

抗がん剤のin vitroスクリーニングにおける内因性BCRPおよびP-gp発現の影響

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2020-07-15 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 瀬尾, 育美, Seo, Ikumi メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/00058897

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.



氏名	瀬尾 育美
学位の種類	博士 (創薬科学)
学位記番号	医薬保博甲 267 号
学位授与の日付	平成 31 年 3 月 22 日
学位授与の要件	課程博士 (学位規則第 4 条第 1 項)
学位授与の題目	抗がん剤の <i>in vitro</i> スクリーニングにおける内因性 BCRP および P-gp 発現の影響
論文審査委員	主査 玉井 郁巳 副査 加藤 将夫 副査 崔 吉道 副査 中島 美紀 副査 中西 猛夫

學位論文要旨

[Abstract]

Breast cancer resistance protein (BCRP) or P-glycoprotein (P-gp, multidrug resistance 1 (MDR1)) overexpression confers multidrug resistance to cancer cells, and the efficacy of anticancer drugs has been reported to be significantly affected by BCRP and P-gp in cell lines transfected with *BCRP* or *MDR1*, or selected with drugs. It is unclear whether the *in vitro* efficacy of anticancer drugs is affected by endogenous BCRP and P-gp, although cancer cell line panels consisting of defined tumor cell lines with endogenous BCRP and P-gp have been used to screen for anticancer drugs in the pharmaceutical industry. We assessed the impact of BCRP and P-gp expression on apparent efficacy of anticancer drugs using cancer cell lines expressing varying levels of endogenous BCRP and P-gp. Pancreatic or colon cancer cell lines were selected from the Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE). mRNA expression of *BCRP* was considered as a surrogate of functional BCRP at least in PANC-1 and AsPC-1 cells, and mRNA expression of *MDR1* was considered as a surrogate of functional P-gp in CL-11, C2BBE1, and RKO cells, whereas P-gp protein expression in plasma membranes or crude membrane fractions was lower than expected from mRNA expression in CW-2 and CL-40 cells. EC₅₀ of SN-38, topotecan, and mitoxantrone decreased in the presence of a BCRP inhibitor in PANC-1 and AsPC-1 cells that highly express BCRP. EC₅₀ of paclitaxel and vinorelbine decreased in the presence of a P-gp inhibitor in CW-2 and CL-11 cells that highly express P-gp. However, no significant alterations in EC₅₀ were observed in HPAF-II, SW 1990, and MIA PaCa-2 cells, and in CL-40, C2BBE1, and RKO cells, which show lower BCRP and P-gp expression, respectively. Thus, the effect of BCRP and P-gp needs to be carefully evaluated in cell lines that highly express BCRP, which account for 1.7% of cancer cell lines of all cancer types, and 7.0% of pancreatic cancer cell lines in CCLE, or in cell lines that highly express P-gp, which account for 1.5% of cancer cell lines of all cancer types, and 14.5% of colon cancer cell lines in CCLE, considering P-gp protein expression levels in plasma membranes.

【背景・目的】

Breast cancer resistance protein (BCRP) やP-glycoprotein (P-gp, multidrug resistance 1 (MDR1)) は抗がん剤を基質として認識し細胞外に排出することにより、がん細胞の多剤耐性に関与することが報告されている。これらのトランスポーターを介する薬剤耐性についてのこれまでの*in vitro*研究には、BCRPやMDR1遺伝子を導入したがん細胞株や薬剤で選択した耐性がん細胞株など、人工的な条件下でBCRPやP-gpを過剰発現させた細胞株が用いられてきた。一方、製薬企業における抗がん剤の*in vitro*スクリーニングにおいては、人工的な条件下ではBCRPやP-gpを過剰発現させていない、ヒトがん由来する細胞株を集めたヒトがん細胞パネルが汎用されている。しかし、ヒトがん細胞パネルを用いた*in vitro*スクリーニングの結果、内因性のBCRPやP-gpによる耐性のために有望な抗がん剤が除外される可能性がある。

そこで本研究では、Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE) のデータベースを用いて、内因性のBCRP発現量もしくは内因性のP-gp発現量が異なるヒトがん細胞株を用い、内因性のBCRPおよびP-gpが抗がん剤の薬効評価へ及ぼす影響を検討し、抗がん剤の*in vitro*スクリーニングに関する知見を得ることを目的とした。

【方法】

BCRPの検討には内因性のBCRP発現量が異なる膵臓がん細胞株である、PANC-1, AsPC-1, HPAF-II, SW 1990, およびMIA PaCa-2を (Figure A), P-gpの検討には内因性のP-gp発現量の異なる結腸がん細胞株である、CW-2, CL-11, CL-40, C2BBel, およびRKOを (Figure B) それぞれ用いた。各がん細胞株中のBCRPおよびP-gpのmRNA発現量および粗膜画分中でのタンパク質発現量を定量的リアルタイムPCRおよびウェスタンブロット法でそれぞれ定量し、BCRPおよびP-gpタンパク質の細胞内局在は共焦点免疫蛍光顕微鏡法で測定した。細胞膜表面に発現するP-gpタンパク質はfluorescence activated cell sorting解析により定量した。BCRPもしくはP-gpによって基質として認識される抗がん剤を単独、BCRP阻害剤であるfumitremorgin C (FTC), もしくはP-gp阻害剤であるzosuquidar (ZSQ) とともにさまざまな濃度で細胞培養培地に添加し、各抗がん剤について最大の細胞増殖阻害効果の50%を起す濃度であるEC₅₀値をsulforhodamine Bアッセイによって算出した。P-

gpの検討に用いた結腸がん細胞株においては、ZSQの有無による各抗がん剤の継時的な細胞内取り込み量も測定した。

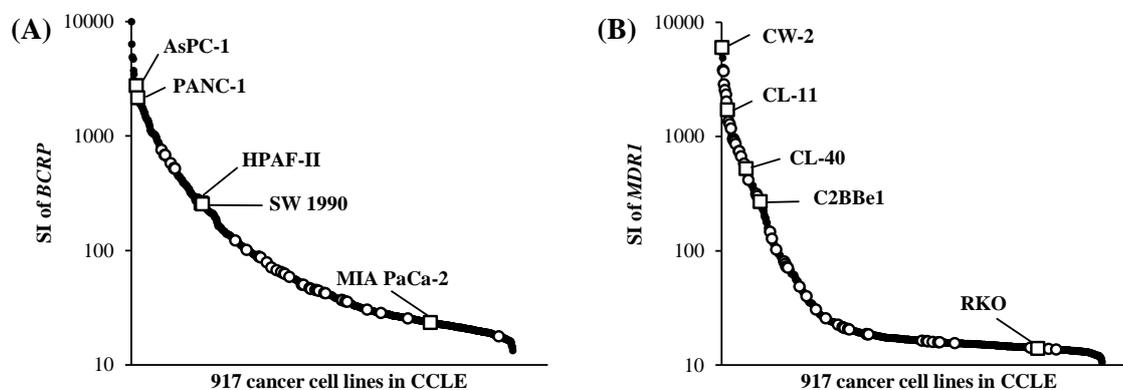


Figure mRNA expression levels of *BCRP* (A) and *MDR1* (B) represented as signal intensity (SI) of microarray analysis in 917 cancer cell lines are arranged in descending order (open square, pancreatic cancer cell lines (A) and colon cancer cell lines (B) used in this study; open circle, pancreatic cancer cell lines (A) and colon cancer cell lines (B); closed circle, cancer cell lines from other cancer types).

【結果・考察】

内因性のBCRP発現量が異なる膵臓がん細胞株において、粗膜画分中でのBCRPのタンパク質発現が確認できたPANC-1細胞およびAsPC-1細胞ではBCRPタンパク質は主に細胞膜上に局在しており、少なくともこれらの細胞においてBCRP mRNA発現量はそれが機能する細胞膜に発現するBCRPタンパク質発現量の指標になると考えられた。内因性のBCRPを高発現するPANC-1細胞およびAsPC-1細胞において、BCRPの基質となる抗がん剤であるSN-38, topotecan, およびmitoxantroneのEC₅₀値は、FTCの添加によって著しく減少したが、内因性BCRPの発現量が少ないHPAF-II細胞, SW 1990細胞, およびMIA PaCa-2細胞においてはFTCの添加による影響が見られなかった。FTC添加による抗がん剤のEC₅₀値のシフトの比をresistance ratio (RR) として評価したところ、RRはBCRP mRNA発現量の増加に伴い増大した。

内因性のP-gp発現量が異なる結腸がん細胞株において、CL-40細胞においては粗膜画分中および細胞膜上のP-gpタンパク質発現量が、CW-2細胞においては細胞膜上のP-gpタンパク質発現量がmRNA発現量から見積もられるよりも少ない傾向があった。CL-11細胞、C2BBel細胞、およびRKO細胞においては、MDR1 mRNA発現量は細胞膜上に発現するP-gpタンパク質発現量の指標になると考えられた。内因性のP-gpを高発現するCW-2細胞およびCL-11細胞において、P-gpの基質となる抗がん剤であるpaclitaxelおよびvinorelbineのEC₅₀値はZSQの添加によって著しく減少したものの、内因性P-gpの発現量が少ないCL-40細胞、C2BBel細胞、およびRKO細胞ではP-gp阻害の影響を受けなかった。また、ZSQの有無による抗がん剤の細胞内蓄積比をuptake ratio (UR) として評価したところ、細胞膜上のP-gpタンパク質発現量と各抗がん剤のUR値との間に関連性が認められた。一方、細胞膜上のP-gpタンパク質発現量とZSQ添加による抗がん剤のEC₅₀値のシフト (RR)、およびZSQの有無による抗がん剤の細胞内蓄積比 (UR) とZSQ添加による抗がん剤のEC₅₀値のシフト (RR) との間には、明確な関連性は認められなかった。

【結論】

内因性のBCRPやP-gpを高発現するがん細胞株においては、BCRPやP-gpによってそれぞれのトランスポーターに基質として認識される抗がん剤の薬効が過小評価される可能性が示された。したがって、内因性のBCRPもしくはP-gpを高発現する細胞株を抗がん剤の*in vitro*スクリーニングに用いる場合は、がん細胞株および患者由来のがん組織でのBCRPやP-gpの発現量を考慮し、薬理活性の高い候補化合物の選択を誤らないように注意する必要があることが示された。しかし、CCLEのデータベース中のがん細胞株において、BCRPは全がん細胞株の1.7%、および膵臓がん細胞株の7.0%、P-gpは全がん細胞株の1.5%、および結腸がん細胞株の14.5%のがん細胞株が、それぞれBCRPおよびP-gpを高発現すると分類された。このようにBCRPやP-gpを高発現する細胞株が少ないことを考慮すると、抗がん剤の*in vitro*スクリーニングにおいて有望な候補化合物がBCRPやP-gpのために除外される可能性は低いと考えられる。さらに、耐性因子として機能する細胞膜上のP-gpタンパク質発現量は、mRNA発現量および粗膜画分中でのP-gpタンパク質発現量の情報からでは過大評価される可能性があることも示された。したがって、医薬品開発において詳細な検討を要する段階に

なった際には、耐性因子として機能する細胞膜上に発現するP-gpタンパク質量の情報が重要であると考えられる。本研究において得られた結果が抗がん剤の*in vitro*スクリーニングを始めとする抗がん剤開発に役立てられ、臨床においてより成功確率の高い抗がん剤の選択に繋がることを期待する。

審査結果の要旨

本研究は、製薬企業における抗がん薬候補化合物の *in vitro* での薬効評価スクリーニングに使用されるがん細胞株について、薬剤耐性原因となる薬物排出トランスポーターの考慮がなされていないことに疑問を持ち、内因性 P-糖タンパク質 (Pgp, ABCB1) ならびに BCRP(ABCG2)の影響について検討したものである。公開されているデータベース Cancer Cell Line Encyclopedia に基づいて 917 種類の細胞株における Pgp および BCRP の mRNA 発現量を整理し、高中低度発現する細胞株を結腸がん由来 (Pgp) と膵臓がん由来 (BCRP) 細胞から選択した。それらについて、Pgp および BCRP の mRNA 発現量、粗膜画分中および細胞膜上のタンパク質発現量、細胞内局在性、トランスポーター基質となる抗がん薬およびその阻害薬を用いた細胞毒性ならびに細胞内蓄積量を測定した。その結果、高発現する細胞においてはトランスポーター阻害薬により抗がん薬の薬効が増大する結果が得られた。そのため、これら耐性因子を高発現する細胞においては注意が必要であるが、そのような高発現細胞は少数であることから、多くの場合は細胞毒性評価への影響が少ないことがわかった。以上、内因的に発現する多剤耐性因子 Pgp と BCRP の細胞毒性への影響に関する本研究は、抗がん薬のスクリーニング時における耐性因子の考慮について有用な情報を与えるものであり、創薬に貢献することから博士(創薬科学)に値すると判定された。