

平成 22 年 5 月 14 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20790148  
 研究課題名（和文） 白血病細胞薬剤耐性への単分子輸送活性に基づく個別トランスポーターの寄与率の解明  
 研究課題名（英文） Analysis of transporter expression profile in drug resistant leukemia cells.  
 研究代表者  
 上家 潤一（KAMIIE JUNICHI）  
 麻布大学・獣医学部・講師  
 研究者番号：10400269

研究成果の概要（和文）：トランスポーターは、白血病における薬剤耐性機序に重要である。本研究では、質量分析計を用いてトランスポータータンパク質の定量法を開発し、vincristine(VCR)耐性白血病細胞株における薬物トランスポーターの発現量を明らかにした。VCR 耐性細胞では、ABCB1 の発現量が感受性細胞の 67 倍に上昇しており、薬剤耐性に重要であることが示唆された。他の Vincristine 排泄トランスポーターである ABCC family は発現しておらず、ABCB1 を主体とした薬剤耐性であることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Transporter play important role in the drug resistance of leukemia. In this study, novel quantitative method of transporter protein was developed with mass spectrometer. The expression levels of transporter proteins were elucidated in vincristine (VCR) resistant leukemia cells. VCR resistant leukemia cell was 67 times as ABCB1 expression level as VCR sensitive leukemia cells. Other transporters including ABCC family, which were known as vincristin transporters, did not show difference in expression level between resistant cells and sensitive cells. These results suggested important role of ABCB1 in vincristin resistance of leukemia cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	99,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：白血病、薬剤耐性、トランスポーター、質量分析計、タンパク質量

## 1. 研究開始当初の背景

白血病の化学療法において腫瘍細胞の薬剤耐性が問題であり、薬剤耐性機序の解明は

重要な課題であった。白血病の薬剤耐性獲得には、薬物排泄トランスポーターが重要な役割を担うことが示唆されていた。薬物排泄ト

ランスポーターとして、ATP binding cassette (ABC) transporter family が分類されているが、各トランスポーターの耐性への寄与率は不明であった。

## 2. 研究の目的

本研究は、vincristine 耐性白血病細胞株における ABC トランスポーターの発現量プロファイルを解析し、耐性への寄与を定量的に解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 1) トランスポータータンパク質定量法の開発

薬物排泄重要な ABC トランスポーター 8 タンパク質 (ABCB1, ABCC1, ABCC2, ABCC3, ABCC4, ABCC5, ABCC6, ABCC7) の同時定量法を、安定同位体標識ペプチドを内部標準とする定量プロテオミクス技術を用いて開発した。

### 2) 薬剤耐性白血病細胞株におけるトランスポータープロファイルの測定

薬剤耐性細胞株として、vincristine 耐性を獲得した骨髄性白血病細胞株である K562/VCR 細胞を用いた。対照群の感受性細胞として耐性未獲得の K562 細胞を用い、両者のプロファイルについて比較解析を行った。

## 4. 研究成果

### 1) トランスポータータンパク質定量法の開発

#### 1) - 1. ヒト ABC トランスポーター群の測定対象ペプチド配列リストの作成

定量プロテオミクスではタンパク質を断片化したペプチドを測定対象とするために、各タンパク質に特異的かつ質量分析計で高感度を示すペプチドを選択する必要がある。代表者らの構築した *in silico* ペプチド選択法 (特願: ) を用いてヒト ABC トランスポーターファミリー 分子全てについて測定対象ペプチド配列を決定した。ペプチドリストを基に、次期発展課題としてヒト組織におけるトランスポーター発現アトラスの作成を行う予定である。

#### 1) - 2. vincristine 排泄トランスポーター定量法の確立

ABCB1, ABCC1, ABCC2, ABCC3, ABCC4, ABCC5, ABCC6, ABCC7 について、決定した測定対象ペプチドの安定同位体標識体および非標識体を合成した。標識体を内部標準とし、質量分析計の selected reaction monitoring モードを用いて 10fmol-1000fmol を定量可能な 5 分子同時定量法を確立した。

### 2) 薬剤耐性白血病細胞株におけるトランスポータープロファイルの解明

#### 2) - 1. 白血病細胞株 K562 および K562/VCR の vincristine 耐性の測定

Vincristine 希釈系列を添加し、72 時間後の細胞生存率を測定し評価した。K562/VCR 細胞と k562 細胞の IC50 はそれぞれ 0.219 $\mu$ m, 0.00129 $\mu$ m であり、k562/VCR は 170 倍の耐性を示した。

#### 2) - 2. トランスポータープロファイルの比較解析

1) で確立した定量法を用いて K562 および K562/VCR 細胞の定量解析を行った。K562 細胞では ABCB1 (1fmol/ $\mu$ g protein) のみ定量された。K562/VCR では ABCB1 (15.2fmol/ $\mu$ g protein), ABCC1 (1.2fmol/ $\mu$ g protein) が発現しており、ABCB1 が 67 倍以上に高発現していた。本定量解析によって、Vincristine 耐性には MDR1 の関与が重要であることが明らかとなった。

## 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 4 件)

1. J. Kamiie: Progress of drug transport study based on absolute quantitative method for membrane transporter proteins. *Yakugaku Zasshi*. **128**:507-12 (2008)
2. J.Kamiie, S. Ohtsuki, R. Iwase, K. Ohmine, Y. Katsukura, K. Yanai, Y. Sekine, Y. Uchida, S .Ito, T. Terasaki: Quantitative Atlas of Membrane Transporter Proteins: Development and Application of a Highly Sensitive Simultaneous LC/MS/MS Method Combined with Novel In-silico Peptide Selection Criteria. *Pharm. Res.* **25**:1469-83(2008)
3. 大峰健、上家潤一、大槻純男、寺崎哲也: 質量分析法を用いたタンパク質の複数同時絶対定量法と Pharmacoproteomics への新展開、*薬事新報*, 2558:45-50(2009)
4. 大槻純男、上家潤一、寺崎哲也 Targeted Absolute Proteomics を用いたトランスポーターの新しい研究展開. *遺伝子医*,12:48-54( 2009)

[学会発表] (計 22 件)

1. 上家潤一. 薬物トランスポータータンパク質群の同時定量法の開発とマウス臓器における薬物トランスポータータンパク質 34 分子の発現プロファイルの解明. 第 149 回日本獣医学会学術集会.

- 2010年3月26日-28日. 東京
2. T. Terasaki, Y. Uchida, J. Kamiie, S. Ohtsuki. Blood-Brain Barrier Pharmacoproteomics (PPx): Targeted absolute proteomics-based pharmacokinetics as a new path for the blood-brain barrier research. BLOOD-BRAIN BARRIER CONSORTIUM CLUB Symposium. Nov. 14, 2008. London, United Kingdom.
  3. S. Ohtsuki, S. Murata, Y. Katsukura, J. Kamiie, P.O. Couraud, T. Terasaki. Targeted proteomics analysis of tight junction proteins expressed at the blood-brain barrier. The 11th international symposium on "Signal transduction in the Blood-Brain Barriers". Sep. 18-20, 2008. Amsterdam, Netherlands
  4. Y. Uchida, S. Ohtsuki, J. Kamiie, T. Terasaki. Reconstruction of in vivo P-glycoprotein function at blood-brain barrier by its absolute protein expression amount and transport activity in vitro. The 11th international symposium on "Signal transduction in the Blood-Brain Barriers". Sep. 18-20, 2008. Amsterdam, Netherlands
  5. 勝倉由樹、上家潤一、立川正憲、梅澤智史、大槻純男、細谷健一、寺崎哲也. 定量的プロテオミクスを用いたマウス肝臓におけるトランスポーターの定量的局在解析. 日本薬剤学会第23年会. 2008年5月20日-22日. 札幌
  6. 川上裕貴、上家潤一、鈴木貴、大槻純男、寺崎哲也. Targeted Absolute Proteomicsによるヒト肝臓の定量的 Transporter Atlas の同定. 日本薬剤学会第23年会. 2008年5月20日-22日. 札幌
  7. 内田康雄、大槻純男、上家潤一、寺崎哲也. 定量的プロテオミクス法を用いたin vitro 輸送系からの血液脳関門 P-glycoprotein 輸送機能の再構築. 日本薬剤学会第23年会. 2008年5月20日-22日. 札幌
  8. 相澤三四郎、大槻純男、上家潤一、寺崎哲也. バイオインフォマティクス及びプロテオミクスを利用した新規トランスポーターの候補分子の探索. 日本薬剤学会第23年会. 2008年5月20日-22日. 札幌
  9. 池田千絵美、内田康雄、勝倉由紀、上家潤一、大槻純男、Pierre-Olivier Couraud、寺崎哲也. 不死化ヒト脳毛細血管内皮細胞株を用いた網羅的トランスポーター発現解析によるヒト血液脳関門輸送系の解明. 日本薬剤学会第23年会. 2008年5月20日-22日. 札幌
  10. 村田将、上家潤一、勝倉由樹、大槻純男、Pierre-Olivier Couraud、寺崎哲也. Targeted proteomicsによる血液脳関門のtight junction構成タンパク質の網羅的な同定. 日本薬剤学会第23年会. 2008年5月20日-22日. 札幌
  11. 上家潤一、勝倉由樹、川上裕貴、大峰健、岩瀬怜、大槻純男、寺崎哲也. 第51回日本腎臓学会学術総会. 2008年5月30日-6月1日. 福岡
  12. 村田将、上家潤一、勝倉由樹、大槻純男、Pierre-Olivier Couraud、寺崎哲也. Targeted proteomics based comprehensive identification of tight junction proteins at the blood brain barrier. 日本薬物動態学会第23年会. 2008年10月30日-11月1日. 熊本
  13. 松宮浩太、伊藤慎悟、上家潤一、大槻純男、寺崎哲也. Antibody-free quantification method for amyloid-peptides by UPLC-MS/MS. 日本薬物動態学会第23年会. 2008年10月30日-11月1日. 熊本
  14. 小淵航、岩瀬怜、大槻純男、上家潤一、矢守隆夫、寺崎哲也. 定量的標的プロテオミクスを用いた胃癌及び乳癌細胞株における薬剤耐性に関わる候補トランスポーターの同定. 日本薬学会第129年会. 2009年3月26日-28日. 京都
  15. K. Ohmine, R. Iwase, J. Kamiie, Y. Katsukura, S. Ohtsuki, T. Terasaki. Quantitative transporter atlas of mouse blood-brain barrier determined by targeted absolute proteomics with novel in silico peptide selection criteria. Gordon Research conference "Barriers of the CNS. Jun 22-27 (2008). Tilton, NH. USA
  16. Y. Uchida, J. Kamiie, S. Ohtsuki, T. Terasaki. Reconstruction of in vivo BBB P-glycoprotein function based on its absolute expression amount and in vitro transport activity. Gordon Research conference "Barriers of the CNS. Jun 22-27 (2008). Tilton, NH. USA
  17. C. Ikeda, J. Kamiie, S. Ohtsuki, P.O. Couraud, T. Terasaki. Quantitative protein expression profile of transporters and receptors in immortalized human brain capillary endothelial cells by targeted absolute proteomics. The 11th international symposium on "Signal transduction in

- the Blood-Brain Barriers". Sep 18-20 (2008). Amsterdam, Netherlands
18. Y. Uchida, S. Ohtsuki, J. Kamiie, T. Terasaki. Reconstruction of in vivo P-glycoprotein function at blood-brain barrier by its absolute protein expression amount and transport activity in vitro. The 11th international symposium on "Signal transduction in the Blood-Brain Barriers". Sep 18-20 (2008). Amsterdam, Netherlands
19. T. Terasaki, Y. Katsukura, M. Tachikawa, S. Umezawa, J. Kamiie, K. Hososya, S. Ohtuski. Targeted absolute proteomics analysis of localization of transporters in mouse liver using LC-MS/MS. 2008 AAPS Annual Meeting and Exposition. Nov 16-20 (2008) Atlanta, GA, USA
20. S. Ohtsuki, H. Kawakami, J. Kamiie, T. Suzuki, T. Terasaki. Quantitative transporter atlas of human liver; quantitative protein expression profile of transporters by targeted absolute proteomics. 2008 AAPS Annual Meeting and Exposition. Nov 16-20 (2008). Atlanta, GA, USA
21. Y. Uchida, S. Ohtsuki, J. Kamiie, T. Terasaki. Reconstruction of P-glycoprotein function at blood-brain barrier based on its absolute expression amount and in vitro transport activity. 2008 AAPS Annual Meeting and Exposition. Nov 16-20 (2008). Atlanta, GA, USA
22. S. Aizawa, S. Ohtsuki, J. Kamiie, T. Terasaki. Identification of human candidate proteins for transporters from human protein database by informatics and targeted proteomics approach. 2008 AAPS Annual Meeting and Exposition. Nov 16-20 (2008). Atlanta, GA, USA

[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

上家潤一 (JUNICHI KAMIIE)  
 麻布大学・獣医学部・講師  
 研究者番号：10400269

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：