

機関番号：13701

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21790978

研究課題名（和文）

MRP1モジュレーターとしてのロイコトリエン受容体拮抗薬の作用機序と臨床応用

研究課題名（英文）

Action mechanism and clinical application of leukotriene receptor antagonist as multidrug resistance protein 1 (MRP1) modulator

研究代表者

小関 道夫 (OZEKI MICHIO)

岐阜大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：60444303

研究成果の概要（和文）：

本研究の目標は、抗癌剤に対する薬剤耐性メカニズムを解明し、克服することである。我々は、様々な薬剤耐性機構の中で、薬物排出を担うABCトランスポーターである多剤耐性関連蛋白質（MRP1）に注目した。このトランスポーターと同じ部位に結合し、薬物排出と拮抗し薬剤耐性克服する化合物（モジュレーターと呼ぶ）のひとつである、ロイコトリエン受容体拮抗薬を用いた耐性克服効果の検討を行うことによって、将来、臨床応用できるモジュレーターの開発に繋げることを目的としている。

我々は、本研究期間中に以下の成果を得ることが出来た。低濃度抗癌剤添加による耐性細胞選択法またはMRP1cDNAトランスフェクション法にてMRP1が高発現した耐性化細胞を樹立した。さらに、薬剤感受性試験（MTTアッセイ）により耐性化細胞に各種抗癌剤（ドキシソルビシン、エトポシド、ビンクリスチンなど）への耐性化を確認した。FCMとLight Cycler（Roche）を用いたリアルタイムPCRでMRP1mRNAの増幅を確認した。ロイコトリエン受容体拮抗薬添加後の薬剤感受性試験では、添加の無い群と比較して有意に耐性が克服されていた。またそれは濃度依存性があった。蛍光色素排出能試験にてロイコトリエン受容体拮抗薬を添加後、細胞外への排出が抑制されていた。また細胞内グルタチオン濃度測定、ATPアッセイ、アポトーシス経路、細胞周期測定により、ロイコトリエン受容体拮抗薬がMRP1を抑制し、モジュレーターであること証明した。現在、これらの結果を論文で報告する準備中である。

研究成果の概要（英文）：

Our purpose of research is to clarify the mechanism of anticancer drug resistance by tumor cells and developing effective resistance modulators. Multidrug resistance can be mediated by overexpression of the multidrug resistance protein 1 (MRP1). MRP function

as transmembrane efflux pumps, which decrease intracellular drug accumulation, thereby conferring multidrug resistance. One of the ways to overcome MRP1 mediated multidrug resistance is to use an inhibitor to block the function of MRP1. This is called MRP1 modulator. To date, several MRP1 modulator have entered study and clinical trials. Recently, leukotriene receptor antagonist (LTRA) is thought to be one of the MRP1 modulator. We studied effect to overcome drug resistance by LTRA and have developed original candidate medications.

In our study duration, we got results as below; The resistance cancer cells was established by two methods. The cells were selected from Jurkat (human leukemia cell line) by chronic exposure to doxorubicin over 2 months and transfection of MRP1cDNA. In the resistant cells, the overexpression of MRP1 resulted from an increased MRPmRNA level transcribed from amplified MRP gene. The dose-response effects of LTRA in the presence or absence of doxorubicin were examined in both drug-sensitive Jurkat and MRP-overexpressing resistant cells. LTRA reversed Jurkat resistance. The fluorescent accumulation analysis revealed a significant increase of fluorescence in resistant Jurkat pre-incubated LTRA. We demonstrated that LTRA modulate MRP1 scientifically by the measurement of intracellular glutathione, ATPase assay, analysis of cell-cycle pathway. We have written the report now.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：ABC トランスポーター、多剤耐性関連蛋白質 (MRP1)、ロイコトリエン受容体拮抗薬

1. 研究開始当初の背景

本研究の目的は、抗癌剤に対する薬剤耐性メカニズムを解明し、克服することである。ABC トランスポーターである多剤耐性関連蛋白質 (MRP1) は 190kDa の 17 回膜貫通型の蛋白で、機能や構造などは未だ不明な点が多いが、抗癌剤の他、グルタチオン抱合物質やロイコトリエン (LT) C4 の輸送に関わっている。そのため、LT 受容体拮抗薬が MRP1 の細胞外排出ポンプ機能を抑制し、抗癌剤耐性を克服する化合物 (MRP1 モジュレーターと呼ぶ) となるといわれている。

2. 研究の目的

我々は、LT 受容体拮抗薬を用いた耐性克服効果の検討を行い、臨床応用を目指すとともに、同様の方法論で新規モジュレーターの開発に繋げることが最終目標である。

3. 研究の方法

1、多剤耐性細胞株樹立

- A、低濃度抗癌剤添加による耐性細胞株樹立
- B、MRP1cDNA トランスフェクション
- C、薬剤感受性試験 (MTT アッセイ) による抗癌剤に対する薬剤耐性度の測定
- D、MRP1 の発現解析

2、耐性細胞株への LT 受容体拮抗薬添加後の機能実験

- A、LT 受容体拮抗薬添加後の薬剤感受性試験
- B、LT 受容体拮抗薬添加後の蛍光色素排出能試験
- C、LT 受容体拮抗薬添加後の MRP1 発現

3、LT 受容体拮抗薬の MRP1 に対する薬理作用の検討

- A、LT 受容体拮抗薬添加後の細胞内グルタチオン濃度測定
- B、MRP1 膜成分に LT 受容体拮抗薬を添加、無機リン酸濃度より ATP 加水分解測定
- C、LT 受容体拮抗薬添加後のアポトーシス、細胞周期の解析

4、LT 受容体拮抗薬以外の新規モジュレーター一探索

4. 研究成果

低濃度抗癌剤添加による耐性細胞選択法、MRP1cDNA トランスフェクション法にて MRP1 が高発現した耐性化細胞を樹立。薬剤感受性試験 (MTT アッセイ) により耐性化細胞に各種抗癌剤 (ドキシソルビシン、エトポシド、ビンクリスチンなど) への耐性化を確認。FCM と Light Cycler (Roche) を用いたリアルタイム PCR で MRP1 mRNA を増幅し、確認。LT 受容体拮抗薬添加後の薬剤感受性試験で耐性が克服。蛍光色素排出能試験にて LT 受容体拮抗薬を添加後、細胞外への排出が抑制されていた。また細胞内グルタチオン濃度測定、ATPase アッセイ、アポトーシス経路、細胞周期測定により、LT 受容体拮抗薬が MRP1 を抑制し、モジュレーターであること証明した。これらの結果を論文で報告する準備中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

1, Ozeki M, Funato M, Teramoto T, Ohe N, Asano T, Kaneko H, Fukao T, Kondo N. Reversible cerebrospinal fluid edema and pencephalic cyst, a rare complication of ventricular catheter. J Clin Neurosci. May; 17(5):658-61. (2010) (査読あり)

2, Ozeki M, Kunishima S, Kasahara K, Funato M, Teramoto T, Kaneko H, Fukao T, Kondo N. A family having type 2B von Willebrand disease with an R1306W mutation: Severe thrombocytopenia leads to the normalization of high molecular weight multimers. Thromb Res. Feb; 125 (2): e17-22. (2010) (査読あり)

3, Ozeki M, Kato Z, Sasai H, Kubota K, Funato M, Orii K, Kaneko H, Fukao T, Kondo N. Congenital inner ear malformations without sensorineural hearing loss in children. Int J Pediatr Otorhinolaryngol. Oct; 73(10):1484-7. (2009) (査読あり)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小関 道夫 (OZEKI MICHIO)

岐阜大学・医学部附属病院・医員

研究者番号 : 60444303

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :