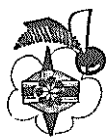


海洋生物からのがん多剤耐性克服物質の探索



研究ノート

青木 俊二*, 小林 資正**

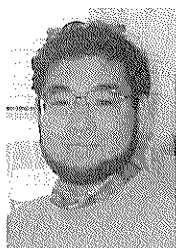
Search for New MDR-Modulator in Cancer from Marine Organisms
 Key Words : multidrug resistance, P-gp, MRP1, ABC transporter, marine sponge

1. はじめに

すべての細胞は脂質二重膜によって外部環境から隔てられているので、栄養の摂取や老廃物の排泄など物質の膜透過が細胞機能を維持するのに不可欠である。膜輸送は、輸送される基質に対応する特定の膜蛋白質を介して行われている。ABC(ATP Binding Cassette)トランスポートスーパーファミリーは、これらの膜蛋白ファミリーの中でも最大で、大腸菌からヒトまで広範な種に存在し、これまでに100種類以上のABCトランスポーターが確認され、生理的機能についての研究も精力的に進められている。また、ABCトランスポーターの関係する疾病も数多く報告されており、臨床的な問題と関係していることから注目されている。

2. ABCトランスポーターとがん多剤耐性

作用機序も化学構造も異なる数種の抗がん剤に同時に薬剤耐性を獲得した細胞は「多剤耐性がん細胞」



* Shunji AOKI
 1964年3月生
 平成元年京都薬科大学・生物薬学科卒業
 現在、大阪大学・薬学研究科・天然物化学分野、助手、薬博、生物有機化学
 TEL 06-6879-8217
 FAX 06-6879-8219
 E-Mail aoki@phs.osaka-u.ac.jp



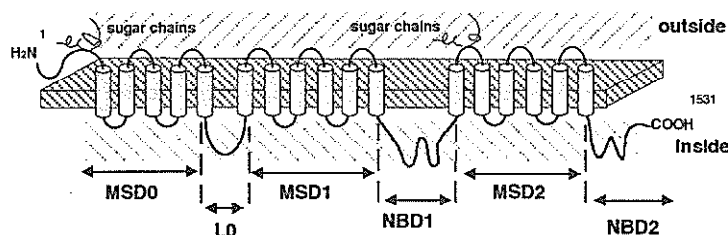
** Motomasa KOBAYASHI
 1951年7月生
 昭和49年大阪大学・薬学部・製薬化学科卒業
 現在、大阪大学・薬学研究科・天然物化学分野、教授、薬博、天然物化学
 TEL 06-6879-8215
 FAX 06-6879-8219
 E-Mail kobayasi@phs.osaka-u.ac.jp

と呼ばれ、がん化学療法の大きな障害となっている。がん細胞が多剤耐性を獲得するメカニズムはいくつか知られているが、その一つとして、がん細胞が抗がん剤を細胞外に排出する一種のポンプ機構を有する膜蛋白質を過剰発現し、細胞内の抗がん剤濃度を低く保つことによって耐性を獲得するという機構が注目されている。このポンプ機構を担う膜蛋白質としてABCトランスポートスーパーファミリーに属するP-glycoprotein(P-gp)¹⁾や multidrug resistance-associated protein 1(MRP1)²⁾が見出されている。P-gpおよびMRP1は、それぞれ2個もしくは3個の6回膜貫通領域と2個のATP結合部位を有しており、ATPを加水分解したエネルギーを用いて抗がん剤などの基質を細胞外へ排出することが知られている(Fig.1)。Ca拮抗薬ベラパミルがP-gpの関与する耐性を克服出来ることが報告されて以来³⁾、数多くのP-gpに対する耐性克服物質(P-gpの基質輸送に対する阻害剤)が報告されているが、その多くが本来の薬効が副作用となるために臨床では使えない。また、MRP1に対する耐性克服物質はP-gpに比較すると非常に少なく⁴⁾⁵⁾、P-gpに対する耐性克服物質のほとんどはMRP1の関与する耐性を克服出来ない。

3. がん多剤耐性克服物質の探索

このような背景から、多剤耐性がん細胞に対する耐性克服物質を探索する研究が活発に行われており、私達の研究室でも新規抗腫瘍物質の探索と平行して、海綿を中心とする底生海洋無脊椎動物の産生成分から新規多剤耐性克服物質を探索している。多剤耐性がん細胞は、鹿児島大・医・腫瘍研の秋山等により抗がん剤の存在下に継代培養して樹立されたP-gpを過剰発現するヒト咽頭上皮がん細胞KB-C2株およびMRP1を過剰発現するKB-CV60株を用いた。実験は96穴マイクロプレートに耐性がん細胞を分注

multidrug resistance associated protein (MRP1)



P-glycoprotein (P-gp)

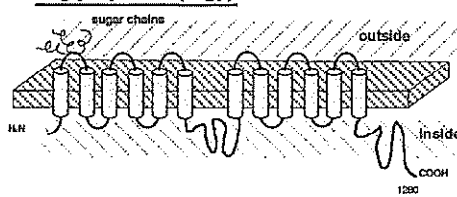
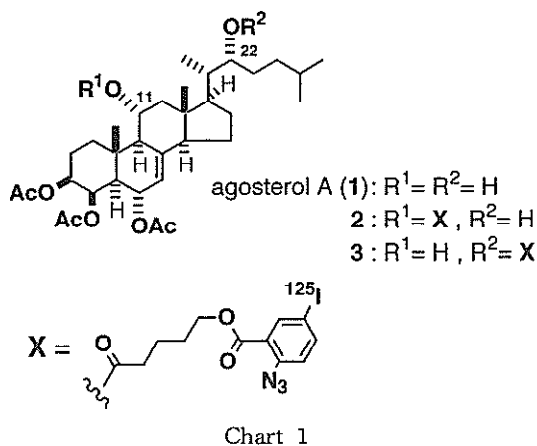


Fig. 1 Topology of P-glycoprotein and MRP1

し、24時間培養後、耐性許容濃度の抗がん剤と被験薬物を作用させ、48時間後にMTT法によって細胞の生育阻害率を判定した。

三重県英虞湾で採取した*Spongia*属海綿から、上記の活性試験を指標にして分画し、活性成分のステロールアセテート agosterol A(1)を発見した。Agosterol A(1)は、分子内に3個のアセチル基と2個の水酸基を有する高度に酸化されたステロイドであり (Chart.1)⁶⁾、低濃度でP-gpおよびMRP1を過剰発現する多剤耐性がん細胞の多剤耐性を克服することができる。そして種々の実験から、agosterol AはP-gpおよびMRP1に直接作用し、そのポンプ機構を阻害することにより耐性克服作用を示すことが明らかになった。⁷⁾



4. Agosterol Aプローブを用いたMRP1の機能解析

これまでに、分子生物学的な手法を用いてP-gpやMRP1の機能解析が行われているが、MRP1の基質結合部位や、P-gpには存在しないもう一つの膜貫通領域MSD0とリンカー領域L0の役割、さらにはMRP1が薬物輸送する際に必要なグルタチオン(GSH)の働き等不明な点が多い。そこで、agosterol

A(1)から合成した放射性標識光親和性プローブを用いて、秋山等と共同でMRP1の機能解析を試みた。

まず、¹²⁵Iを導入した光親和性補助基を短いリンカーを介して1の水酸基に結合させた2種のプローブ2および3を合成し、これらのプローブをMRP1過剰発現細胞(KB-CV60)から調製した膜画分とインキュベートし、光照射した。その結果、11位水酸基に光親和性補助基を結合させたプローブ2のみがMRP1に強く結合できることが明らかになった(Fig.2)。さらに、2を用いたMRP1のラベル化は、MRP1によって輸送される抗がん剤ビンクリスチンの共存によって拮抗された。⁸⁾ここで特筆すべき点は、このプローブはGSH存在時のみMRP1をラベルできるという優れた選択性を有していることである。この実験結果は、GSH依存的にMRP1をラベルできたはじめての実験例であり、MRP1の基質認識部位の特定だけでなく、GSHの働きについての知見を得るための有用な手がかりになるものと考えられた。

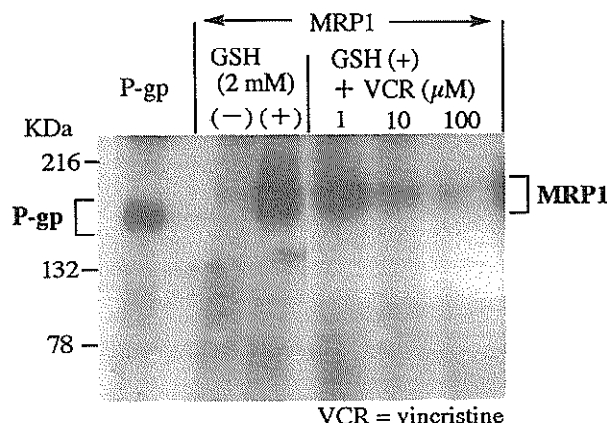


Fig. 2 Photolabeling of MRP1 with photoaffinity probe 2.

次に、MRP1の薬物結合部位の解析を試みた。すなわち、MRP1膜画分をプローブ2でラベル化した

後、トリプシンで限定分解して得られる分解物を、SDS-pageで解析したところ、C末端側のフラグメントがラベルされていることが明らかになり、MRP1の薬物結合部位はMSD2領域に存在する可能性が高いと考えられた。⁸⁾

これまでに、MRP1のMSD0領域を除いたcDNAを昆虫細胞に発現させたmutant蛋白L0 Δ MRPは、全長のMRP1と同程度の基質輸送能を保持しており、一方、膜貫通領域間のリンカー部分L0も持たないmutant蛋白 Δ MRPは、ほとんど基質輸送能を示さないことが明らかになっている。⁹⁾そこで、これら2種のmutant蛋白を用いてラベル実験を行った結果、L0 Δ MRPはGSHの濃度依存的にプローブ2によってラベルされたのに対し、 Δ MRPはグルタチオン非依存性の弱い結合を示すのみであった(Fig.3)⁸⁾以上の結果から、リンカー部分L0は、MRP1のGSH依存性の基質結合に必須であり、MRP1におけるGSHの作用部位ではないかと推定している。

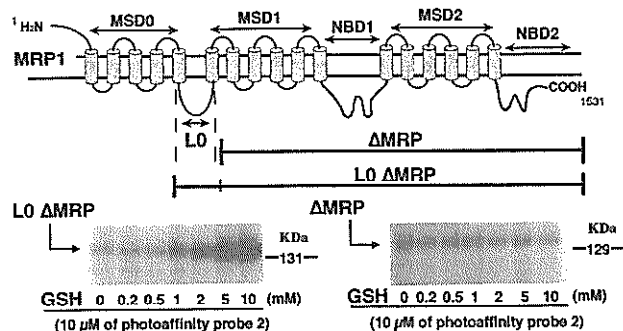


Fig. 3 Comparison of GSH-dependent photolabeling of L0 Δ MRP and Δ MRP with photoaffinity probe 2.

5. おわりに

ターゲット分子に特異的に作用する化合物を発見し、それら阻害物質から化学合成したプローブを用いて細胞内情報伝達系を解析する方法は、分子生物学的手法と相補的に用いることで明確な結果が得られ、非常に有用な方法であると考えられる。天然物から活性化合物をスクリーニングすることで、既存の化合物の構造にとらわれない特異な構造を有する活性物質が得られることは非常に興味深く、これからもバイオプローブとして有用な活性天然物質の発見が望まれる。

6. 参考文献

- 1) Gerlach, J. H. et al., *Nature* 324, 485-489 (1986).
- 2) Cole, S. P. C. et al., *Science* 258, 1650-1654 (1992).
- 3) Tsuruo, T. et al., *Cancer Res.*, 41, 1967-1972 (1981).
- 4) Sumizawa, T. et al., *Mol. Pharmacol.*, 51, 399-405 (1997).
- 5) Gekeler, V. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 208, 345-352 (1995).
- 6) a) Aoki, S. et al., *Tetrahedron Lett.*, 39, 6303-6306 (1998).
b) Aoki, S. et al., *Tetrahedron*, 55, 13965-13972 (1999).
- 7) a) Aoki, S. et al., *Jpn. J. Cancer Res.*, 92, 886-895 (2001).
b) Chen, Z-S. et al., *Int. J. Cancer*, 93, 107-113 (2001).
- 8) Ren, X-Q. et al., *J. Biol. Chem.*, 276, 23197-23206 (2001).
- 9) Bakos, E. et al., *J. Biol. Chem.* 273, 32167-32175 (1998).

