脳毛細血管内皮細胞におけるP糖蛋白の発現と機能に関する研究

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: 高畠, 靖志 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8323

金沢大学十全医学会雑誌　第101巻　第2号　356－364（1992）

脳毛細血管内皮細胞における P 糖蛋白の発現と機能に関する研究

金沢大学医学部脳神経外科学講座（主任：山下純宏教授）
高　畠　靖　志

（平成4年2月5日受付）

P糖蛋白は悪性腫瘍に対する化学療法の後に発現し得る分子量約 170kilodalton (kD) の膜糖蛋白で，ATP 依存性に抗癌剤を細胞外へ排出することにより多剤耐性に関与するとされている．P糖蛋白は副腎や腎，肝などの正常組織にも認められる一方，脳や睾丸の毛細血管にも特異的にみられることから，関門機能との関連が示唆されている．本研究においては，ウシ脳より精製した毛細血管内皮細胞の初代単層培養系を用いて，P糖蛋白に特異的に反応するモノクローナル抗体 C219 および MRK16 により生化学的，免疫組織化学的にP糖蛋白の発現を検索した．さらに，P糖蛋白の作用を阻害する種々の薬剤を用いて，培養内皮細胞へのビンクリスチンの取り込みを薬物動態学的に検討した．ウエスタンブロッティングでは，ウシ脳より精製した毛細血管内皮細胞において，分子量約 130kD のP糖蛋白が検出された．免疫組織化学的には，ウシ脳毛細血管内皮細胞，および初代培養脳毛細血管内皮細胞に特異的にP糖蛋白の発現が認められ，免疫電顕的には，内腔側の細胞膜に局在していた．初代単層培養系を用いた薬物動態実験では，MRK16 によりビンクリスチンの取り込みは有意に増加した．同様に，カルシウム拮抗剤（ベラパミル），およびステロイドホルモン（プロゲステロン，テストステロン）によっても有意の増加がみられた．一方，代謝阻害剤（アジ化ナトリウム，ジニトロフェノール）ではビンクリスチンの取り込みは増加したが，ブドウ糖添加により ATP 産生を賦活化すると取り込みは減少した．以上の結果より，P糖蛋白は脳毛細血管内皮細胞において薬剤を血管内腔側へ能動的に汲み出す作用があり，血液脳関門の機能の一端を担っていることが示唆された．また，カルシウム拮抗剤などにより薬剤の取り込みが増加することから，悪性脳腫瘍における化学療法への応用が期待される．

Key words　P糖蛋白，化学療法，血液脳関門，多剤耐性，脳毛細血管内皮細胞

悪性脳腫瘍に対して化学療法を行う場合，最大の問題は血液脳関門により薬剤の腫瘍組織内移行が制限されることにある．血液脳関門は古くから知られた概念であるが，1960年代より脳毛細血管内皮細胞そのものの関門機構が重視されてきた[1)2)]．すなわち，脳毛細血管内皮細胞は胞体が非常に薄いにもかかわらず有窓 (fenestration) 形成がみられず，飲み込み小胞 (pinocytosis) がきわめて少ない上，互いに密着帯 (tight junction) で接合している[3)]．したがって，血液脳関門を通過できるのは，ブドウ糖やアミノ酸など何らかの輸送担体が関与するもの，および，脂溶性の高いものなどに制限される[4)]．しかし，ビンクリスチンやアドリアマイシンなどは，脂溶性が高いにもかかわらず，血液脳関門の透過性はきわめて悪い[5)]．

1970年代後半よりこれらの薬剤により治療した後，多剤耐性を獲得した悪性腫瘍の細胞膜において，P糖蛋白という分子量約 170 kilodalton (kD) の糖蛋白が多量に発現している事実が報告された[6)~8)]．その後の研究でP糖蛋白には，腫瘍細胞内に取り込まれた薬剤を ATP 依存性に細胞外へ汲み出す作用があることが明らかにされた[9)~11)]．P糖蛋白は，副腎，腎，肝等の正常組織[12)13)]のみならず，脳や睾丸などの毛細血管内皮細胞にも発現が認められる[14)]ことより，関門機構との関連が示唆されている．しかし，P糖蛋白と血液脳関門との関連については未だ不明な点が多く，検討の余地がある．たとえば，P糖蛋白の阻害作用を持っているとされるカルシウム拮抗剤[15)]等により抗癌剤の血液脳関門透過性が高まれば，悪性脳腫瘍の化学療法に新しい方向性を見い出せる可能性がある．

そこで，本研究においては，Audus らによって開発されたウシ脳より精製した毛細血管内皮細胞の初代培養法[16)17)]を血液脳関門のモデルとして，P糖蛋白の発現及び，薬剤の移行に対する阻害作用について検討した．

材料および方法

Ⅰ．ウシ脳毛細血管内皮細胞の精製

Audus らの方法[16)17)]に従い，ウシ脳の灰白質より，毛細血管内皮細胞を分離，精製した．新鮮なウシ脳より表面の髄膜と血管を除去した後，大脳皮質を 1～2mm 大に細切し，0.5%のディスパーゼ入りのイーグルの最少必須培地 (minimum essential medium, MEM; Sigma, St. Louis, USA) 中で3時間振盪した．遠心後，13%デキストラン溶液中で遠心を重ね脳毛細血管の粗分画を分離し，1 mg/ml のコラーゲナーゼ/ディスパーゼを溶解した MEM に加え，37℃にて4.5時間振盪し内皮

Abbreviations: ABC, avidin-biotin peroxidase complex; BCEC, brain capillary endothelial cells; C/M ratio, cell/medium ratio; DNP, 2,4-dinitrophenol; kD, kilodalton; MEM, minimum essential medium; NaN_3, sodium azide; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; P-GP, P-glycoprotein; SDS, sodium dodecyl sulfate; VCR, vincristine; VPM, verapamil

細胞の粗分画を得た．沈渣を50%パーコールグラディエント上に加え遠心し，2層目のバンドを取り出し，さらに遠心して，沈渣を収集した．

Ⅱ．モノクローナル抗体

P糖蛋白に対するモノクローナル抗体としては，P糖蛋白の膜内側のエピトープを認識する C219[18] (Centocor Diagnostics, Pennysylvenia, USA) および，膜外側のエピトープを認識する MRK16[19] (東京大学応用微生物研究所，鶴尾隆教授より供与) を用いた．

Ⅲ．ウエスタンブロッティング

ウシ脳より精製した毛細血管内皮細胞の細胞膜を用いてウエスタンブロッティングを行った．

1．細胞膜の精製

Naito らの方法[11] により細胞膜を精製した．細胞を 10mM NaCl, 1.5mM $MgCl_2$, 0.02mM phenylmethylsulfonyl fluoride を含む 10mM トリス塩酸 (Tris-HCl) 緩衝液 (pH 7.4) 中で攪拌し，ホモジナイズした．遠心後，上清を35%ショ糖液上に重層し遠心した．境界面の膜画分を 250mM ショ糖入りの 10mM トリス塩酸 (Tris-HCl) 緩衝液中で攪拌し，さらに遠心し沈渣を得た．

2．ウエスタンブロッティング

ドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecyl sulfate, SDS) 電気泳動は，Laemmli 法[20] に従い7.5%ポリアクリルアミドゲルを用いて行い，分離された蛋白質をクリアブロットP膜 (ATTO, 東京) に転写した．このクリアブロットP膜をブロッキング用の緩衝液に1晩浸透し，1次抗体として C219 (100ng/ml) を3時間反応させた後，avidin-biotin peroxidase complex (ABC) 法にて抗原を検出した．陰性コントロールとしてヒト骨髄性白血病由来の細胞株である K562，陽性コントロールとしてそのアドリアマイシン耐性株である K562/ADM (いずれも東京大学応用微生物研究所，鶴尾隆教授より供与) を用いた．

Ⅳ．免疫組織化学的検索

1．ウシ脳組織

1）光学顕微鏡

新鮮なウシ脳の灰白質を4%パラホルムアルデヒドにより6時間固定した後，10%，15%，20%ショ糖液に4時間ずつ浸透させた．これを OCT compound (Miles, Elkhart, USA) を用いて凍結包埋し，クライオスタット (Miles Laboratories, Napelville, USA) で厚さ6μmの凍結切片を作製した．0.3%過酸化水素入りのメタノールにて内因性ペルオキシダーゼを阻止し，ウマ正常血清にて非特異的反応を阻止した後，1次抗体として，C219 (5μg/ml) を4℃で1晩反応させ，ABC elite kit[21] (Vector, Burlingame, USA) により抗原を検出した．1次抗体をマウス正常免疫グロブリン (DAKOPATTS, Glostrup, Denmark) に置換したものを陰性コントロールとした．

2）電子顕微鏡

光顕と同様に ABC 法を行った後，1%グルタールアルデヒドで20分間，後固定し，不完全グラハムーカルノフスキー液に30分間，完全グラハムーカルノフスキー液に15分間浸し，2%四酸化オスミウムを1時間反応させた．アルコール系列にて脱水した後，エポン樹脂に包埋し，無染色で H-600 型電子顕微鏡 (日立，東京) により観察した．

2．初代培養ウシ脳毛細血管内皮細胞

1）光学顕微鏡

組織培養用のチェンバースライド (Lab-Tek; Nunc, Naperville, USA) をラットテールコラーゲンタイプⅠ (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) とヒトファイブロネクチン (Boehringer Mannheim) でコートし乾燥させた後，その上にウシ脳より精製した毛細血管内皮細胞をまき，MEM 中で11日間培養した．培養液を洗浄後，4%パラホルムアルデヒドで30分間固定し，0.05%サポニン液に10分間浸した．1次抗体として MRK16 (10μg/ml) および C219 (5μg/ml) を用い，2次抗体として POD 標識抗マウス Ig, Fab フラグメント (Boehringer Mannheim) を用いた酵素抗体間接法，および ABC 法を行った．

2）電子顕微鏡

1次抗体として MRK16 (10μg/ml) を用い，ABC 法を行った後，エポン樹脂にて包埋して超薄切片を作製し，鉛染色を施し観察した．

Ⅴ．使用した薬剤

P糖蛋白により輸送される薬剤として [^{3}H] ビンクリスチン (6.0Ci/mmol, Amersham International, Buckinghamshire, UK) を用いた．対照として [^{14}C] ショ糖 (4.6mCi/mmol, New England Nuclear, Boston, USA) を用いた．P糖蛋白を阻害する薬剤としては MRK16，ジニトロフェノール，アジ化ナトリウム，ベラパミル，および7種のステロイドホルモン (和光純薬，大阪) を用いた．

Ⅵ．培養脳毛細血管内皮細胞におけるビンクリスチンの取り込み実験

1．取り込みの経時的変化

取り込み実験は Terasaki らの方法[22] に準じて行った．ウシ脳毛細血管内皮細胞を培養した直径19mmのディッシュに0.5μCi の [^{3}H] ビンクリスチンと，さらに細胞外液の補正 (Ⅷ参

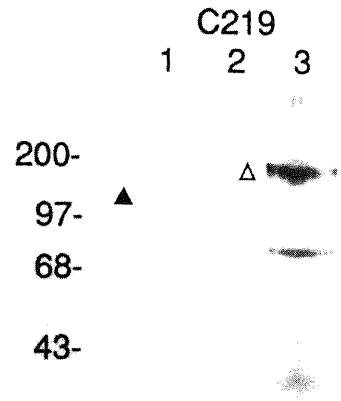

Fig. 1. Western blot analysis of the cell membrane fraction of isolated bovine brain capillary endothelial cells (BCEC) (lane 1), K562 cells (lane 2, negative control), and K562/ADM cells (lane 3, positive control). The proteins were fractionated by SDS-PAGE in 7.5% polyacrylamide gel, and were transferred onto a sheet of nylon membrane, which was stained with anti-P-glycoprotein monoclonal antibody C219 using the ABC method. The molecular weight markers in kilodalton (kD) are indicated on the left. The 170 kD band of K562/ADM cells (△) and the 130 kD band of bovine BCEC (▲) are indicated.

照) のために 0.1μCi の [^{14}C] ショ糖が入った実験用緩衝液 (141mM NaCl, 6.4mM KCl, 2.8mM $CaCl_2$, 1 mM $MgSO_4$, 10mM HEPES, 10mM ブドウ糖, 0.1%ウマ血清アルブミン; pH 7.4) を 250μl 加えた. その5, 10, 30, 60, 90分後に氷冷した実験用緩衝液を加えて反応を停止し吸引除去後, さらに同様の操作を2回繰り返して洗浄し, 1N 水酸化ナトリウム水溶液を加えて細胞を可溶化した. 5N 塩酸にて中和しクリアゾル I (半井, 京都) を加えた後, 液体シンチレーションカウンター LSC-1000 型 (アロカ, 東京) で細胞内のビンクリスチン量を測定した. 培養した脳毛細血管内皮細胞のタンパク量は Lowry らの方法[23]により測定した.

2. 薬剤によるビンクリスチン取り込みの阻害

あらかじめ, P糖蛋白を阻害する薬剤 (V参照) を加え30分間培養した. その後, 上述の方法に従い, 細胞内のビンクリスチン濃度を測定した.

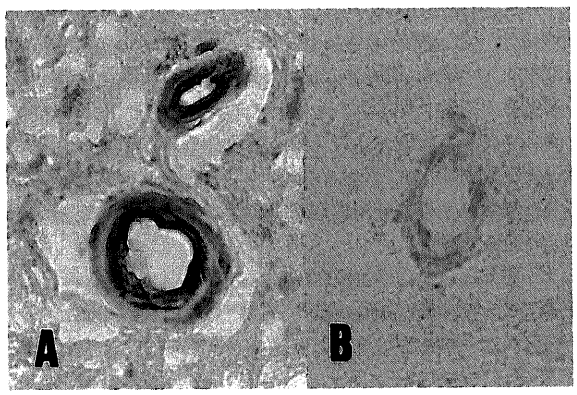

Fig. 2. Immunohistochemical staining of P-glycoprotein (P-GP) in the bovine gray matter using the C219 antibody. P-GP was detected on the luminal side of the brain capillary endothelial cells (A). (B) is negative control using mouse normal serum. Magnification, ×560.

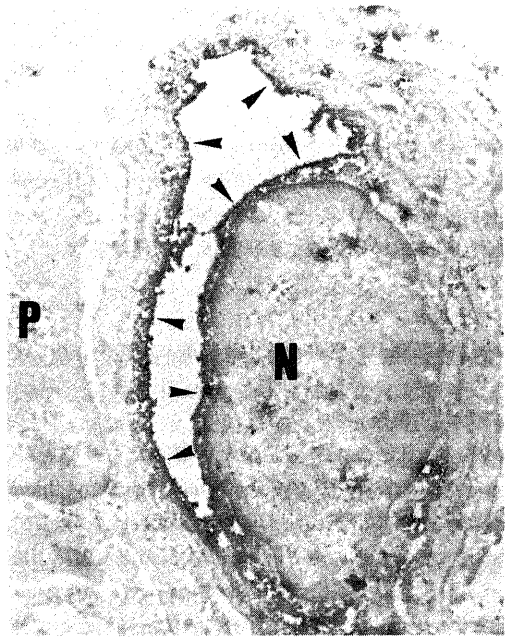

Fig. 3. Immunoelectron microscopy of P-GP in the bovine gray matter using the C219 antibody. P-GP was localized on the luminal side of the endothelial cells (arrowheads). N, nucleus; P, pericyte. Magnification, ×10,500.

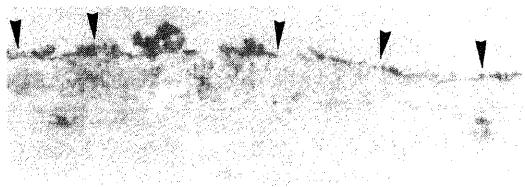

Fig. 5. Immunoelectron microscopy of P-GP in the primary-cultured bovine BCEC. P-GP was localized on the luminal side of the membrane (arrowheads). Magnification, ×25,000.

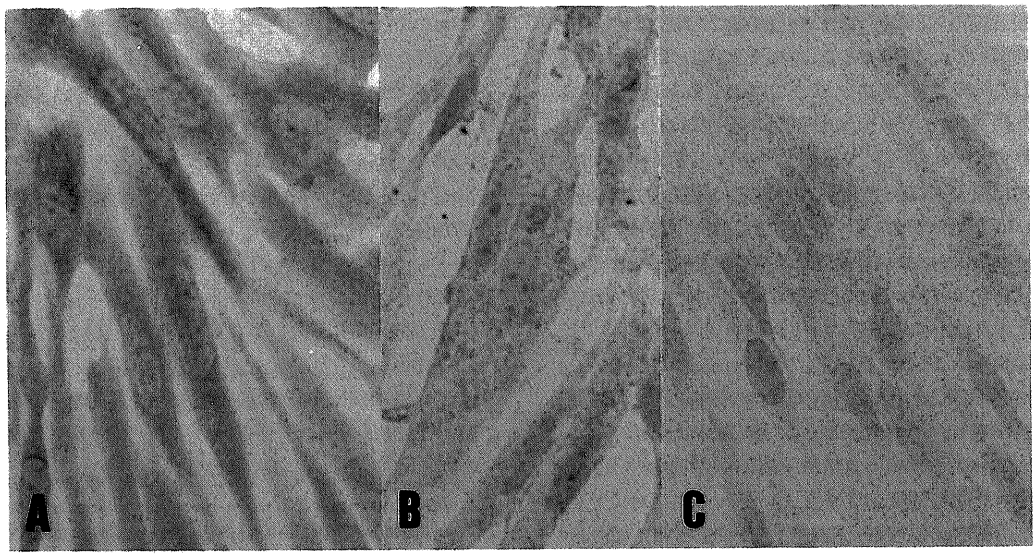

Fig. 4. Immunohistochemical staining of P-GP in the primary-cultured bovine BCEC. P-GP stained using the MRK16 antibody was distributed diffusely in the cytoplasm (A), while the protein was stained as granules in the cytoplasm using the C219 antibody (B). (C) is negative control using mouse normal serum. Magnification, ×560.

Ⅶ．培養脳毛細血管内皮細胞におけるビンクリスチンの汲み出し実験

代謝阻害剤であるジニトロフェノールを1mM 含む実験用緩衝液に［^{3}H］ビンクリスチンを加え，ブドウ糖無添加または添加の状態で5，15，30，60，65，75，90分後に反応を停止させ，細胞内に取り込まれたビンクリスチン量を測定した．さらにブドウ糖無添加のものに，Skovsgaard の方法[24]に従い，60分後に10mM ブドウ糖を加え培養を続行して，65，75，90分後の細胞内のビンクリスチン量を測定した．また，60分後に10mM ブドウ糖と共に200μM のベラパミルを加え，その効果を検討した．

Ⅷ．細胞内ビンクリスチン分布容積の計算

測定値より，細胞外薬液濃度に対する細胞内薬物量の比(cell/medium 比，C/M 比)を求めた．すなわち，測定した細胞内［^{3}H］ビンクリスチンおよび［^{14}C］シヨ糖の値をタンパク1mg あたりに換算し，加えた薬液濃度で割り C/M 比（μl/mg protein）を算出した．シヨ糖は脳毛細血管内皮細胞を透過しないことから，シヨ糖の値は細胞外の付着水の値として見かけの C/M 比から差し引いて真のビンクリスチンの C/M 比を計算した．

Ⅸ．統計学的検討

ビンクリスチン取り込みの時間経過と汲み出し実験においては C/M 比を平均値±標準誤差（mean±S.E.M.）μl/mg protein で表した．また，ビンクリスチン取り込みの阻害実験は，対照群の C/M 比を100％とし，平均値±標準誤差(mean±S.E.M.)％で表した．さらに，各測定値の比較検定には，Student の t 検定を用い，危険率 $p<0.05$の場合に有意差ありとした．

成　　績

Ⅰ．ウエスタンブロッティング

陽性コントロールの K562/ADM では，分子量約 170kD の位置にP糖蛋白の強いバンドが認められたのに対し，精製したウシ脳毛細血管内皮細胞では，分子量約 130kD の位置に弱いバンドが認められた（図1）．

Ⅱ．免疫組織化学

1．ウシ脳組織

1）光学顕微鏡

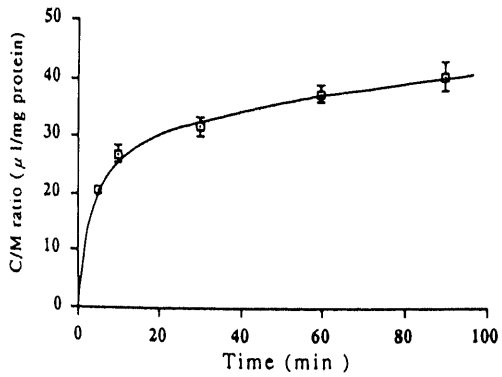

Fig. 6. Time course of［^{3}H］vincristine (VCR) uptake (□—□) into the primary-cultured bovine BCEC. The VCR uptake is indicated as cell/medium (C/M) ratio as described in Methods. n=4.

ウシ脳組織においては，毛細血管内皮細胞のことに内腔側の細胞膜が抗P糖蛋白モノクローナル抗体 C219 により強く染色された（図2）．

2）電子顕微鏡

P糖蛋白の発現は，ウシ脳毛細血管内皮細胞の内腔側の細胞膜に局在していた（図3）．

2．培養ウシ脳毛細血管内皮細胞

1）光学顕微鏡

培養ウシ脳毛細血管内皮細胞は抗P糖蛋白モノクローナル抗体 MRK16 に対して陽性，C219 に対しては弱陽性を示した．P糖蛋白は，MRK16 では紡錘形の細胞質全体に均一に分布しているのに対し（図 4A），C219 では顆粒状に分布していた（図 4B）．

2）電子顕微鏡

割断面では，コラーゲンとファイブロネクチンの上に横たわ

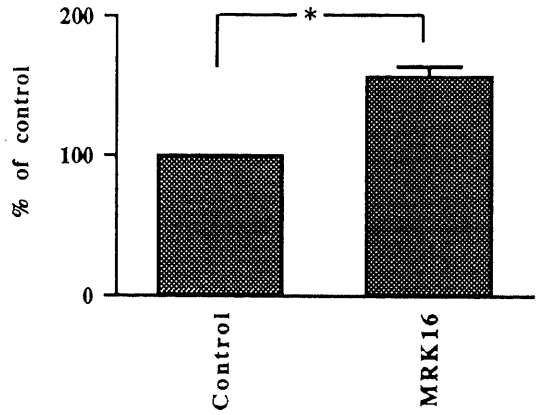

Fig. 7. Effect of the MRK16 antibody on the uptake of［^{3}H］VCR into the primary-cultured bovine BCEC. The cells were preincubated in the presence of 10μg/ml of the MRK16 antibody for 30minutes and then incubated with［^{3}H］VCR for 60 minutes. The uptake is indicated as the percentage of the control (100%). n=4, ＊$p<0.05$.

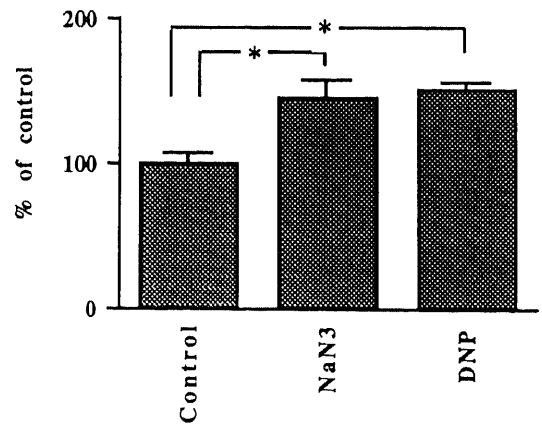

Fig. 8. Effect of metabolic inhibitors on the uptake of［^{3}H］VCR into the primary-cultured bovine BCEC. After preincubation in the presence of 10mM of sodium azide (NaN_3) or 1 mM of 2,4-dinitrophenol (DNP) for 30 minutes, the cells were incubated with［^{3}H］VCR for 60 minutes. The uptake is indicated as the percentage of the control (100%). n=4, ＊$p<0.05$.

るウシ脳毛細血管内皮細胞の表面側，すなわち，血管内腔側の細胞膜にP糖蛋白の発現が認められた（図5）．

Ⅲ．培養ウシ脳毛細血管内皮細胞におけるビンクリスチンの取り込み

1．経時変化

培養脳毛細血管内皮細胞におけるビンクリスチンの取り込みは経時的に上昇するが，60分後にはほぼ平衡状態に達した（図6）．

2．P糖蛋白の阻害効果

1）モノクローナル抗体：MRK16

P糖蛋白のモノクローナル抗体であるMRK16を10μg/mlの濃度で作用させた場合，細胞内ビンクリスチン濃度は対照群を100%とすると156.5±7.6%と有意に増加していた（図7）．

2）代謝阻害剤

アジ化ナトリウム（10mM）を作用させた場合，細胞内ビンクリスチン濃度は145.0±12.4%，ジニトロフェノール（1mM）では151.0±5.5%と，いずれも対照群と比較して有意に増加していた（図8）．

3）カルシウム拮抗剤：ベラパミル

ベラパミルを作用させた場合，5μMでは細胞内ビンクリスチン濃度は124.1±15.4%，50μMでは137.2±19.6%，500μMでは154.0±21.5%と，対照群と比較して，いずれの濃度においても有意に増加していた．ベラパミル濃度が上がるにつれ増加する傾向にあったが，各濃度間での有意差は認められなかった（図9）．

5）ステロイドホルモンによる効果

各種ステロイドホルモンによる効果を各薬剤とも100μMの濃度で検討した（図10）．細胞内ビンクリスチン濃度は，対照群と比較すると，ハイドロコーチゾンでは88.7±3.8%，プレドニゾロンでは102.0±9.1%，ベタメサゾンでは86.4±3.5%，デキサメサゾンでは84.6±4.1%，β－エストラジオールでは104.2±15.4%，プロゲステロンでは238.4±19.5%，テストステロンでは174.1±25.3%であった．すなわち，プロゲステロンおよびテストステロンでは，有意に細胞内のビンクリスチン濃度が増加していたが，他のステロイドホルモンでは，対照群と同程度であった．

3．汲み出し実験

ジニトロフェノール（1mM）を加えたブドウ糖無添加群では90分までビンクリスチン濃度が上昇した．しかし，ブドウ糖添加群では60分値で108.7±9.3μl/mg proteinとブドウ糖無添加群158.3±3.3μl/mg proteinに比べ31.4%減少していた．ブドウ糖無添加群の60分後にブドウ糖を加えると，速やかにブドウ糖を加えた群の曲線付近まで減少したが，同時にベラパミルを加えるとほぼ横ばいとなり，ビンクリスチンの取り込みの低下は抑制された（図11）．

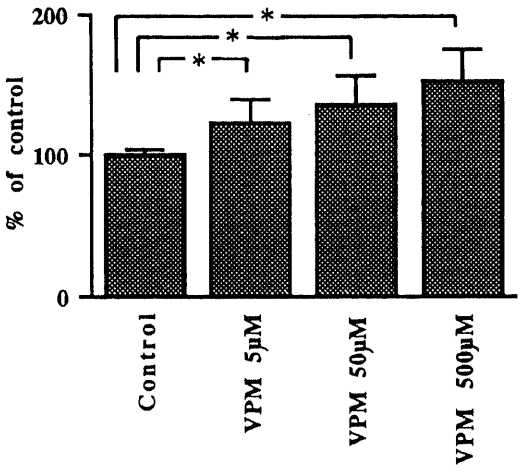

Fig. 9. Effect of verapamil on the uptake of [^{3}H] VCR into the primary-cultured bovine BCEC. The cells were preincubated in the presence of 5μM, 50μM, or 500μM of verapamil for 30 minutes, and then incubated with [^{3}H] VCR for 60 minutes. The uptake is indicated as the percentage of the control (100%). n=4, ＊p<0.05.

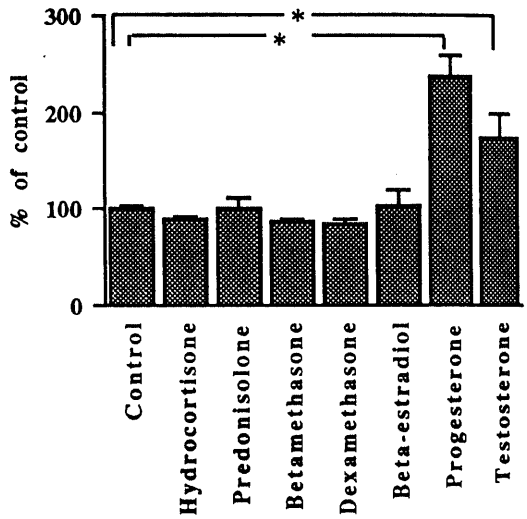

Fig.10. Effect of various steroid hormones on the uptake of [^{3}H] VCR into the primary-cultured bovine BCEC. The cells were preincubated in the presence of 100μM of each steroid hormone for 30 minutes, and then incubated with [^{3}H] VCR for 60 minutes. The uptake is indicated as the percentage of the control (100%). n=4, ＊p<0.05.

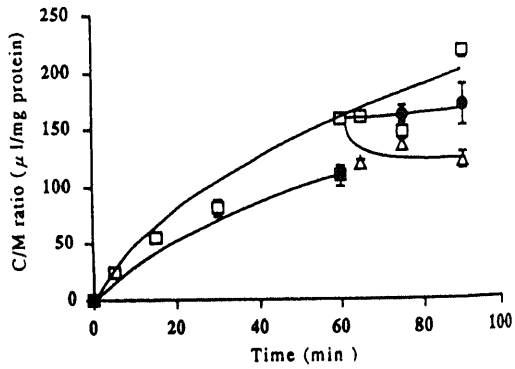

Fig.11. Effect of glucose and verapamil on [^{3}H] VCR efflux from the primary-cultured bovine BCEC. The cells were incubated in the absence (□－□) or in the presence of 10mM glucose (■－■). After incubation for 60 minutes without glucose, 10mM glucose (△－△) or 10mM glucose with 200μM verapamil (●－●) were added to the cells. VCR retained within the cells was determined at various times as described in Fig. 6. n=4.

考　　察

癌細胞がある種の抗癌剤に対して耐性を獲得すると，同時に他のいくつかの抗癌剤に対しても耐性を獲得する，いわゆる多剤耐性現象は1970年代に発見された．1976年 Juliano らは，コルヒチンにより耐性化したチャイニーズハムスター卵巣細胞の細胞膜に，耐性獲得前の細胞にはみられない分子量約 170kD の膜蛋白の発現を認め，P糖蛋白と名付けた[6]．1981年 Tsuruo らは，ビンクリスチン耐性の培養白血病細胞 P388/VCR に対してカルシウム拮抗剤であるベラパミルを投与すると，ビンクリスチンの細胞外への排出が阻害されるためビンクリスチン耐性を克服できることを報告した[15]．その後，ジルチアゼムやニカルジピンなどのカルシウム拮抗剤[25]，トリフロペラジンなどのカルモジュリン阻害剤[26]，キニジン[27]，サイクロスポリンA[28]，およびある種のステロイドホルモン[29)30)]なども，同様に多剤耐性を克服する作用を持つことが報告されてきた．一方，P糖蛋白をコードする多剤耐性遺伝子 mdr1[31)]は，Riordan ら[32)]，Roninson ら[33)]により，それぞれ耐性化したチャイニーズハムスター卵巣細胞やヒト上咽頭癌 KB 細胞からクローニングされた．mdr1 とその cDNA[34)]の構造を解析することにより，P糖蛋白は1280のアミノ酸残基よりなり，前半部と後半部とは類似の構造を示すこと，それぞれに1ケ所ずつ ATP 結合部位があること，および膜を12回貫通し，膜の外側に糖鎖結合部位を持つことなど[35)36)]が明らかにされた．

Kartner ら[18)]，Hamada ら[19)]，Scheper ら[37)]は，それぞれ C219，MRK16，JSB-1 というP糖蛋白に対するモノクローナル抗体を作製した．これらを用いた免疫組織化学的検索[13)14)]や，ノーザンハイブリダイゼーションによる mRNA の検出[12)]により，P糖蛋白は耐性化腫瘍細胞ばかりではなく正常組織にも発現していることがわかった．すなわち，副腎，腎，肝，膵，結腸など[13)]のみならず，脳と睾丸の毛細血管内皮細胞にも特異的にP糖蛋白の発現が認められた[14)]．脳と睾丸はいずれも関門機構の存在する器官であることより，P糖蛋白の発現と関門機構との関連が示唆された．菅原らは，MRK16 を用いてヒト脳の毛細血管内皮細胞におけるP糖蛋白の発現を電子顕微鏡により調べ，その内腔側細胞膜にP糖蛋白が発現していることを報告した[38)]．しかし，脳毛細血管内皮細胞におけるP糖蛋白の機能については，これまで検索がなされていない．

脳毛細血管内皮細胞の培養については，1978年に Panula らがラットで試みて[39)]以来，いくつかの報告がなされている．Bowman らは1983年にウシ脳より多量の毛細血管内皮細胞を取り出し培養したところ，細胞間には密着帯が形成されることを報告した[40)]．また，Audus らは，アルカリフォスファターゼやγ-グルタミルトランスペプチダーゼなどの脳毛細血管内皮細胞に特異的な酵素活性が培養下においても保たれていることを報告した[16)]．しかし，生体内において毛細血管内皮細胞を支持し様々な抑制を行っていると推定されている星状膠細胞がない培養下の状態では，密着帯の形成は不十分であり脳毛細血管に特異的な蛋白の発現は少ないと言われている[41)~43)]．しかしながら，初代培養条件下の内皮細胞は，脳より分離した毛細血管内皮細胞に比べて生育能力が高く，しかも細胞膜の極性を維持して内腔側が表面を向くなどの利点があり[22)44)]，血液脳関門の輸送モデルとして有用である．

本研究においても，ウシ脳切片の免疫組織化学的検索では，P糖蛋白の発現は毛細血管内皮細胞の内腔側の細胞膜に強く認められたが，培養細胞ではその発現は弱かった．しかし，免疫電顕では血管内腔側に相当する細胞膜に局在しており，脳組織における所見と一致した．さらに，ビンクリスチンの取り込み実験においても MRK16 によるP糖蛋白の阻害効果が現われていたことより，モノクローナル抗体の対象となるP糖蛋白が存在することは明らかである．一方，ウエスタンブロッティングでは，陽性コントロールとして用いた K562/ADM のP糖蛋白のバンドが分子量約 170kD の位置に認められたのに対し，ウシ脳の毛細血管内皮細胞のP糖蛋白のバンドは分子量約 130kD の位置に存在していた．これは，P糖蛋白の分子量は臓器や動物種により異なっており[45)~48)]，たとえば，ウシ副腎のP糖蛋白はウエスタンブロッティングでは分子量約 130kD 付近にバンドが認められると報告されている[47)]ことに対応すると考えられる．

白血病の細胞株である P388 や上咽頭癌の細胞株である KB などにビンクリスチンやアドリアマイシンなどの抗癌剤を用いて耐性を誘導した細胞株において，カルシウム拮抗剤やカルモジュリン阻害剤などを用いると，抗癌剤の細胞内濃度が高まり，抗癌剤が効果を発揮したという報告は従来より数多くなされている[15)25)~30)]．本研究においては，正常脳毛細血管内皮細胞においても同様に，種々の薬剤によるP糖蛋白に対する阻害効果が認められた．たとえば，カルシウム拮抗剤であるベラパミルを用いた取り込み実験において，ビンクリスチンの細胞内取り込みは有意に増加した．これは，ベラパミルがビンクリスチンと拮抗してP糖蛋白により細胞外へ排出されたために，細胞内のビンクリスチン濃度が相対的に高まったためと推定された．また，ATP の阻害剤であるアジ化ナトリウム，ジニトロフェノールを用いたブドウ糖無添加の取り込み実験において，ビンクリスチンの細胞内取り込みが増加したが，これは ATP 依存性のP糖蛋白の薬剤排出作用が阻害されたためと推定された．ブドウ糖の添加では細胞内のビンクリスチン濃度が低下したが，これはブドウ糖により ATP が産生されP糖蛋白が活性化された結果，汲み出し機構が亢進したためと思われた．

P糖蛋白は，正常の副腎においても強い発現が認められることから，ステロイドホルモンの分泌との関連が示唆されている[29)]．多剤耐性細胞株やマウス妊娠子宮内膜細胞を用いた実験では，プロゲステロンやテストステロンなどを用いても，ビンクリスチンやビンブラスチンの取り込みが増加している[29)30)]．Yang らは，P糖蛋白に対する阻害効果はステロイドホルモンの疎水性と相関し，疎水性が強いほど阻害効果も強いことを示した[29)]．本研究では，初代培養脳毛細血管内皮細胞においても，プロゲステロンとテストステロンにより細胞内のビンクリスチンの取り込みが増加した．1945年の Prados らの報告[49)]以来，脳浮腫に対してはある種のステロイドホルモンが有効とされている．その作用機序は，血液脳関門の保護および修復作用，細胞膜の透過性亢進の抑制等が考えられている[50)51)]が，依然明確な説明はなされていない．本研究でも，ハイドロコーチゾン，プレドニゾロン，デキサメサゾン，ベタメサゾンなど悪性脳腫瘍の化学療法の際にしばしば併用されている薬剤は，比較的疎水性が弱く，ビンクリスチンの取り込みは増加せず，これらの薬剤にはP糖蛋白を介した抗癌剤の取り込みは増強作用はないものと考えられた．

本研究の結果からは，脂溶性が高いにもかかわらず，血液脳

関門を透過しにくいビンクリスチンやアドリアマイシンなどの薬剤は，脳毛細血管内皮細胞においてP糖蛋白により排出されることが示唆された．今後，悪性脳腫瘍に対する化学療法に際して，カルシウム拮抗剤等を併用すれば，抗癌剤の血液脳関門における移行は増加することが期待される．しかし，カルシウム拮抗剤には本来，降圧作用や血管拡張作用等があるため，実際P糖蛋白に拮抗するように大量投与を行うと低血圧や不整脈をきたした症例が報告されている[52)53)]ので慎重を期すべきである．また，脳毛細血管内皮細胞の取り込み増加により，抗腫瘍効果の増大が期待される反面，過度の抗癌剤が正常脳組織に到達することによる神経毒性が懸念される．いずれにしろ，今後，悪性脳腫瘍に対して化学療法を行う場合には，脳毛細血管内皮細胞におけるP糖蛋白の存在を考慮に入れる必要があると思われる．

結　　論

ウシ脳より精製した毛細血管内皮細胞の初代単層培養系におけるP糖蛋白の発現と機能について，生化学的，免疫組織化学的，ならびに薬物動態学的に検討した．

1．生化学的ならびに免疫組織化学的には，ウシ脳の毛細血管内皮細胞と培養脳毛細血管内皮細胞の両者においてP糖蛋白の発現が認められた．しかし，培養下ではP糖蛋白の発現は比較的弱かった．

2．免疫電顕的には，ウシ脳および培養下のいずれにおいても，P糖蛋白は毛細血管内皮細胞の内腔側の細胞膜に局在していた．

3．P糖蛋白に対するモノクローナル抗体であるMRK16を初代単層培養系に加えると，脳毛細血管内皮細胞のビンクリスチンの取り込みは有意に増加した．

4．カルシウム拮抗剤であるベラパミルや，ステロイドホルモンであるプロゲステロンやテストステロンなどはP糖蛋白を阻害する作用を持つため，これらを初代培養系に加えると，脳毛細血管内皮細胞のビンクリスチンの取り込みは増加した．

5．初代単層培養系にATPの阻害剤を加えると，脳毛細血管内皮細胞のビンクリスチンの取り込みは増加した．その後，ブドウ糖添加によりATP産生を活性化するとビンクリスチンの取り込みは減少したが，この効果はベラパミルにより抑制された．

6．以上より，P糖蛋白は，脳毛細血管内皮細胞においてビンクリスチンを内皮細胞から血管内腔側へ汲み出す機能を持ち，血液脳関門機構に関与している可能性がある．

謝　　辞

稿を終えるに臨み，終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました恩師山下純宏教授に深甚の謝意を表します．また，直接御指導を頂きました脳神経外科学教室山嶋哲盛助教授，薬学部製剤学教室辻彰教授，寺崎哲也助教授，および玉井郁巳助手に深謝いたします．さらに，貴重なモノクローナル抗体MRK16とヒト骨髄性白血病細胞株K562，K562/ADMを御提供下さいました東京大学応用微生物研究所鶴尾隆教授，ウシ脳を御提供下さいました金沢市衛生検査課食肉検査室に厚く御礼申し上げます．共同で本研究を行った薬学部製剤学教室天田由幸修士，ならびに御協力頂きました脳神経外科学教室の諸先生，薬学部製剤学教室の諸氏，電子顕微鏡センター横田輝一氏ならびに脳神経外科学教室今村明子技官に感謝の意を表します．

なお，本研究の一部は，第29回日本癌治療学会（大阪，1991），第50回日本脳神経外科学会総会（京都，1991），第9回日本脳腫瘍カンファランス（和倉，1991）において発表した．

文　　献

1) **Reese, T. S. & Karnovsky, M. J.**: Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. J. Cell Biol., **34**, 207-217 (1967).

2) **Brightman, M. W. & Reese, T. S.**: Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. J. Cell Biol., **40**, 648-677 (1969).

3) **平野朝雄**：神経病理を学ぶ人のために，第2版，184-196頁，医学書院，東京，1986.

4) **Pollay, M. & Roberts, P. A.**: Blood-brain barrier: A definition of normal and altered function. Neurosurgery, **6**, 675-685 (1980).

5) **Levin, V. A.**: Relationship of octanol/water partition coefficient and molecular weight to rat brain capillary permeability. J. Med. Chem., **23**, 682-684 (1980).

6) **Juliano, R. L. & Ling, V.**: A surface glycoprotein modulating drug permeability in chinese hamster ovary cell mutants. Biochim. Biophys. Acta, **455**, 152-162 (1976).

7) **Beck, W. T., Mueller, T. J. & Tanzer, L. R.**: Altered surface membrane glycoproteins in vinca alkaloid-resistant human leukemic lymphoblasts. Cancer Res., **39**, 2070-2076 (1979).

8) **Inaba, M., Kobayashi, H., Sakurai, Y. & Johnson, R. K.**: Active efflux of daunorubicin and adriamycin in sensitive and resistant sublines of P388 leukemia. Cancer Res., **39**, 2200-2203 (1979).

9) **Hamada, H. & Tsuruo, T.**: Purification of the 170- to 180-kilodalton membrane glycoprotein associated with multidrug resistance. 170- to 180-kilodalton membrane glycoprotein is an ATPase. J. Biol. Chem., **263**, 1454-1458 (1988).

10) **Hamada, H. & Tsuruo, T.**: Characterization of the ATPase activity of the Mr 170,000 to 180,000 membrane glycoprotein (P-glycoprotein) associated with multidrug resistance in K562/ADM cells. Cancer Res., **48**, 4926-4932 (1988).

11) **Naito, M., Hamada, H. & Tsuruo, T.**: ATP/Mg^{2+}-dependent binding of vincristine to the plasma membrane of multidrug-resistance K562 cells. J. Biol. Chem., **263**, 11887-11891 (1988).

12) **Fojo, A. T., Ueda, K., Slamon, D. J., Poplack, D. G., Gottesman, M. M. & Pastan, I.**: Expression of a multidrug-resisitance gene in human tumors and tissues. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **84**, 265-269 (1987).

13) **Thiebaut, F., Tsuruo, T., Hamada, H., Gottesman, M. M., Pastan, I. & Willingham, M. C.**: Cellular localization of the multidrug-resisitance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **84**, 7735-7738 (1987).

14) **Cordon-Cardo, C., O'brien, J. P., Casals, D., Rittman-Grauer, L., Biedler, J. L., Melamed, M. R. & Bertino, J. R.**: Multidrug-resisitance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. Proc. Natl.

Acad. Sci. USA, 86, 695-698 (1989).

15) **Tsuruo, T., Iida, H., Tsukagoshi, S. & Sakurai, Y.:** Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. Cancer Res., **41**, 1967-1972 (1981).

16) **Audus, K. L. & Borchardt, R. T.:** Characterization of an in vitro blood-brain barrier model system for studying drug transport and metabolism. Pharm. Res., **3**, 81-87 (1986).

17) **Audus, K. L. & Borchardt, R. T.:** Bovine brain microvessel endothelial cell monolayers as a model system for the blood-brain barrier. Ann. N. Y. Acad. Sci., **507**, 9-18 (1987).

18) **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).

19) **Hamada, H. & Tsuro, 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).

20) **Laemmli, U. K.:** Cleavage of structural proteins during the assemply of the head of bacteriophage T4. Nature, **227**, 680-685 (1970).

21) **Hsu, S., Raine, L. & Fanger, H.:** Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. J. Histochem. Cytochem., **29**, 577-580 (1981).

22) **Terasaki, T., Takakuwa, S., Moritani, S. & Tsuji, A.:** Transport of monocarboxylic acids at the blood-brain barrier: Studies with monolayers of primary cultured bovine brain capillary endothelial cells. J. Pharmacol. Exp. Ther., **258**, 932-937 (1991).

23) **Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J.:** Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., **193**, 265-275 (1951).

24) **Skovsgaard, T.:** Mechanism of cross-resistance between vincristine and daunorubicin in Ehrlich ascites tumor cells. Cancer Res., **38**, 4722-4727 (1978).

25) **Tsuruo, T., Kawabata, H., Nagumo, N., Iida, H., Kitatani, Y., Tsukagoshi, S. & Sakurai, Y.:** Potentiation of antitumor agents by calcium channel blockers with special reference to cross-resistance patterns. Cancer Chemother. Pharmacol., **15**, 16-19 (1985).

26) **Tsuruo, T., Iida, H., Tsukagoshi, S. & Sakurai, Y.:** Increased accumulation of vincristine and adriamycin in drug-resistant P388 tumor cells following incubation with calcium antagonists and calmodulin inhibitors. Cancer Res., **42**, 4730-4733 (1982).

27) **Tsuruo, T., Iida, H., Kitatani, Y., Yokota, K., Tsukagoshi, S. & Sakurai, Y.:** Effects of quinidine and related compounds on cytotoxicity and cellular accumulation of vincristine and adriamycin in drug-resistant tumor cells. Cancer Res., **44**, 4303-4307 (1984).

28) **Slater, L. M., Sweet, P., Stupecky, M. & Gupta, S.:** Cyclosporin A reverses vincristine and daunorubicin resistance in acute lymphatic leukemia in vitro. J. Clin. Invest., **77**, 1405-1408 (1986).

29) **Yang, C. H., DePinho, S. G., Greenberger, L. M., Arceci, R. J. & Horwitz, S. B.:** Progesterone interacts with P-glycoprotein in multidrug-resistant cells and in the endometrium of gravid uterus. J. Biol. Chem., **264**, 782-788 (1989).

30) **Naito, M., Yusa, K. & Tsuruo, T.:** Steroid hormones inhibit binding of vinca alkaloid to multidrug resistance related P-glycoprotein. Biochem. Biophys. Res. Commun., **158**, 1066-1071 (1989).

31) **Ueda, K., Cornwell, M. M., Gottesman, M. M., Pastan, I., Roninson, I. B., Ling, V. & Riordan, J. R.:** The mdr1 gene, responsible for multidrug-resistance, codes for P-glycoprotein. Biochem. Biophys. Res. Commun., **141**, 956-962 (1986).

32) **Riordan, J. R., Deuchars,K., Kartner, N., Alon, N., Trent, J. & Ling, V.:** Amplification of P-glycoprotein genes in multidrug-resistant mammalian cell lines. Nature, **316**, 817-819 (1985).

33) **Roninson, I. B., Chin, J. E., Choi, K., Gros, P., Housman, D. E., Fojo, A., Shen, D., Gottesman, M. M. & Pastan, I.:** Isolatiion of human mdr DNA sequences amplified in multidrug-resistant KB carcinoma cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **83**, 4538-4542 (1986).

34) **Gros, P., Neriah, Y. B., Croop, J. M. & Housman, D. E.:** Isolation and expression of a complementary DNA that confers multidrug resistance. Nature, **323**, 728-731 (1986).

35) **Gros, P., Croop, J. & Housman, D.:** Mammalian multidrug resistance gene: Complete cDNA sequence indicates strong homology to bacterial transport proteins. Cell, **47**, 371-380 (1986).

36) **Chen, C., Chin, J. E., Ueda, K., Clark, D. P,. Pastan, I., Gottesman, M. M. & Roninson, I. B.:** Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the mdr1 (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. Cell, **47**, 381-389 (1986).

37) **Scheper, R. J., Bulte, J., Brakkee, J., Quak, J., van-der-Schoot, E., Balm, A., Meijer, C., Broxterman, H., Kuiper, C., Lankelma, J. & Pinedo, H. M.:** Monoclonal antibody JSB-1 detects a highly conserved epitope on the P-glycoprotein associated with multi-drug-resistance. Int. J. Cancer, **42**, 389-394 (1988).

38) **Sugawara, I., Hamada, H., Tsuruo, T. & Mori, S.:** Specialized localization of P-glycoprotein recognized by MRK16 monoclonal antibody in endothelial cells of the brain and the spinal cord. Jpn. J. Cancer Res., **81**, 727-730 (1990).

39) **Panula, P., Joo, F. & Rechardt, L.:** Evidence for the presence of viable endothelial cells in cultures derived from dissociated rat brain. Experientia, **34**, 95-97 (1978).

40) **Bowman, P. D., Ennis, S. R., Rarey, K. E., Batz,**

A. L. & Goldstein, G. W.: Brain microvessel endothelial cells in tissue culture: A model for study of blood-brain barrier permeability. Ann. Neurol., **14**, 396-402 (1983).

41) **DeBault, L. E. & Cancilla, P. A.:** γ-glutamyl transpeptidase in isolated brain endothelial cells: Induction by glial cells in vitro. Science, **207**, 653-655 (1980).

42) **Tao-Cheng, J., Nagy, Z. & Brightman, M. W.:** Tight junctions of brain endothelium in vitro are enhanced by astroglia. J. Neurosci., **7**, 3293-3299 (1987).

43) **Pardridge, W. M., Triguero, D., Yang, J. & Cancilla, P. A.:** Comparison of in vitro and in vivo models of drug transcytosis through the blood-brain barrier. J. Pharmacol. Exp. Ther., **253**, 884-891 (1990).

44) **Audus, K. L., Bartel, R. L., Hidalgo, I. J. & Borchardt, R. T.:** The use of cultured epithelial and endothelial cells for drug transport and metabolism studies. Pharm. Res., **7**, 435-451 (1990).

45) **Lieberman, D. M., Reithmeier, R. A. F., Ling, V., Charuk, J. H. M., Goldberg, H. & Skorecki, K. L.:** Identification of P-glycoprotein in renal brush border membranes. Biochem. Biophys. Res. Commun., **162**, 244-252 (1989).

46) **Ichikawa, M., Yoshimura, A., Furukawa, T., Sumizawa, T., Nakazima, Y. & Akiyama, S.:** Glycosylation of P-glycoprotein in a multidrug-resistant KB cell line, and in the human tissues. Biochim. Biophys. Acta, **1073**, 309-315 (1991).

47) **Ichikawa, M., Yoshimura, A., Sumizawa, T., Shudo, N., Kuwazuru, Y., Furukawa, T. & Akiyama, S.:** Interaction of organic chemicals with P-glycoprotein in the adrenal gland, kidney, and a multidrug-resistant KB cell. J. Biol. Chem., **266**, 903-908 (1991).

48) **Kamimoto, Y., Gatmaitan, Z., Hsu, J. & Arias, I. M.:** The function of gp170, the multidrug resistance gene product, in rat liver canalicular membrane vesicles. J. Biol. Chem., **264**, 11693-11698 (1989).

49) **Prados, M., Strowger, B. & Feindel, W.:** Studies on cerebral edema: II Reaction of the brain to exposure to air: physiologic changes. Arch. Neurol. Psychiat., **54**, 290-300 (1945).

50) 佐野圭司，畠中　担：脳浮腫のステロイド療法．最新医学，18，2478-2492 (1963).

51) 石井昌三，渡辺　博：脳浮腫とステロイド．神経内科，5，219-225 (1976).

52) **Ozols, R. F., Cunnion, R. E., Klecker Jr., R. W., Hamilton, T. C., Ostchega, Y., Parrillo, J. E. & Young, R. C.:** Verapamil and adriamycin in the treatment of drug-resistant ovarian cancer patients. J. Clin. Oncol., **5**, 641-647 (1987).

53) **Pennock, G. D., Dalton, W. S., Roeske, W. R., Appleton, C. P., Mosley, K., Plezia, P., Miller, T. P. & Salmon, S. E.:** Systemic toxic effects associated with high-dose verapamil infusion and chemotherapy administration. J. Natl. Cancer Inst., **83**, 105-110 (1991).

Role of P-glycoprotein in the Brain Capillary Endothelial Cells Yasushi Takabatake, Department of Neurosurgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920－J. Juzen Med Soc., **101**, 356－364 (1992)

Key words P-glycoprotein, blood-brain barrier, brain capillary endothelial cells, chemotherapy, multidrug resistance

Abstract

P-glycoprotein (P-GP) is a membrane glycoprotein known to be associated with the multidrug resistance of tumor cells against chemotherapy. Several lines of evidence indicate that P-GP participates in eliminating anticancer agents from the tumor cells with the aid of adenosine triphosphate, and that its function is inhibited by calcium entry blockers, calmodulin inhibitors, steroid hormones, and other drugs. Although P-GP has also been found in normal capillary endothelial cells in the brain and testis, its function still remains unclear. In this study, the expression and role of P-GP in bovine brain capillary endothelial cells (BCEC) were studied with special reference to its relationship to blood-brain barrier. By western blot analysis, P-GP was detected as a main band of 130 kD in isolated BCEC. By immunohistochemical and immunoelectron microscopic examinations, P-GP was expressed at the luminal side of BCEC. In primary-cultured BCEC, P-GP was detected diffusely in the cytoplasm when it was stained using anti-P-GP monoclonal antibody MRK16, which recognizes an epitope of the extracellular region of the protein. P-GP, however, exhibited granular distribution when using monoclonal antibody C219, which recognizes an epitope of the cytoplasmic region of the protein. By immunoelectron microscopy of primary-cultured BCEC, P-GP was localized at the luminal face of the cell membrane. In a kinetic study using primary-cultured bovine BCEC, vincristine uptake showed a significant increase by the addition of not only the MRK16 antibody but also the calcium entry blocker (verapamil) and steroid hormones (progesterone and testosterone). Metabolic inhibitors (sodium azide and 2,4-dinitrophenol) also increased vincristine uptake in the absence of glucose. When glucose was added, vincristine uptake decreased, probably due to activation of the P-GP efflux pump as a result of ATP production. In summary, it is strongly suggested that P-GP has an important role as a component of the efflux pump at the luminal membrane of the BCEC.