し, 精製したプラスミドを制限酵素 *EcoRI* (宝酒造) で 1ヶ所切断し直鎖 2 本鎖 DNA としてコントロール (競合) DNA に用いた。Topo I, Topo II $\alpha$ , Topo II $\beta$ ,  $\gamma$ -GCS に関しても MRP と同様の方法でコントロール DNA を作製した。それぞれに用いた制限酵素, 目的とする cDNA の PCR 産物の長さ, およびコントロール DNA の長さを表 1. に示した。

逆転写酵素による mRNA の cDNA への変換効率のばらつきを考慮し  $\beta$  アクチンにても同様に CRT-PCR 用のプライマーおよびコントロール DNA を設定した。図 1.B に示すように  $\beta$  アクチンのイントロン 4 は 95bp と短くこの部分を挟む PCR プライマーで増幅すれば DNA は 415bp に, cDNA (RNA) は 320bp に増幅される。ゲノム DNA を鋳型として増幅した PCR 産物を MRP の場合と同様にプラスミドベクターにクローニングし精製後, 制限酵素 *EcoRI* で消化しコントロール DNA を得た。

4. CRT-PCR 反応

それぞれ作製したコントロール DNA は, 260nm の吸光度を測定して DNA 濃度を計算し, 70fg/ $\mu$ l の濃度を 1 としてそれぞれ 2 倍希釈系列を作製した。PCR 反応はコントロール DNA, 試料 cDNA 各 5 $\mu$ l, 最終濃度 0.2 $\mu$ M の各プライマーおよび各 200 $\mu$ M の dNTP, PCR 反応緩衝液 [10mM Tris-HCl, pH8.3, 50mM KCl, 1.5mM MgCl<sub>2</sub> (MRP,  $\beta$  アクチンの場合), 2.0mM

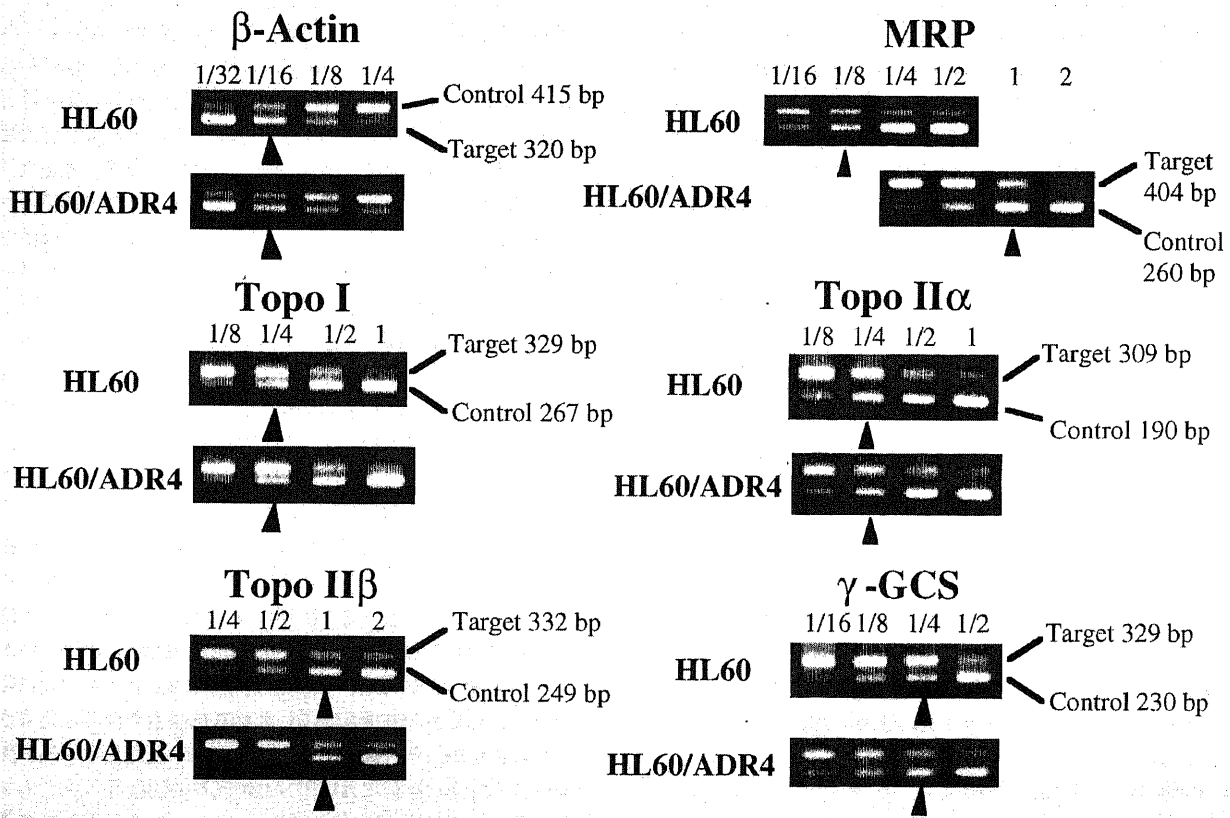


Fig. 5 Quantitative analysis of various mRNAs by the competitive RT-PCR method. The competitive RT-PCR was carried out using cDNA derived from the parent HL60 and the mutant HL60/ADR4 cells in combination with each control DNA for the detection of multidrug resistance-associated protein (MRP), DNA topoisomerase I (Topo I), DNA topoisomerase II $\alpha$  (Topo II $\alpha$ ), DNA topoisomerase II $\beta$  (Topo II $\beta$ ), and  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase ( $\gamma$ -GCS). The PCR products were subjected to 3% agarose gel electrophoresis, and bands were visualized by ultraviolet transillumination using ethidium bromide staining method.

MgCl<sub>2</sub> (Topo I, Topo II  $\alpha$ ,  $\gamma$ -GCSの場合), 2.5mM MgCl<sub>2</sub> (Topo II  $\beta$ の場合)], Taq DNA ポリメラーゼ (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, USA) 1.25単位を加え全量 50  $\mu$ l で行った。反応は DNA Thermal Cycler PJ 1000 (Perkin Elmer Cetus) を用い、94°C, 10分の初期変性の後、95°Cで1分、55°Cで1分、72°Cで2分のサイクルを40サイクル行った。βアクトンの PCR 反応は GeneAmp™ PCR system 9600-R を用い、94°C, 5分の初期変性の後、95°Cで30秒、56°Cで30秒、72°Cで30秒のサイクルを33サイクル行った。反応後10分の1量のタイプII泳動緩衝液(0.25%プロモフェノールブルー, 0.25%キシレンシアノール, 15%フィコール400)を加え、10  $\mu$ l を3%アガロースゲルに泳動しエチジウムブロマイド染色後、紫外線照射装置(トランスイルミネーター, フナコシ)上で観察した。

#### VII. 統計学的検討

2群間比較はまずF検定による等分散の検定を行い、分散が等しい時には Student's t 検定を、等しくない時には Weich's t 検定を行った。3群間比較はまず Kruskal-Wallis 検定を行った後に Scheffé's F 検定を行った。危険率5%未満をもって有意差有りとした。

### 成 績

#### I. 樹立した細胞株の薬剤感受性

各種抗癌剤に対する HL60 細胞, HL60/ADR4 細胞の薬剤感受性および HL60/ADR4 細胞の HL60 細胞に対する耐性を示す。HL60/ADR4 細胞の IC<sub>50</sub> 値は, ADR, VCR, ピラルビシン, エトポシドのいずれにおいても HL60 細胞の IC<sub>50</sub> 値に対して有意に高値を示した。それぞれの薬剤に対する耐性は2.3倍から5.7倍の範囲であった(表2)。

#### II. ADR 耐性におけるベラパミルの影響

HL60/ADR13 細胞を用いてベラパミルの影響を検討した。ベラパミルを加えることにより耐性は13.5倍から4.0倍と有意に低下した(表3)。

#### III. 免疫染色

HL60/ADR4 細胞では MRP に対するラットモノクローナル抗体 MRPr1 により細胞質, 細胞膜ともに同程度の強さで陽性に染色された(図2.B)。HL60 細胞は MRPr1 で染色されなかった(図2.A)。一方 HL60/ADR4 細胞は P 糖蛋白に対するマウスモノクローナル抗体 C219 で染色されなかった(図2.D)。陽性コントロールの P 糖蛋白発現 K562/ADR 細胞では C219 により細胞膜がより強く染色された(図2.C)。

#### IV. ADR の細胞内への取り込み, 細胞外への排出の測定

##### 1. 細胞内への取り込み

60分間の HL60 細胞, HL60/ADR4 細胞の平均蛍光強度の変化を図3.Aに示す。測定した60分間では HL60 細胞, HL60/ADR4 細胞ともに時間経過とともに平均蛍光強度が上昇した。60分後の平均蛍光強度は HL60/ADR4 細胞が HL60 細胞よりも低値を示しており、有意差を認めた。

##### 2. 細胞外への排出

120分間の HL60 細胞, HL60/ADR4 細胞の平均蛍光強度の変化を図3.Bに示す。HL60 細胞では120分間では平均蛍光強度はほとんど変化はなかった。一方 HL60/ADR4 細胞では時間経過とともに平均蛍光強度が低下しており、120分後には HL60 細胞と比較して有意に平均蛍光強度が低下した。しかしベラパミルを加えることにより HL60/ADR4 細胞でも120分間で平均

光強度は親株の HL60 細胞の平均蛍光強度に回復した。

#### V. サザンブロットハイブリダイゼーション

MRP に特異的なプローブを用いたサザンブロットハイブリダイゼーションの結果を図4に示す。MRP を発現している MCF7/VP 細胞および HL60/ADR4 細胞において MRP DNA の増幅が認められた。P 糖蛋白を発現している K562/ADR 細胞や K562/VCR 細胞, またそれぞれの親株である K562 細胞, MCF7/WT 細胞, HL60 細胞では MRP DNA の増幅は認められなかった。

#### VI. CRT-PCR による mRNA の定量

CRT-PCR の結果を図5に示す。コントロールとして用いた βアクトン mRNA の発現量は HL60 細胞, HL60/ADR4 細胞間で差を認めなかった。HL60/ADR4 細胞の MRP mRNA 発現量は HL60 細胞と比較して8倍であった。Topo I, Topo II  $\alpha$ , Topo II  $\beta$ ,  $\gamma$ -GCS に関しては両細胞株間で mRNA 発現量にほとんど差を認めなかった。

### 考 察

細胞の薬剤耐性に関わる要因として、多剤耐性に関与する P 糖蛋白や MRP, グルタチオンの関与する耐性, トポイソメラーゼの関与する耐性など様々な方面から研究が進められている。

P 糖蛋白は構造に類似性のない種々の抗癌剤等多くの薬剤と直接結合し, ATP 加水分解のエネルギーを用いてそれらを細胞外へ能動輸送している蛋白質であり<sup>9)</sup>, 主に細胞膜に発現し<sup>10)12)</sup>, MDR1 遺伝子によりコードされることが明らかになっている<sup>13)</sup>。臨床的にもモノクローナル抗体を用いた P 糖蛋白の検索や, 逆転写 PCR (reverse transcription-PCR, RT-PCR) 法を用いた MDR1 mRNA の検索などが多数行われており, 白血病, 悪性リンパ腫, 多発性骨髄腫などの血液腫瘍や, 腎癌, 膀胱癌, 乳癌, 肺癌, 卵巣癌, 消化器癌などの固形腫瘍でその発現や予後との関係などが報告されている<sup>10)15)</sup>。小児科領域でも急性白血病, 悪性リンパ腫などの血液腫瘍や小児期の代表的な固形腫瘍である神経芽細胞腫, 横紋筋肉腫, 網膜芽細胞腫などに関して多くの報告がなされている<sup>16)</sup>。しかし必ずしも P 糖蛋白の発現と細胞の耐性度や臨床的な予後とは相関せず, P 糖蛋白以外の耐性機序にも注目が集まるようになった。

MRP は P 糖蛋白の関与しない耐性機序の1つであり, 最初にヒト肺小細胞癌の ADR 耐性株より cDNA が分離, 解析された<sup>6)</sup>。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<sup>17)</sup>, その細胞内局在は細胞膜よりもむしろ小胞体に多く存在する事が明らかになっている<sup>18)19)</sup>。本研究で我々は MRP を過剰発現した細胞株 HL60/ADR4 および HL60/ADR13 を樹立し, 主に MRP の関与する多剤耐性に関して様々な角度から検討を行い, また P 糖蛋白の関与も免疫染色にて検討した。今回樹立した HL60/ADR4 細胞では, 各種抗癌剤の薬剤感受性試験において ADR 以外の抗癌剤に対しても耐性を示しており, 多剤耐性が確認された。従来報告されている MRP 発現多剤耐性株では選択培養液中の抗癌剤に対する耐性度は数十倍から数百倍の報告が多いが<sup>20)~25)</sup>, HL60/ADR13 細胞では選択培養液中の ADR を 100nM まで増加させて13.5倍の耐性度を得ることができた。耐性克服剤としてのベラパミルの効果はフローサイトメーターでの解析では, 耐性細胞における



ADR の細胞外への排出の亢進を完全に阻害している結果が得られた。しかし薬剤感受性試験では、従来の報告<sup>26)27)</sup>と同様にある程度の耐性克服効果は認められたが、完全に耐性を克服することはできなかった。HL60/ADR4 細胞では MRP に関して、免疫染色により蛋白質としての MRP の過剰発現、サザンブロット法により遺伝子の増幅、CRT-PCR 法により mRNA 発現量の増加を確認した。MRP 以外の耐性に関する要因としては P 糖蛋白は免疫染色により HL60/ADR4 細胞では発現していないことが確認された。薬剤選択培養液による耐性細胞の樹立では最初に MRP が発現し、その後 P 糖蛋白の発現が認められるとの報告<sup>28)</sup>があるが、今回は選択培養液に P 糖蛋白阻害剤であるセファランチンを加えることにより P 糖蛋白の発現を阻止することができた。

MRP を発現する細胞株では、抗癌剤の細胞外排出が亢進しているとする報告<sup>29)~24)29)</sup>がほとんどではあるが、亢進していないとする報告<sup>30)</sup>もあり、MRP の関係する耐性機序は P 糖蛋白の様な薬剤の細胞外排出の亢進だけでは説明できない。HL60/ADR4 細胞を用いて我々が行った ADR の蛍光を利用した機能解析では、ADR の細胞外への排出の亢進が確認され、HL60/ADR4 細胞における耐性機序の 1 つとして MRP が薬剤排出ポンプとして機能している事が示唆された。

これまでに MRP を発現した細胞株の報告がいくつか行われているが、その多くで同時に DNA トポイソメラーゼ II の量的または質的变化が見られている<sup>29)25)31)32)</sup>。DNA トポイソメラーゼは DNA の高次構造変換を触媒する酵素であり、Topo I は DNA に結合し、1 本鎖を切断し再結合を行い、Topo II は 2 本鎖を同時に切断し再結合を行う<sup>33)</sup>。カンプトテシンは Topo I を標的とする抗癌剤であり<sup>34)</sup>、ADR、エトポシドなどは Topo II を標的とする抗癌剤である<sup>35)</sup>。それぞれの薬剤はトポイソメラーゼと DNA との 3 者で DNA 切断複合体を形成し安定化することにより切断された DNA の再結合を阻害し、複製や転写を阻害し細胞に致死効果を与えると考えられている<sup>36)</sup>。トポイソメラーゼを介する耐性機序も P 糖蛋白の関与しない耐性機序として注目されている。これまでにトポイソメラーゼに関する耐性の報告として、構造遺伝子変異による酵素の耐性化、酵素発現量の低下による耐性化などが報告されている<sup>34)37)~39)</sup>。本研究で我々の検討した HL60/ADR4 細胞では、Topo I、Topo II  $\alpha$ 、Topo II  $\beta$  に関して CRT-PCR 法により mRNA の発現量を定量したが、いずれも HL60 細胞と HL60/ADR4 細胞の間で発現量に差を認めなかった。ただしいずれも実際の酵素活性や、遺伝子変異の有無までは確認しておらず、HL60/ADR4 細胞の耐性機序にトポイソメラーゼに関する要因が全くないとは言いきれない。

ATP 依存性グルタチオン抱合排出ポンプ (ATP dependent glutathione S-conjugate export pump, GS-X pump) はグルタチオンとシスプラチンの複合体を ATP 依存性に細胞外に能動輸送するポンプとしてシスプラチン耐性細胞での発現が報告されている<sup>40)</sup>。GS-X pump はアニオン性物質であるロイコトレンや酸化グルタチオン、グルタチオン抱合物、グルクロン酸抱合物、メソトレキセートなどを細胞外へ能動輸送することにより、炎症の際に生じる酸化物の代謝や、化学物質の代謝などに生理的に重要な役割を果たしており、また腫瘍細胞の薬剤耐性にも関わっている。近年遺伝子導入実験により MRP 遺伝子が GS-X pump をコードしている事が報告され、MRP/GS-X pump とも

呼ばれるようになっている<sup>41)~43)</sup>。 $\gamma$ -GCS はグルタチオンを合成する重要な酵素であり、MRP の発現と  $\gamma$ -GCS mRNA の発現が相関するという報告がなされている<sup>44)45)</sup>。我々の HL60/ADR4 細胞株では  $\gamma$ -GCS は CRT-PCR 法によりその mRNA の発現量の増幅は認められなかった。

また上記以外の耐性機序の一つとして canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) が報告されている。cMOAT は MRP と相同関係にある蛋白質としてマウスで単離され<sup>46)</sup>、後にヒトでも見つかった<sup>47)</sup>。cMOAT も P 糖蛋白、MRP と同様に ATP 結合カセットスーパーファミリーに属しており、生理的にはヒト肝細胞での発現が認められ、肝胆道系におけるグルタチオン抱合物質やグルクロン酸抱合物質などのアニオン性物質の分泌に関与している。またシスプラチン耐性細胞での過剰発現が確認されており、cMOAT がシスプラチンの細胞外への能動輸送に関与している可能性が示されている。今回我々の樹立した HL60/ADR4 細胞では cMOAT に関する検討は行っておらず、今後検討が必要であると思われる。

MRP と臨床との関係としてこれまでに神経芽細胞腫、急性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病、多発性骨髄腫、急性リンパ性白血病の再発例などで MRP の発現が報告されている<sup>48)~53)</sup>。悪性リンパ腫に関しては MRP の発現は弱いとする報告<sup>49)</sup>があるが、我々は MRP を強く発現した化学療法抵抗性の B 細胞性悪性リンパ腫の小児例を経験した。本例では免疫染色により MRP の発現が確認され、サザンブロット法では MPP DNA の増幅が認められた。CRT-PCR 法による患児の MRP mRNA の定量では今回樹立した HL60/ADR4 細胞と同程度の非常に強い MRP mRNA の発現が認められた。MRP DNA の増幅は、化学療法を繰り返し行ったことにより増幅の程度が強くなっている事が確認されており、MRP をより強く発現していたサブクローンが化学療法により選択された可能性、もしくは化学療法により個々の細胞で MRP が誘導され強く発現した可能性などが考えられた。本症例では免疫染色により P 糖蛋白が陰性であることが確認されており、本症例における化学療法抵抗性の一因として MRP の関与が考えられた。

## 結 論

ヒト前骨髄球性白血病 HL60 細胞株から ADR 選択により耐性株である HL60/ADR4 および HL60/ADR13 を樹立し以下の結論を得た。

1. HL60/ADR4 細胞は P 糖蛋白陰性で、MRP を過剰発現しており、薬剤感受性試験において多剤耐性を示した。
2. HL60/ADR13 細胞の ADR に対する耐性度はベラパミルにより部分的に阻害された。
3. HL60/ADR4 細胞では ADR の細胞内取り込みの低下、細胞外排出の亢進が見られた。細胞外排出の亢進はベラパミルによりほぼ完全に阻害された。
4. HL60/ADR4 細胞では MRP DNA の増幅、MRP mRNA の発現量の増加が認められた。
5. HL60/ADR4 細胞では Topo I、Topo II  $\alpha$ 、Topo II  $\beta$ 、 $\gamma$ -GCS に関しては mRNA の発現量の変化は認められなかった。

## 謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導と御校閲を賜りました恩師小泉晶一教授

に深甚なる感謝の意を表します。また遺伝子解析に関し直接御指導を賜りました小児科学講座新井田要先生、細胞培養に御協力頂きました松川はるみさんに心から感謝いたします。さらに本研究に多大の御協力を賜りました金沢大学小児科学教室の諸先生方ならびに研究助手の方々にも感謝いたします。本論文の要旨は第55回日本癌学会総会(1996年10月、於横浜)において発表した。

## 文 献

- 1) Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta* 455: 152-162, 1976
- 2) 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: 505-508, 1987
- 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: 381-389, 1986
- 4) Horio M, Gottesman MM, Pastan I. ATP-dependent transport of vinblastine in vesicles from human multidrug-resistant cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 3580-3584, 1988
- 5) Naito M, Tsuruo T. Competitive inhibition by verapamil of ATP-dependent high affinity vincristine binding to the plasma membrane of multidrug-resistant K562 cells without calcium ion involvement. *Cancer Res* 49: 1452-1455, 1989
- 6) Cole SPC, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC, Stewart AJ, Kurz EU, Duncan AMV, Deeley RG. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* 258: 1650-1654, 1992
- 7) Cole SPC, Deeley RG. Multidrug resistance-associated protein: sequence correction. *Science* 260: 879, 1993
- 8) Flens MJ, Izquierdo MA, Scheffer GL, Fritz JM, Meijer CJLM, Scheper RJ, Zaman GJR. Immunochemical detection of the multidrug resistance-associated protein MRP in human multidrug-resistant tumor cells by monoclonal antibodies. *Cancer Res* 54: 4557-4563, 1994
- 9) Gilliland G, Perrin S, Blanchard K, Bunn HF. Analysis of cytokine mRNA and DNA. Detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 2725-2729, 1990
- 10) Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159, 1987
- 11) Kartner N, Evernden-Porelle D, Bradley G, Ling V. Detection of P-glycoprotein in multidrug-resistant cell lines by monoclonal antibodies. *Nature* 316: 820-823, 1985
- 12) Hamada H, Tsuruo T. Functional role for the 170- to 180-kDa glycoprotein specific to drug-resistant tumor cells as revealed by monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 7785-7789, 1986
- 13) Ueda K, Cardarelli C, Gottesman MM, Pastan I. Expression of a full-length cDNA for the human "MDR1" gene confers resistance to colchicine, doxorubicin, and vinblastine. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 3004-3008, 1987
- 14) Marie PJ. P-glycoprotein in adult hematologic malignancies. *Hematol Oncol Clin North Am* 9: 239-249, 1995
- 15) Leighton JCJ, Goldstein LJ. P-glycoprotein in Adult Solid Tumors. Expression and Prognostic Significance. *Hematol Oncol Clin North Am* 9: 251-273, 1995
- 16) Chan HSL, DeBoer G, Haddad G, Gallie BL, Ling V. Multidrug Resistance in Pediatric Malignancies. *Hematol Oncol Clin North Am* 9: 275-318, 1995
- 17) McGrath T, Latoud C, Arnold ST, Safa AR, Felsted RL, Center MS. Mechanisms of multidrug resistance in HL60 cells. Analysis of resistance associated membrane proteins and levels of *mdr* gene expression. *Biochem Pharmacol* 38: 3611-3619, 1989
- 18) Marquardt D, McCrone S, Center MS. Mechanisms of multidrug resistance in HL60 cells. Detection of resistance-associated proteins with antibodies against synthetic peptides that correspond to the deduced sequence of P-glycoprotein. *Cancer Res* 50: 1426-1430, 1990
- 19) 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: 3658-3661, 1993
- 20) Schneider E, Horton JK, Yang CH, Nakagawa M, Cowan KH. Multidrug resistance-associated protein gene overexpression and reduced drug sensitivity of topoisomerase II in a human breast carcinoma MCF7 cell line selected for etoposide resistance. *Cancer Res* 54: 152-158, 1994
- 21) Zaman GJR, Flens MJ, van Leusden MR, de Haas M, Mulder HS, Lankelma J, Pinedo HM, Scheper RJ, Baas F, Broxterman HJ, Borst P. The human multidrug resistance-associated protein MRP is a plasma membrane drug-efflux pump. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 8822-8826, 1994
- 22) Slovak ML, Hoeltge GA, Dalton WS, Trent JM. Pharmacological and biological evidence for differing mechanisms of doxorubicin resistance in two human tumor cell lines. *Cancer Res* 48: 2793-2797, 1988
- 23) Deeley RG, Grant CE, Almquist KC, Hipfner DR, Valdimarsson G, Loe DW, Callen DF, Kuss B, Cole SPC. Multidrug resistance mediated by the 190kDa MRP, a novel member of the ATP-binding cassette transporter superfamily. *Proc American Assoc Cancer Res* 35: 698-699, 1994
- 24) Marsh W, Sicheri D, Center MS. Isolation and characterization of adriamycin-resistant HL-60 cells which are not defective in the initial intracellular accumulation of drug. *Cancer Res* 46: 4053-4057, 1986
- 25) Hasegawa S, Abe T, Naito S, Kotoh S, Kumazawa J, Hipfner DR, Deeley RG, Cole SP, Kuwano M. Expression of multidrug resistance-associated protein (MRP), MDR1 and DNA topoisomerase II in human multidrug-resistant bladder cancer cell lines. *Br J Cancer* 71: 907-913, 1995
- 26) Breuninger LM, Paul S, Gaughan K, Miki T, Chan A, Aaronson SA, Kruh GD. Expression of multidrug resistance-associated protein in NIH/3T3 cells confers multidrug resistance associated with increased drug efflux and altered intracellular drug distribution. *Cancer Res* 55: 5342-5347, 1995

- 27) Naito S, Hasegawa S, Yokomizo A, Koga H, Kotoh S, Kuwano M, Kumazawa J. Non-P-glycoprotein-mediated atypical multidrug resistance in a human bladder cancer cell line. *Jpn J Cancer Res* 86: 1112-1118, 1995
- 28) Slapak CA, Mizunuma N, Kufe DW. Expression of the multidrug resistance associated protein and P-glycoprotein in doxorubicin-selected human myeloid leukemia cells. *Blood* 84: 3113-3121, 1994
- 29) Cole SPC, Sparks KE, Fraser K, Loe DW, Grant CE, Wilson GM, Deeley RG. Pharmacological characterization of multidrug resistant MRP-transfected human tumor cells. *Cancer Res* 54: 5902-5910, 1994
- 30) Mirski SEL, Gerlach JH, Cole SPC. Multidrug resistance in a human small cell lung cancer cell line selected in adriamycin. *Cancer Res* 47: 2594-2598, 1987
- 31) Eijndems EWHM, Zaman GJR, de Haas M, Versantvoort CHM, Flens MJ, Scheper RJ, Kamst E, Borst P, Baas F. Altered MRP is associated with multidrug resistance and reduced drug accumulation in human SW-1573 cells. *Br J Cancer* 72: 298-306, 1995
- 32) Mirski SEL, Evans CD, Almquist KC, Slovak ML, Cole SPC. Altered topoisomerase II  $\alpha$  in a drug-resistant small cell lung cancer cell line selected in VP-16. *Cancer Res* 53: 4866-4873, 1993
- 33) Liu LF, Rowe TC, Yang L, Tewey KM, Chen GL. Cleavage of DNA by mammalian DNA topoisomerase II. *J Biol Chem* 258: 15365-15370, 1983
- 34) Tanizawa A, Pommier Y. Topoisomerase I alteration in a camptothecin-resistant cell line derived from Chinese hamster DC3F cells in culture. *Cancer Res* 52: 1848-1854, 1992
- 35) Tewey KM, Rowe TC, Yang L, Halligan BD, Liu LF. Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II. *Science* 226: 466-468, 1984
- 36) D'Arpa P, Liu LF. Topoisomerase-targeting antitumor drugs. *Biochim Biophys Acta* 989: 163-177, 1989
- 37) Tanizawa A, Bertrand R, Kohlhagen G, Tabuchi A, Jenkins J, Pommier Y. Cloning of Chinese hamster DNA topoisomerase I cDNA and identification of a single point mutation responsible for camptothecin resistance. *J Biol Chem* 268: 25463-25468, 1993
- 38) Gudkov AV, Zelnick CR, Kazarov AR, Thimmapaya R, Suttle DP, Beck WT, Roninson IB. Isolation of genetic suppressor elements, inducing resistance to topoisomerase II-interactive cytotoxic drugs, from human topoisomerase II cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 3231-3235, 1993
- 39) 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: 3951-3957, 1991
- 40) Ishikawa T, Ali-Osman F. Glutathione-associated *cis*-diamminedichloroplatinum (II) metabolism and ATP-dependent efflux from leukemia cells. *J Biol Chem* 268: 20116-20125, 1993
- 41) Muller M, Meijer C, Zaman GJR, Borst P, Scheper RJ, Mulder NH, de Vries EGE, Jansen PLM. Overexpression of the gene encoding the multidrug resistance-associated protein results in increased ATP-dependent glutathione S-conjugate transport. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 13033-13037, 1994
- 42) Leier I, Jedlitschky G, Buchholz U, Cole SPC, Deeley RG, Keppler D. The MRP gene encodes an ATP-dependent export pump for leukotriene C4 and structurally related conjugates. *J Biol Chem* 269: 27807-27819, 1994
- 43) 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: 988-994, 1996
- 44) Kuo MT, Bao JJ, Curley SA, Ikeguchi M, Johnston DA, Ishikawa T. Frequent coordinated overexpression of the MRP/GS-X pump and  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase genes in human colorectal cancers. *Cancer Res* 56: 3642-3644, 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: 14981-14988, 1996
- 46) Paulusma CC, Bosma PJ, Zaman GJR, Bakker CTM, Otter M, Scheffer GL, Scheper RJ, Borst P, Oude Elferink RPJ. Congenital jaundice in rats with a mutation in a multidrug resistance-associated protein gene. *Science* 271: 1126-1128, 1996
- 47) Taniguchi K, Wada M, Kohno K, Nakamura T, Kawabe T, Kawakami M, Kagotani K, Okumura K, Akiyama S, Kuwano M. A human canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) gene is overexpressed in cisplatin-resistant human cancer cell lines with decreased drug accumulation. *Cancer Res* 56: 4124-4129, 1996
- 48) Burger H, Nooter K, Sonneveld P, Wingerden KEV, Zaman GJR, Stoter G. High expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in chronic and polymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 88: 348-356, 1994
- 49) Beck J, Handgretinger R, Dopfer R, Klingebiel T, Niethammer D, Gekeler V. Expression of *mdr1*, *mrp*, topoisomerase II  $\alpha/\beta$ , and cyclin A in primary or relapsed states of acute lymphoblastic leukaemias. *Br J Haematol* 89: 356-363, 1995
- 50) Burger H, Nooter K, Zaman GJR, Sonneveld P, van Wingerden KE, Oostrum RG, Stoter G. Expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in acute and chronic leukemias. *Leukemia* 8: 990-997, 1994
- 51) Abbaszadegan MR, Futscher BW, Klimecki WT, List A, Dalton WS. Analysis of multidrug resistance-associated protein (MRP) messenger RNA in normal and malignant hematopoietic cells. *Cancer Res* 54: 4676-4679, 1994
- 52) Bördow SB, Haber M, Madafoglio J, Cheung B, Marshall GM, Norris MD. Expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) gene correlates with amplification and overexpression of the N-myc oncogene in childhood neuroblastoma. *Cancer Res* 54: 5036-5040, 1994
- 53) Schneider E, Cowan KH, Bader H, Toomey S, Schwartz GN, Karp JE, Burke PJ, Kaufmann SH. Increased expression of the multidrug resistance-associated protein gene in relapsed acute leukemia. *Blood* 85: 186-193, 1995

**Establishment and Characterization of a HL60 Cell Line Overexpressing Multidrug Resistance-associated Protein**  
Hideo Wada, Department of Pediatrics, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med Soc., **106**,  
2—12 (1997)

**Key words** multidrug resistance-associated protein, multidrug resistance 1, P-glycoprotein, DNA topoisomerase,  $\gamma$ -glutamylcystein synthetase

#### Abstract

A new human leukemic cell line, HL60/ADR4 and HL60/ADR13, resistant to adriamycin was established in a selection medium containing increasing concentrations of adriamycin (ADR) in the presence of 1  $\mu$ M cepharanthine, a multidrug resistance reversing agent. The HL60/ADR4 cells were resistant 4-fold (the ratio of IC<sub>50</sub> of the mutant cells to that of the parental cells) for ADR, and also cross-resistant to some other drugs, including vincristine (4.6-fold), pirarubicin (2.3-fold), and etoposide (5.7-fold). The HL60/ADR4 cells did not contain a level of P-glycoprotein detectable by immunocytochemical staining with a murine monoclonal antibody C219. In contrast, they exhibited the elevated expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) as shown immunocytochemically using a rat monoclonal antibody, MRPr1. The intracellular accumulation of ADR was decreased in the HL60/ADR4 cells and the efflux of ADR was enhanced as compared to that of the parental HL60 cells, which was reversed by the addition of 10  $\mu$ M verapamil. The MRP gene was amplified in the HL60/ADR4 cells. Competitive RT-PCR analysis revealed that the MRP mRNA level was increased 8-fold in the HL60/ADR4 cells as compared to the parent HL60 cells. The mRNA levels of DNA topoisomerase I, DNA topoisomerase II  $\alpha$ , DNA topoisomerase II  $\beta$ , and  $\gamma$ -glutamylcystein synthetase in the parent HL60 and the HL60/ADR4 cells were similar. These results indicate that MRP overexpression in the HL60/ADR4 cells due to the transcriptional activation as well as the amplification of the MRP gene is responsible for the reduced intracellular accumulation of ADR.