

中富 克己 論文内容の要旨

主 論 文

Transport of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38) by breast cancer resistance protein ABCG2 in human lung cancer cells.

(ヒト肺癌細胞では7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシン (SN-38)は乳癌耐性蛋白 ABCG2 により輸送される)

中富克己, 吉川恵美, 岡三喜男, 池上洋二, 早坂進也, 佐野和美, 塩澤健, 川畑茂, 早田宏, 石川智久, 田辺信三, 河野茂

Biochem Biophys Res Commun 288 (4): 827-832, 2001

長崎大学大学院医学研究科内科系専攻  
指導教員：河野 茂 教授

緒 言

塩酸イリノテカン (CPT-11) は I 型 DNA トポイソメラーゼ阻害作用により幅広い抗腫瘍活性を有し、特に肺癌の分野では標準的治療薬の 1 つである。一方、癌化学療法において癌細胞自身の抗癌薬への耐性獲得は治療の大きな障害であり、様々な機序が関与していると考えられる。その機序の 1 つとして細胞外への抗癌薬排出の亢進があり、特に ABC (ATP Binding Cassette) トランスポーターと呼ばれる膜蛋白のグループが関与している。近年、乳癌耐性蛋白 BCRP/ABCG2 の過剰発現により癌細胞が、I 型 DNA トポイソメラーゼ阻害薬 (トポテシン及び SN-38 ; CPT-11 の代謝活性物質) などに対し耐性を獲得するという報告がなされている。また、我々は小細胞肺癌親株 PC-6 と比較して、その SN-38 耐性株 PC-6/SN2-5H で BCRP/ABCG2 が過剰発現し、SN-38 と SN-38-glucuronide (グルクロン酸抱合 SN-38) の細胞内濃度が著明に低下していることを報告した (Kawabata S, et al. Breast cancer resistance protein directly confers SN-38 resistance of lung cancer cells. **Biochem Biophys Res Commun** 280 (5): 1216-1223, 2001)。このことは BCRP/ABCG2 の発現が CPT-11 耐性に深く関わる可能性を示唆している。本研究では、SN-38 及び SN-38-glucuronide の膜輸送と BCRP/ABCG2 との関連性をさらに調べるために、PC-6 と SN-38 耐性株 PC-6/SN2-5H より得られた人工的な細胞膜 (反転膜小胞) を用いて検討を行った。

## 対象と方法

SN-38 と SN-38-glucuronide はヤクルト本社より提供を受けた。細胞は、小細胞肺癌細胞株 PC-6 (感受性株) に SN-38 を暴露し樹立した高度 SN-38 耐性株であり BCRP/ABCG2 が過剰発現している PC-6/SN2-5H を用いた。BCRP/ABCG2 の発現は Westernblot で検討し、他の ABC トランスポーターの発現は RT-PCR で検討した。

PC-6 及び PC-6/SN2-5H の細胞膜は、細胞を高圧窒素ガスで破壊後、ショ糖不連続密度勾配遠心分離により調整した。調整された細胞膜を用い反転膜小胞を形成し、種々の条件下で反転膜小胞内へ取り込まれた SN-38 と SN-38-glucuronide の薬量を HPLC を用いて定量測定した。

## 結 果

BCRP/ABCG2 蛋白は PC-6 の膜蛋白には発現しておらず、PC-6/SN2-5H の膜蛋白のみに発現していた。*MRP1* mRNA は PC-6 に比べ PC-6/SN2-5H では発現が低く、*MDR1*、*MRP2*、*MRP3* mRNA は両株ともに発現は認められなかった。BCRP/ABCG2 蛋白を発現していない PC-6 細胞膜より得られた反転膜小胞では、SN-38 と SN-38-glucuronide どちらの基質もほとんど取り込みは認められなかったが、BCRP/ABCG2 蛋白を高発現している PC-6/SN2-5H の細胞膜より得られた反転膜小胞では、両基質とも経時的な取り込みを認めた。また、PC-6/SN2-5H の反転膜小胞への両基質の取り込みは 0 - 5 mM の ATP 濃度下において濃度依存性に増加しており、両基質ともに ATP 依存性が証明された。さらに、PC-6/SN2-5H の反転膜小胞の ATP 依存的な輸送活性 ( $V_{max}/K_m$ ) は親株 PC-6 の反転膜小胞と比べて、SN-38 で約 180 倍、SN-38-glucuronide で約 10 倍の輸送活性があり、BCRP/ABCG2 蛋白は SN-38-glucuronide よりも SN-38 に親和性が高いことが示唆された。

## 考 察

本研究に使用した小細胞肺癌細胞 PC-6 細胞系では、*BCRP/ABCG2* mRNA は親株 PC-6 には発現していないが、SN-38 耐性株 PC-6/SN2-5H において強発現していることは既に報告している (Kawabata S, et al. Breast cancer resistance protein directly confers SN-38 resistance of lung cancer cells. **Biochem Biophys Res Commun** 280 (5): 1216-1223, 2001)。今回、蛋白レベルでも同様な結果が得られ、耐性株の細胞膜上に BCRP/ABCG2 蛋白が高発現していることが証明された。SN-38 の膜輸送に関与するとされている *MRP1* mRNA は親株 PC-6 に比べ耐性株 PC-6/SN2-5H では発現が低く、*MDR1*、*MRP2*、*MRP3* mRNA は両株ともに発現は認めておらず、耐性株 PC-6/SN2-5H の反転膜小胞における両基質の取り込みは BCRP/ABCG-2 によるものと考えられた。さらに両基質に対する ATP 依存的な輸送活性 ( $V_{max}/K_m$ ) を検討したところ、BCRP/ABCG-2 は SN-38-glucuronide よりも SN-38 を早く輸送することが示唆された。このことにより肺癌細胞株での CPT-11 耐性は、細胞内に取り込まれた代謝活性産物 SN-38 が細胞内でグルクロン酸抱合されることよりも SN-38 が BCRP/ABCG-2 により細胞外に排出されることで、耐性を獲得したと推測された。