

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月2日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791162

研究課題名（和文） MRP1モジュレーターのスクリーニング解析法の確立

研究課題名（英文） Development of analysis for 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）：

薬物排出を担う多剤耐性関連蛋白質と同じ部位に結合し、薬物排出と拮抗し薬物耐性克服する化合物を用いた耐性克服効果の検討を行うことによって、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た。MRP1が高発現した耐性化細胞を樹立し、薬剤感受性試験により耐性化細胞に各種抗癌剤への耐性化を確認した。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モジュレーターであること証明した。さらに、MRP1における遺伝子多型と機能解析、モジュレーターに与える影響を解析した。今後のオンコロジーリサーチの中でも注目されていく結果となった。

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. The results were important findings for oncologic research. 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
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

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：癌、薬剤反応、ABC トランスポーター、多剤耐性関連蛋白質 (MRP1)

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。MRP1 モジュレーターとなりえる薬剤について、近年盛んに報告されており、我々も新規モジュレーターを検索することで、世界に発表することができるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、モジュレーター検索法を確立させ、新しいスクリーニング法として提案することである。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MRP1mRNA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 9 件)

1. Ozeki M, Kanda K, Kawamoto N, Ohnishi H, Fujino A, Hirayama M, Kato Z, Azuma E, Fukao T, Kondo N: Propranolol as an alternative treatment option for pediatric lymphatic malformation. *Tohoku J Exp Med.* 229, 61-66 (2013). (査読あり)
2. Funato M, Kaneko H, Sasai H, Kubota K, Ozeki M, Kanda K, Kato Z, Kondo N. Peripheral blood stem cell transplantation in a significant body weight difference between a smaller donor and a larger recipient: A case report. *Transfus Apher Sci.* 2013 Feb 16. doi:pil: S1473-0502(13)00031-1. 10.1016/j.transci.2013.01.015. (査読あり)
3. Kuramitsu M, Matsubara A, Morio T, Takagi M, Toki T, Terui K, RuNan W, Kanno H, Ohga S, Ohara A, Kitoh T, Sugita K, Kudo T, Matsubayashi T, Mizue N, Ozeki M, Masumi A, Momose H, Takizawa K, Mizukami T, Yamaguchi K, Ogawa S, Ito E, Hamaguchi I. Extensive gene deletions in Japanese patients with Diamond-Blackfan anemia. *Blood.* 119, 2376-84 (2012). (査読あり)
4. Funato M, Fukao T, Sasai H, Hori T, Terazawa D, Kanda K, Ozeki M, Mizuta K, Hirose Y, Kaneko H, Kondo N. Paclitaxel-based chemotherapy for aggressive kaposiform hemangioendothelioma of the temporomastoid region: Case report and review of the literature. *Head Neck.* doi: 10.1002/hed.23107 (2012). (査読あり)
5. Ozeki M, Fukao T, Kondo N: Propranolol for intractable diffuse lymphangiomatosis. *N Engl J Med.* 364, 1380-2 (2011). (査読あり)
6. Funato M, Kaneko H, Kubota K, Ozeki M, Kanda K, Orii K, Kato Z, Fukao T, Kondo N. Pediatric acute lymphoblastic leukemia mimicking Henoch-Schönlein purpura. *Pediatr Int.* 53, 766-8 (2011).
7. Funato M, Fukao T, Sasai H, Hori T, Terazawa D, Kubota K, Ozeki M, Orii K, Kaneko H, Kondo N. Successful treatment of pediatric immune thrombocytopenic purpura associated with ulcerative colitis. *Pediatr Int.* 2011 Oct;53(5):771-3. (査読あり)
8. Ozeki M, Funato M, Teramoto T, Ohe N, Asano T, Kaneko H, Fukao T, Kondo N. Reversible cerebrospinal fluid edema and porencephalic cyst, a rare complication of ventricular catheter. *J Clin Neurosci.*

17, 658-61 (2010). (査読あり)

9. 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. 125, e17-22 (2010). (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

なし