

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 3 日現在

機関番号： 33902
 研究種目： 基盤研究(C)
 研究期間： 2010 ～ 2012
 課題番号： 22590151
 研究課題名（和文） 薬物トランスポータと転写因子を標的とする
 抗がん剤耐性克服薬の開発に関する研究
 研究課題名（英文） Reversal of multidrug resistance by dual inhibitor of
 anticancer drug efflux transporter and transcription factor.
 研究代表者
 鍋倉 智裕 （ NABEKURA TOMOHIRO ）
 愛知学院大学・薬学部・教授
 研究者番号： 90298993

研究成果の概要（和文）： がん細胞に抗がん剤が効かなくなる現象、抗がん剤多剤耐性の原因である抗がん剤を排出する薬物トランスポータと細胞増殖を制御する転写因子の両者の働きを阻害する化合物を、食品成分などの天然物から見つけた。これら天然物は、よりよいがん薬物治療実施のための、新規抗がん剤の開発に役立つと考えられる。

研究成果の概要（英文）： Cancer drug resistance is mediated by anticancer drug efflux transporter and cell survival transcription factor. In this study, I found dual inhibitors of drug efflux transporter and transcription factor from natural compounds. These natural compounds are useful for the development of a new anticancer drug for better cancer chemotherapy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野： 薬剤学

科研費の分科・細目： 薬学・医療系薬学

キーワード： 医療薬剤学、抗がん剤耐性、薬剤反応性、食品、癌、トランスポータ

1. 研究開始当初の背景

日本人の死亡原因の1位はがんによるものであり、約三人に一人はがんで死亡する。外科手術、放射線治療とともに抗悪性腫瘍薬を用いたがん化学療法は現在でも極めて重要な役割を持つ。

抗がん剤耐性は、がん化学療法において深刻な問題である。はじめ効果のあった抗がん剤がその繰り返し投与により効かなくなり、次の薬剤の効果も次第になくなり、と最終的には治療に用いることのできる抗がん剤が

なくなり、患者は死亡していく。

P-糖タンパク質(MDR1/ABCB1)は抗がん剤多剤耐性がん細胞膜から発見された最初の薬物トランスポータである。P-糖タンパク質は2つのATP結合部位を持つ細胞膜12回貫通型の膜蛋白質であり、抗がん剤によりその発現が誘導される。P-糖タンパク質は、構造の異なる様々な抗がん剤(ビンブラスチンやパクリタキセルなど)を細胞外へ能動的に排出し細胞内濃度を低下させ、抗がん剤多剤耐性を引き起こす。

P-糖タンパク質が30年前に発見され、抗

がん剤耐性を引き起こすことが明らかとなった後、すぐにがん患者における耐性は克服されるだろうと楽観的な予測もあった。しかし、現実には抗がん剤耐性の問題は 21 世紀の現在でも解決されていない。その理由として、P-糖タンパク質を阻害する副作用の少ない適切な化合物がないこと、P-糖タンパク質の発現が変動する機構が未解明なこと、がある。

P-糖タンパク質は腫瘍組織以外に小腸、腎臓、肝臓、胎盤、血液脳関門などの正常組織にも発現し、抗がん剤以外のジゴキシン、ベラパミル、シクロスポリン A 等临床上に常用される多くの医薬品を基質として輸送するため、薬物の体内動態の決定に重要な役割を果たす。P-糖タンパク質の基質薬物のベラパミルやシクロスポリンなどを用いて抗がん剤排出を阻害し、多剤耐性を克服する試みが行われた。しかし、その薬物自体の持つ薬効・副作用の発現により望ましい成果はあげられていない。

転写因子 Nuclear Factor- κ B (NF- κ B) は生存・増殖など細胞の基本機能の維持に極めて重要な役割を果たし、近年研究が著しい進展をとげている。NF- κ B は通常、p50:RelA ヘテロ 2 量体として、I κ B (Inhibitor of κ B) と結合し、細胞質内にとどまり不活性化状態にある。サイトカインやリポ多糖 (LPS)、抗がん剤など様々なストレスの刺激を受け、IKK (I κ B kinase) が I κ B をリン酸化する。リン酸化 I κ B はプロテアソームによって分解され、NF- κ B (p50:RelA) は核内に移行し標的遺伝子の発現を誘導する。NF- κ B の標的には IAP (inhibitor of apoptosis)、XIAP (X 染色体連鎖性 IAP)、c-FLIP (FLICE (カスパーゼ 8) 阻害蛋白質)、Bcl-2、Bcl-XL など抗アポトーシス蛋白質があり、カスパーゼ経路を阻害し細胞死を抑制する。つまり、抗がん剤 (ビンブラスチンやパクリタキセルなど) による NF- κ B 活性化が、抗がん剤耐性を引き起こす。

2. 研究の目的

本研究の目的は、抗がん剤を排出する薬物トランスポーター (P-糖タンパク質) と細胞増殖を制御する転写因子 Nuclear Factor- κ B (NF- κ B) の両者を阻害し、耐性を克服し抗がん剤の作用を増強する化合物を天然物の中から探索するとともに、その阻害機構の詳細について検討し、新規抗がん剤開発の基礎とすることである。

3. 研究の方法

P-糖タンパク質非発現抗がん剤感受性細胞 KB-3-1 にヒト MDR1 遺伝子を導入した多剤

耐性細胞 KB/MDR1 は、京都大農学部植田和光教授から供与されたものを用いた。P-糖タンパク質高発現ヒト大腸がん由来 HCT-15 細胞は細胞バンク ATCC から入手した。

海外共同研究者であるキエーティ大 Genovese らは、柑橘類等に含まれる多様なプレニルオキシクマリン類の合成を行っている (Phytochemistry, 68: 939-53 (2007), Bioorganic & Med. Chem. Lett., 16: 5523-5 (2007))。実験に用いたプレニルオキシクマリン類化合物は、イタリア・キエーティ大学薬学部 Dr. S. Genovese が合成したものを用いた。連携研究者である新潟薬科大学の中村らは、新しいアミノ基のフルオラス保護基を開発し、ホヤなどの海洋生物から発見された、オキサゾールやチアゾール環等を有する特殊アミノ酸を含む環状ペプチド、新規海洋天然物のピストラタミド類やテヌエシクラミド類の全合成に成功している (Tetrahedron Lett., 47: 239-243 (2006))。実験に用いたピストラタミド類は新潟薬科大学応用生命科学部中村豊博士が合成したものを用いた。

P-糖タンパク質の蛍光基質であるダウノルビシンとローダミン 123 を用いて、KB/MDR1 細胞におけるこれら基質蓄積量を測定した。24 well プレートに 1×10^5 cell/well となるように植え継いだ KB/MDR1 細胞に $10 \mu\text{M}$ ダウノルビシン又は $20 \mu\text{M}$ ローダミン 123 を加え、天然物共存下、 37°C で 1 時間培養した。その後、培地を除去し、氷冷 phosphate-buffered saline (PBS) で洗浄し、ダウノルビシンでは 1 % sodium dodecyl sulfate (SDS)、ローダミン 123 では 0.1 % triton-X-100 で細胞を可溶化し、蛍光プレートリーダー (Fluoroskan ascent, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) で蛍光強度を測定して細胞内基質量を求めた。蛍光強度測定時の励起波長 (Ex)、蛍光波長 (Em) は、ダウノルビシンでは Ex 485 nm, Em 590 nm、ローダミン 123 では Ex 485 nm, Em 538 nm にて行なった。また、Lowry 法により蛋白量を求め、細胞内基質量 (nmol/mg protein) を算出した。

NF- κ B 活性化に及ぼす天然物の影響は、レポーターアッセイを用いて測定した。ホタルルシフェラーゼ遺伝子上流に NF- κ B 応答配列を持つ pGL 4.32 (Promega, Madison, WI, USA) 及び、ウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子上流に herpes simplex virus 1-thymidine kinase (HSV-TK) を持つ pGL 4.74 (Promega) を Fugene HD Transfection Reagent (Roche, Indianapolis, IN, USA) を用いて KB/MDR1 または HCT-15 細胞へ遺伝子導入した。24 時間培養後、D-MEM で細胞を一度洗浄し、D-MEM 1 mL を加えた。添加薬物を加え 1 時間培養後、TNF- α を $20 \text{ ng}/\mu\text{L}$

となるように加えた。さらに5時間培養後、Reporter Lysis Buffer (Promega) を加え、凍結融解して細胞を可溶化し、Dual-Glo Luciferase Reagent (Promega) を加えてルミノメーター (GloMax 20/20n, Promega) で発光強度を測定してホタルルシフェラーゼ活性を測定した。次に、Stop&Glo Reagent を加え、発光強度を測定してウミシイタケルシフェラーゼ活性を測定した。

抗がん剤ビンブラスチン細胞毒性に対する天然物の影響は、テトラゾリウム塩 WST-8 (Cell Counting Kit-8、同仁化学研究所、熊本) を使用して測定した。KB/MDR1 または HCT-15 細胞を 96 well プレートに 2.5×10^4 cell/well となるように植え継ぎ、天然物の共存または非共存下で各濃度のビンブラスチンを加えて2日間培養後、WST-8 を加え、さらに4時間培養し、マイクロプレートリーダー (Multiskan Spectrum, Thermo Fisher Scientific) を用いてホルマザン色素の吸光度を測定した (450 nm)。

P-糖タンパク質のATP加水分解活性測定にはヒトP-糖タンパク質 cDNA をバキュロウイルスにより昆虫細胞に組み込んで発現させたヒトP-糖タンパク質発現膜画分 (BD, Woburn, MA, USA) を用いた。ヒトP-糖タンパク質発現膜画分を 1.25 mg/mL となるように懸濁し、5 mM ATP 及び 100 μ M 天然物を加え、37 $^{\circ}$ C で 40 分間保温、その後ルシフェラーゼによって残存している ATP から生じる発光を、ルミノメーター (GloMax 20/20n, Promega) で測定した。

4. 研究成果

(1) 薬物排出トランスポータ P-糖タンパク質阻害天然物の探索

50 μ M 天然物共存下、ダウノルビシンの KB/MDR1 細胞内蓄積量を測定したところ、caffeic acid phenethyl ester (CAPE)、licochalcone A、anacardic acid、celastrol、xanthohumol、magnolol、honokiol 共存で蓄積量が有意に増加した。一方、lupeol、 α -amyrin、maslinic acid、withaferin A、ganoderic acid A、butein、zerumbone、thymoquinone、emodin、aloe-emodin、anethol、eugenol 共存では大きな影響がなかった。この結果から、CAPE、licochalcone A、xanthohumol、celastrol、anacardic acid、magnolol、honokiol が P-糖タンパク質によるダウノルビシン排出を阻害することが示された。

50 μ M 天然物共存下、ローダミン 123 の KB/MDR1 細胞内蓄積量を測定したところ、CAPE、licochalcone A、anacardic acid、celastrol、xanthohumol、magnolol、honokiol、

celastrol 共存で蓄積量が有意に増加した。一方、ダウノルビシンでの実験と同様に、lupeol、 α -amyrin、maslinic acid、withaferin A、ganoderic acid A、butein、zerumbone、thymoquinone、emodin、aloe-emodin、anethol、eugenol 共存では影響がなかった。

さまざまな濃度の天然物を共存させて KB/MDR1 細胞内ローダミン 123 蓄積量を測定した。CAPE、licochalcone A、anacardic acid、celastrol、xanthohumol、magnolol、honokiol の濃度が増加するに従い、ローダミン 123 の細胞内蓄積量も有意に増加した (図 1、2)。

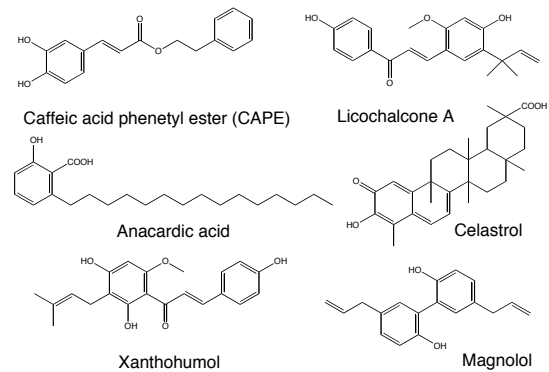


図 1 P-糖タンパク質阻害天然物の化学構造

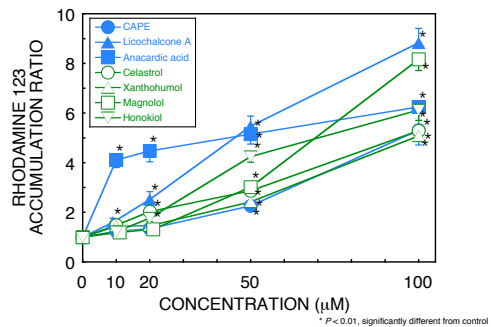


図 2 KB/MDR1 細胞へのローダミン 123 蓄積に及ぼす天然物の影響

これらの結果から、CAPE、licochalcone A、anacardic acid、celastrol、xanthohumol、magnolol、honokiol が P-糖タンパク質による薬物排出を阻害することが示された。

P-糖タンパク質機能へ及ぼす

3-(4'-geranyloxy-3'-methoxyphenyl)-2-trans propenoic acid、3-(4'-isopentenyl-oxy-3'-methoxyphenyl)-2-trans propenoic acid、など 11 種類の新規合成プレニルオキシマリン類化合物と bistratamide C、bistratamide H の 2 種類の新規海洋天然物ビ

ストラタミド類の影響について検討した。実験に用いたいずれの化合物も P-糖タンパク質によるダウノルビシンまたはローダミン 123 排出へ影響しなかった。

(2) 天然物による P-糖タンパク質機能阻害機構

ヒト P-糖タンパク質発現膜画分を用いて、CAPE、licochalcone A、anacardic acid、celastrol、xanthohumol、magnolol、honokiol (100 μ M) 共存での P-糖タンパク質による ATP 加水分解活性を測定した。P-糖タンパク質の基質であるベラパミル (200 μ M) 共存では P-糖タンパク質の ATP 加水分解活性が促進された (439%)。また、CAPE (325%)、licochalcone A (239%)、anacardic acid (423%)、celastrol (382%)、xanthohumol (343%)、magnolol (530%)、honokiol (223%) 共存でも P-糖タンパク質の ATP 加水分解活性が促進された。

P-糖タンパク質の ATP 加水分解と基質輸送は密接に関連し、P-糖タンパク質によって輸送される化合物は ATP 加水分解活性を促進することが報告されている。そのため、各天然物は P-糖タンパク質の基質結合部位において、他の薬物の排出を競合的に阻害することが考えられる。

(2) 転写因子 NF- κ B 活性化阻害天然物の探索

ホタルルシフェラーゼ上流に NF- κ B 応答配列を持つ pGL 4.32 (Promega) を KB/MDR1 細胞へ遺伝子導入した。腫瘍壊死因子 α (TNF- α) によって NF- κ B ルシフェラーゼ活性は 8.64 ± 1.00 倍に上昇した。しかし、1 μ M CAPE 共存で 3.29 ± 0.35 倍、2 μ M CAPE 共存で 2.71 ± 0.81 倍、5 μ M CAPE 共存で 1.13 ± 0.32 倍と、CAPE の濃度が増加するに従って TNF- α による NF- κ B 活性化が強く阻害された。また、licochalcone A、anacardic acid、xanthohumol 共存でも同様に、濃度が増加するに従って TNF- α による NF- κ B 活性化が阻害された。HCT-15 細胞を用いた同様な検討でも、CAPE、licochalcone A、anacardic acid、xanthohumol 共存で TNF- α または LPS による NF- κ B 活性化が阻害された。

これらの結果から、CAPE、licochalcone A、anacardic acid、xanthohumol が NF- κ B 活性化を阻害することが示された。

(3) P-糖タンパク質と NF- κ B 活性化の両者を阻害する天然物による抗がん剤作用増強効果

これまでの検討で明らかとなった P-糖タ

ンパク質と NF- κ B 活性化の両者を阻害する天然物の抗がん剤作用増強効果について検討した。CAPE (5 μ M)、licochalcone A (5 μ M)、anacardic acid (2 μ M)、xanthohumol (20 μ M)、magnolol (5 μ M)、honokiol (5 μ M) の共存あるいは非共存下、種々の濃度のビンブラスチンを KB/MDR1 細胞へ加え細胞毒性について測定した。ビンブラスチン濃度が 0.4 μ M の場合には、control では 90.14 ± 2.83 %の細胞が生存していたが、CAPE 共存で 73.05 ± 1.75 %、licochalcone 共存で 63.42 ± 1.73 %、xanthohumol 共存で 72.75 ± 3.38 %に生存細胞が減少した。また、ビンブラスチン濃度が 0.1 μ M の場合には、control では 97.54 ± 1.53 %の細胞が生存していたが、anacardic acid 共存で 55.12 ± 9.22 %、honokiol 共存で 58.19 ± 6.18 %に生存細胞が減少し、さらに vinblastine 濃度が 0.4 μ M の場合には magnolol 共存で 67.09 ± 3.41 %に生存細胞が減少していた (図 3)。HCT-15 細胞を用いた同様な検討でも、CAPE、licochalcone A、anacardic acid、xanthohumol 共存でビンブラスチンの細胞毒性が増強された。

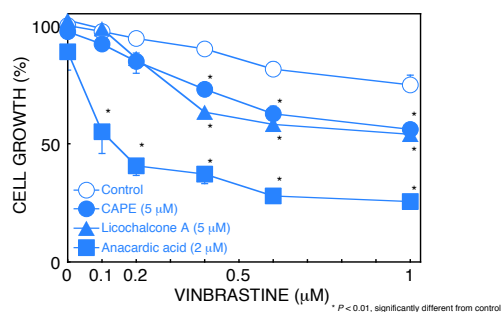


図 3 KB/MDR1 細胞へのビンブラスチン毒性に及ぼす天然物の影響

これらの結果から、CAPE、licochalcone A、anacardic acid、xanthohumol、magnolol、honokiol 共存では、ビンブラスチン単独と比較してより低濃度で細胞増殖が抑制され、抗がん剤耐性が克服されることが示された。

以上の結果から、CAPE、licochalcone A、anacardic acid、xanthohumol、magnolol、honokiol など、いくつかの天然物は薬物トランスポーター P-糖タンパク質機能と転写因子 NF- κ B 活性化の両者を阻害し、抗がん剤の作用を増強することが示された。これら化合物はより安全で効果の高いがん化学療法を実施するため、新規抗がん剤開発の基礎として有用であることが示唆された。

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2件)

①. Nabekura, T.
Overcoming multidrug resistance in human cancer cells by natural compounds.
Toxins, Vol.2 No. 6, pp.1207-1224 (2010)
査読有

②. Nabekura, T., Yamaki, T., Hiroi, T., Ueno, K. and Kitagawa, S.
Inhibition of anticancer drug efflux transporter P-glycoprotein by rosemary phytochemicals.
Pharmacological Research, Vol. 61 No. 3, pp. 259-263 (2010) 査読有

[学会発表] (計7件)

①. Nabekura, T., Hiroi, T. and Ueno, K.
Inhibition of human P-glycoprotein by natural nuclear factor-kappaB inhibitors.
International Symposium on Past, Present and Future of Molecular Pharmacokinetics (2012年1月17日, 東京)

②. 鍋倉智裕, 廣井 貴, 上野和行
抗がん剤排出トランスポーター ABCB1 に及ぼす抗腫瘍活性天然物の阻害作用.
第84回日本生化学会大会 (2011年9月22日, 京都)

③. Nabekura, T., Hiroi, T. and Ueno, K.
Interaction of natural nuclear factor-kappaB inhibitors with human P-glycoprotein.
BioMedical Transporters 2011 (2011年8月10日, Grindelwald, Switzerland)

④. 鍋倉智裕, 廣井 貴, 上野和行
P-糖タンパク質に及ぼす抗腫瘍活性天然物の阻害作用.
日本薬学会第26年会 (2011年5月31日, 東京)

⑤. 鍋倉智裕, 廣井 貴, 上野和行
P-糖タンパク質に及ぼす転写因子 NF- κ B 阻害天然物の影響.
日本薬学会第131年会 (2011年3月29日, 静岡)

⑥. Nabekura, T., Hiroi, T. and Ueno, K.
Cancer chemoprevention and chemosensitization by natural compounds.
The 5th International Niigata Symposium on Diet and Health

(2010年10月30日, 新潟)

⑦. 廣井 貴, 上野和行, 鍋倉智裕
P-糖タンパク質機能に及ぼす転写因子 NF-kappaB 阻害天然物の影響.
第25回日本薬物動態学会 (2010年10月8日, さいたま)

[図書] (計7件)

①. 鍋倉智裕, 他
Applied 臨床薬物動態学,
京都廣川書店, 2013年, pp.43-69.

②. 鍋倉智裕, 他
NEW パワーブック生物薬剤学第二版増補版,
廣川書店, 2012年, pp.9-35.

③. 鍋倉智裕, 他
コンパス薬物速度論演習,
南江堂, 2012年, pp.17-74.

④. 鍋倉智裕, 他
NEW パワーブック生物薬剤学第二版,
廣川書店, 2011年, pp.9-35.

⑤. Nabekura, T., 他
Chocolate, Fast Foods and Sweeteners:
Consumption and Health,
Nova Sciences Publishers, Inc., 2010年,
pp.279-290.

⑥. 鍋倉智裕, 他
コンパス生物薬剤学,
南江堂, 2010年, pp.105-123.

⑦. 鍋倉智裕, 他
薬物動態学,
廣川書店, 2010年, pp.99-111.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鍋倉 智裕 (NABEKURA TOMOHIRO)
愛知学院大学・薬学部・教授
研究者番号: 90298993

(2) 連携研究者

中村 豊 (NAKAMURA YUTAKA)
新潟薬科大学・応用生命科学部・教授
研究者番号: 20267652