

2018 年度
博士学位論文

ヒト ABC 輸送体 ABCB1 の基質および基質認識に関する研究

中部大学大学院
応用生物学研究科 応用生物学専攻

佐竹 一紘

目次

第 1 章 序論	1-6
第 1 節 現代における「がん」の理解とその現状	
第 2 節 がんの三大療法	
第 3 節 「がん」の化学療法における現状と課題	
第 4 節 薬剤耐性と ABC 輸送体	
 第 2 章 ヒト ABCB1 の基質探索	 7-69
第 1 節 緒言	
第 2 節 ABCB1 とグアニジンアルカロイドとの相互作用解析	
背景と目的	
1. <i>Calcein assay</i> を用いた <i>ABCB1</i> とグアニジンアルカロイドの相互作用評価	
材料および方法	
結果	
考察	
2. <i>ATPase assay</i> を用いた <i>ABCB1</i> とグアニジンアルカロイドの相互作用評価	
材料および方法	
結果	
考察	
3. <i>MTT assay</i> を用いた <i>ABCB1</i> とグアニジンアルカロイドの相互作用評価	
材料および方法	
結果	
考察	
第 3 節 ABCB1 と辛夷リグナンの相互作用解析	
背景と目的	
1. <i>Calcein assay</i> を用いた <i>ABCB1</i> と辛夷リグナンの相互作用評価	
材料および方法	
結果	
考察	
2. <i>ATPase assay</i> を用いた <i>ABCB1</i> と辛夷リグナンの相互作用評価	
材料および方法	
結果	
考察	
3. <i>MTT assay</i> を用いた <i>ABCB1</i> と辛夷リグナンの相互作用評価	
材料および方法	

結果

考察

第4節 ABCB1 と胡麻リグナンとの相互作用解析

背景と目的

1. *Calcein assay* を用いた *ABCB1* と胡麻リグナン類縁体の相互作用評価

材料および方法

結果

考察

2. *ATPase assay* を用いた *ABCB1* と胡麻リグナン類縁体の相互作用評価

材料および方法

結果

考察

3. *MTT assay* を用いた *ABCB1* と胡麻リグナン類縁体の相互作用評価

材料および方法

結果

考察

第5節 結言

第3章 ヒト ABCB1 の基質認識に関わるアミノ酸残基の探索

70-110

第1節 緒言

第2節 Docking study による ABCB1 の基質認識に関わるアミノ酸残基の推定

背景と目的

1. *ABCB1* とグアニジンアルカロイドの相互作用解析

材料および方法

結果

考察

2. *ABCB1* とリグナンの相互作用解析

材料および方法

結果

考察

第3節 ABCB1 の基質認識に関わるアミノ酸残基の同定

背景と目的

1. 変異型 *ABCB1* を安定発現する細胞の樹立

材料および方法

結果

考察

2. 変異型 <i>ABCB1</i> の機能の評価	
材料および方法	
結果	
考察	
第 4 節 結言	
第 4 章 総括	111
参考文献	112-125
略語表	126-128
謝辞	129

第1章 序論

第1節 現代における「がん」の理解とその現状

我々の身体を構成している細胞は、受精卵の分裂に始まり、派生した細胞が分裂・増殖あるいは分化を絶えず繰り返した結果として存在する。通常、細胞の分裂・増殖および分化は厳密に制御されている。しかしながら、分裂増殖を繰り返す過程で、無秩序に増殖するようになる細胞が発生し、集団化する場合がある。これが、一般に「がん」あるいは「悪性新生物」と呼ばれる疾病である。「がん」は、ヒトのほとんどの臓器で発生し、その種類は多岐に渡る (Tab. 1-1-1)。また、「がん」は、無秩序な増殖と周辺組織への浸潤・転移を繰り返して全身に分布し、人が体内に取り込んだ栄養を積極的に摂取する。その結果、栄養を十分に摂取することができない正常な細胞が増え、がん患者は衰弱する[1]。つまり、「がん」は、患者の生命を脅かす疾患である。

厚生労働省が発表した 2016 年度人口動態統計によると、1981 年以来、「がん」は我が国における死因別死亡数の第 1 位である。また、厚生労働省による発表では、2016 年に「がん」で命を落とした人の数は、37 万 4000 人であった (厚生労働省:2016 年度人口動態統計)。これは、2016 年における全死亡者数 129 万 6000 人の 28.8% (およそ 3 人に 1 人) に相当する (厚生労働省:2016 年度人口動態統計)。したがって、「がん」の克服は、焦眉の急である。

Tab. 1-1-1 「がん」の種類

がんの種類	
・ 血液（および骨髄） - 造血細胞悪性腫瘍 - ト 白血病 └ リンパ腫 - ト ホジキン病 - ト 非ホジキンリンパ腫 └ 多発性骨髄腫 ・ 脳腫瘍 ・ 乳がん ・ 子宮体がん - 子宮 ・ 子宮頸がん ・ 卵巣がん ・ 食道癌 ・ 胃癌 ・ 虫垂癌 ・ 大腸癌 - 大腸、直腸、肛門およびその付随組織 ・ 肝癌 └ 肝細胞癌 - 肝臓 ・ 胆嚢癌 ・ 胆管癌 ・ 膵臓がん（膵がん） ・ 副腎癌 ・ 消化管間質腫瘍 ・ 中皮腫 - 胸膜、腹膜、心膜など	・ 頭頸部癌 - ト 喉頭癌 - ト 口腔癌 └ 口腔底癌 └ 歯肉癌 └ 舌癌 └ 頬粘膜癌 - ト 唾液腺癌 - ト 副鼻腔癌 └ 上顎洞癌 └ 前頭洞癌 └ 篩骨洞癌 └ 蝶型骨洞癌 └ 甲状腺癌 ・ 腎臓がん ・ 肺癌 ・ 骨肉腫 - 骨など ・ 前立腺癌 ・ 精巣腫瘍（睾丸がん） ・ 腎細胞癌 - 腎臓 ・ 膀胱癌 ・ 横紋筋肉腫 - 筋肉（骨格筋） ・ 皮膚癌（「ほくろ」と形成異常母斑を含む） ・ 肛門癌

第2節 がんの三大療法

がんの治療法には、外科的な手法を用いた「手術療法」、放射線を用いた「放射線療法」、抗がん剤をはじめとする薬物を用いた「化学療法」が存在し、これらは、「がんの三大療法」と呼ばれている。

手術療法は、組織化した「がん」を切除する方法であり、紀元前 2750 年頃のエジプトで既に行われていたという記録がある。また、我が国においては、1800 年に華岡青洲が行った乳がん手術が原点と言われている。その後 1990 年代に入ると、腹部に 5~10 mm の小さな穴を 4~5 箇所開け、腹腔鏡で撮影した腹腔内の映像を見ながら「がん」の切除を行う「腹腔鏡手術」が登場した。腹腔鏡手術等によって患者の負担は低減したが、手術療法では、がん組織の取り残しを避けるため、正常な組織を含めて「がん」を切除することが一般的である。また、「がん」が存在する部位によっては、手術が不可能である。つまり、臓器や身体の機能が低下するリスクが伴い、必ずしも実施できるとは限らないのが、手術療法である。

放射線療法は、1895 年に Wilhelm Conrad Roentgen による X 線の発見が原点である。1896 年には「舌がん」および「乳がん」に対する有効性が報告され、1900 年代には「皮膚がん」にたいする治療が普及した。そして、より安価なコバルト 60 が開発されたことを機に、放射線療法は様々な「がん」に適用されていった。放射線療法は、がん組織に焦点を絞り、がん細胞が持つ遺伝子を放射線で物理的に破壊し、がん細胞を消滅させる方法である。また、放射線療法は、手術療法とは異なり非侵襲性である。そのため、正常な組織・臓器の機能や身体の外見を損なうことが無い[2]。一方、放射性物質を注射や内服で投与する場合には、治療の場や患者の行動が制限される等、患者への負担は少なくない。

化学療法は、Robert Koch が確立した「病原菌同定の三原則」[1] 病原菌の純粋培養、2) 実験動物における同様の症状の再現、3) 「同様の症状を呈する動物から分離した菌」と「ヒトにおける病巣菌」との一致]に基づいて開発された「ツベルクリン法」が原点である。Robert Koch の弟子である北里柴三郎と Paul Ehrlich が、原因療法を推進する中で破傷風菌を純粋培養して血清療法を確立させ[3]、Paul Ehrlich がサルバルサンを発見して化学療法の基礎を築き[3]、がん治療にも「化学療法」という概念が導入された[1]。実際には、第一次・第二次世界大戦で使用された毒ガス兵器「ナイトロジェンマスタード」から「がん」における化学療法の歴史が始まった。大量のナイトロジェンマスタードに曝された人において白血球数の著しく減少することが注目され、1940 年頃には、ナイトロジェンマスタードが白血病や悪性リンパ腫の治療薬として使われ始めた。そして、1950~1970 年代には、ナイトロジェンマスタードからナイトロジェンマスタード N-オキシド (ナイトロミン)等が開発され、「がんの化学療法」が誕生した[4]。この後、「細胞増殖を制御する機構 (転写、翻訳、複製)」に作用する低分子化合物が数多く発見され、「抗がん剤」として「がんの化学療法」に使用されるようになった。

「がん」の三大療法のうち、手術療法と放射線療法は、局所的な「がん」の治療において有効である。しかしながら、全身に転移したがん組織を切除することは不可能である。一方、

放射線療法には、手術療法に比して身体に対する負担が少ないというメリットがある。ただし、いずれの方法も「がんの所在が分かっている」ことが前提である。一方、化学療法では、必ずしも「がんの所在が分かっている」必要は無い。血液を含む体液を介して抗がん剤を全身にめぐらせ、がん細胞に作用せるのが化学療法である。そのため、体内の潜在的ながん細胞にたいする治療効果も期待できる。化学療法には副作用のリスクが存在するが、単独での有効性に加え、手術療法や放射線療法を行った後の治療法としての有効性も期待できる。つまり、化学療法は、がんを克服できる可能性を有する。したがって、化学療法の効果を高める研究および薬剤開発が望まれる。

第3節 「がん」の化学療法における現状と課題

2018年現在、人類は「がん」を克服することができていない。この背景の一つに、多くの人に効果が認められる頭痛薬等とは異なり、10人に3～4人の患者で「がん」の縮小が認められれば認可されている抗がん剤開発の現状がある[5-7]。また、従来型の抗がん剤は、細胞増殖を制御する機構（転写、翻訳、複製）に作用するため、がん細胞に加えて正常な細胞にも影響を及ぼす可能性がある。そのため、従来の抗がん剤を用いた化学療法には、様々な副作用（Tab. 1-3-1）のリスクが存在する。したがって、今後は、多くの患者で効果が認められ、副作用が少ない「患者に優しい抗がん剤」の開発を意識する必要がある。

1990年代後半、がん治療に「分子標的薬」が導入され、副作用が少ない「患者に優しい抗がん剤」の開発が始まった。その第一例がトラスツズマブ（Fig. 1-3-1）である[8]。トラスツズマブは、HER2タンパク質が発現しているHER2陽性乳がんに対する分子標的薬として1998年に米国で承認された[9,10]。そして、2001年には、フィラデルフィア染色体の遺伝子産物BCR-ABLを標的としたイマチニブ（Fig. 1-3-1）が慢性骨髄性白血病の治療薬として承認された[11-13]。我が国においてもトラスツズマブ、イマチニブに続き、2002年に肺がん治療薬としてゲフィチニブ（Fig. 1-3-1）が世界で初めて承認され、これらの分子標的薬が「がんの化学療法」に用いられるようになった[14]。また、近年では、T細胞のPD-1と結合することによってT細胞のがん細胞認識力を高めることができる分子標的薬「ヒト型抗ヒトPD-1モノクローナル抗体ニボルマブ」が開発され、悪性黒色腫や非小細胞肺癌、腎細胞癌等の治療に使用されている[15]。これら分子標的薬の登場は、従来の抗がん剤では治療が難しかった「がん」の治療を可能にし、がん克服に向けた大きな追い風になっている。特に、ヒト型抗ヒトPD-1モノクローナル抗体を用いた「がん」の治療は、がん克服の決定打になる可能性もある。しかしながら、分子標的薬も万能では無く、化学療法が全てのがん患者を全快には導けていないのが現状である。

抗がん剤が「がん」を克服することができない背景には、「がん細胞の薬剤耐性」がある[16,17]。これは、「同一患者に由来するがん細胞であっても、ゲノム情報は必ずしも同一ではない」という「がんの不均一性」[18]が一因であると考えられている。この「がんの不均一性」は、化学療法によって寛解が認められた「がん患者」に「がん」が再発することを説明できる。再発前に使用していた抗がん剤に抵抗性を示すがん細胞が検出限界以下の数で生き残り、その細胞が増殖して「がんの再発」に至るのである。この際、再発前に使用していた抗がん剤は効きにくい。この結果、異なる抗がん剤が使用される。しかしながら、がん細胞が様々な薬剤に対して耐性を示してしまうと、化学療法は無力である。つまり、死を含めた「がんの重篤化」に繋がる。したがって、人類が「がん」を克服するためには、「がん細胞の薬剤耐性」を理解することが不可欠である。

Trastuzumab [PDB: 1N8Z. (Drawn by MVD)]

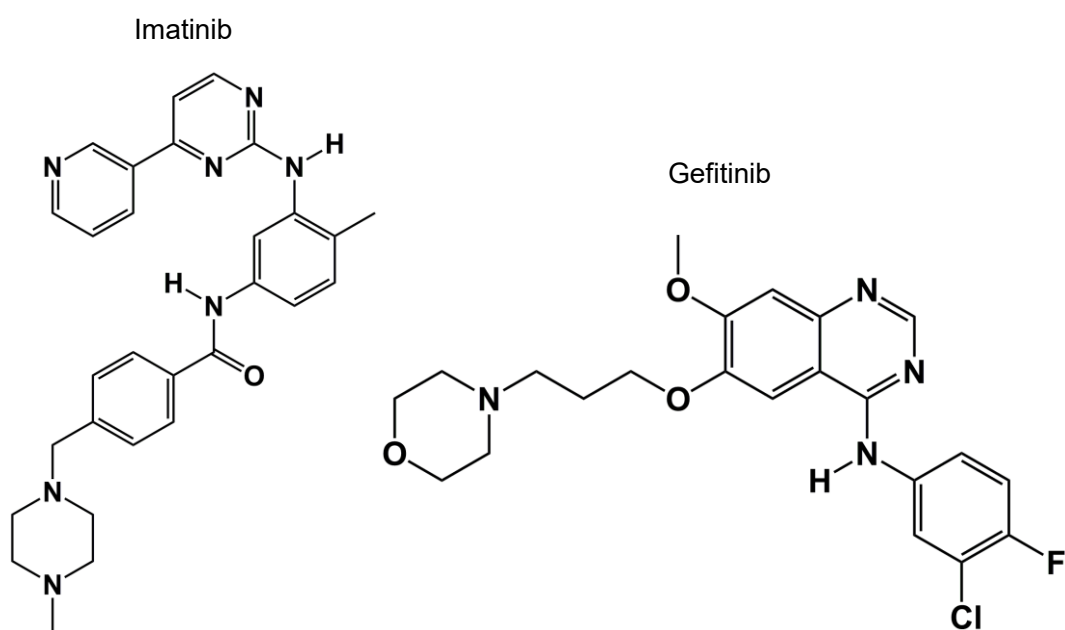
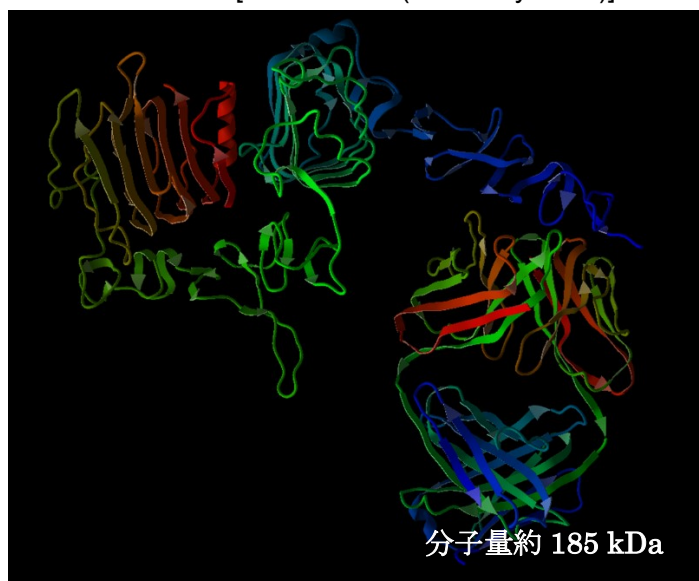


Fig. 1-3-1 分子標的薬の構造

Tab. 1-3-1 主な抗癌剤の作用場所と副作用

名称	適応	薬物有害反応（副作用）
	特に注意すること	
代謝拮抗剤		
フルオロウラシル (5-FU)	頭頸部がん、乳がん、 胃がん、大腸がん、肝 がん、子宮がん	白血球減少、悪心、嘔吐、下 痢、食欲不振、色素沈着、口 内炎等
	高齢者の場合、ときには重度の下痢が起こり、脱水症 状になることがあるので注意する。色素沈着は皮膚が 黒くなる現象で、日光に当たった部位ほど重度。類似 の薬剤として、テガフル、カルモフル、UFT、ド キシフルリジンがある。	
ゲムシタビン	非小細胞肺癌ん、膵が ん	骨髄抑制、食欲不振、疲労感、 発熱等
	膵がんに対する症状緩和効果が、はじめて認められた 薬剤である。	
シタラビン (サイトシンアラビノシッド)	急性白血病	白血球減少、血小板減少、貧 血、悪心、嘔吐等
	成人の急性非リンパ性白血病の治療の中心的薬剤。類 似の薬剤として、エノシタビンがある。	
メトトレキサート	急性白血病、乳がん、 絨毛性腫瘍、胃がん、 頭頸部がん	白血球減少、悪心、嘔吐、脱 毛、食欲不振、肝機能障害、 口内炎等
	小児急性リンパ性白血病、乳がん等に多く使用され る。注意すべき薬物有害反応として、口内炎がある。 投与量が多いときは、ロイコボリンカルシウムを併用 して予防する。	
アルキル化剤		
シクロホスファミド	悪性リンパ腫、乳が ん、卵巣がん、小児が ん等	白血球減少、血小板減少、貧 血、悪心、嘔吐、食欲不振、 脱毛、出血性膀胱炎等
	薬物有害反応で注意しなくてはならないのは、出血性 膀胱炎。これは、本剤の代謝された物質が膀胱を刺激 するために起こる。予防するためには水分を多くと り、尿量を増やすことで代謝された物質を薄め、体外	

	に出すようにする。本剤の類似の薬剤として、イホスファミドがある。	
抗がん性抗生物質		
塩酸ダウノルビン	急性白血病	白血球減少、血小板減少、貧血、悪心、嘔吐、心筋障害等
	急性非リンパ性白血病の治療に必要な薬剤で、シタラビンと併用して一般的に用いられる。 最も注意すべき薬物有害反応は心筋障害で、投与量が増加すると起こりやすい。このため、総投与量が制限される。	
塩酸ドキソルビン (アドリアマイシン)	悪性リンパ腫、乳がん、胃がん、肝がん、肺がん、骨軟部肉腫	白血球減少、血小板減少、貧血、悪心、嘔吐、食欲不振、口内炎、脱毛、心筋障害等
	悪性リンパ腫、乳がん等の治療の中心的な薬剤。脱毛は全脱毛となるが、中止すればもとどおりに生える。 最も注意すべきは、塩酸ダウノルビンと同様に心筋障害である。類似の薬剤に、塩酸エピルビン、ピラルビンがある。	
塩酸イダルビン	急性非リンパ性白血病	高度な白血球減少、血小板減少、貧血、悪心、嘔吐、脱毛、心筋障害等
	塩酸ダウノルビンと同様に、急性骨髄性白血病の治療にシタラビンと併用して用いられる薬剤であるが、塩酸ダウノルビンよりも強い血液毒性が出現する。 また、心筋障害も投与量の増加に伴い発生する。	
ブレオマイシン	悪性リンパ腫、頭頸部がん、食道がん、精巣（睾丸）腫瘍	肺毒性、悪心、嘔吐、発熱、色素沈着等
	わが国で発見され、世界に誇れる抗がん剤。白血球、あるいは血小板減少を全く起こさない珍しい抗がん剤の部類に入る。しかし、間質性肺炎から肺線維症となる肺毒性に注意が必要で、肝機能の悪い患者さんや高齢者には使用しないほうがよいと考えられる。類似の薬剤に、硫酸ペプロマイシンがある。	

アクチノマイシン D	卵巣がん	過敏症、神経系、色素沈着、倦怠（けんたい）、筋肉痛、胃腸障害、肝機能障害等
微小管作用薬		
ビノレルビン	非小細胞肺癌	白血球減少、血小板減少、貧血、神経障害
	類似の薬剤にビンブラスチン、ビンデシン、ビンクリスチンがある。	
パクリタキセル	乳がん、非小細胞肺癌、卵巣がん	白血球減少、貧血、血小板減少、脱毛、筋肉痛・関節痛、無力症、末梢神経障害、悪心、嘔吐、食欲不振、腹痛、口内炎、下痢、肝機能障害、腎機能障害、発熱、呼吸困難等
ドセタキセル	乳がん、非小細胞肺癌	白血球減少、貧血、血小板減少、脱毛、悪心、嘔吐、食欲不振、全身倦怠感、発熱、下痢、口内炎、末梢神経障害、肝機能障害、腎機能障害、浮腫（むくみ）等
その他の抗がん剤		
塩酸イリノテカン	小細胞肺癌、非小細胞肺癌、子宮頸がん、卵巣がん、胃がん、結腸・直腸がん、乳がん、有棘細胞がん、悪性リンパ腫（非ホジキンリンパ腫）	白血球減少、血小板減少、貧血、下痢、悪心、嘔吐、食欲不振、腹痛、腸管麻痺、肺炎、脱毛
シスプラチン	頭頸部がん、肺がん、食道がん、胃がん、卵巣がん、子宮がん、精巣（睾丸）腫瘍	腎機能障害、悪心、嘔吐、神経障害、白血球減少、血小板減少、貧血等
	現在、成人の固形がんに対して最も広く用いられている薬剤で、薬物有害反応として腎機能障害が起こる。それを防ぐために、使用するときは尿量を 3,000 cc 以	

	上とする必要がある。外来では使用できないので、入院して点滴しながら使用する。	
カルボプラチン	頭頸部がん、肺小細胞がん、睾丸腫瘍、卵巣がん、子宮頸がん、悪性リンパ腫、非小細胞肺癌	血小板減少、白血球減少、貧血、悪心、嘔吐、食欲不振、全身倦怠感、脱毛、肝機能障害、腎機能障害等
	シスプラチンの類似薬のプラチナ化合物である。腎機能障害があると薬物有害反応、特に血小板減少を主とする骨髄抑制が強く現れることがある。最近では腎機能によって投与量を調節し、血小板減少が強く起こらないようにしている。	
エトポシド	悪性リンパ腫、肺癌、急性白血病、精巣（睾丸）腫瘍、悪性絨毛上皮腫、小児固形がん	白血球減少、血小板減少、貧血、脱毛、悪心、嘔吐等
	悪性リンパ腫、小細胞肺癌、睾丸腫瘍等の治療の中心的な薬剤。静脈注射だけでなく、経口投与もできる。	
ネダプラチン	頭頸部がん、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、食道がん、膀胱がん、精巣（睾丸）腫瘍、卵巣がん、子宮頸がん	白血球減少、血小板減少、貧血、悪心、嘔吐、食欲不振、下痢、腎機能障害、肝臓機能障害等

（独立行政法人 国立がん研究センターHP から引用

<http://ganjoho.jp/professional/index.html>)

第4節 薬剤耐性とABC輸送体

がん治療の現場で大きな問題になっている「がん細胞の薬剤耐性」は、「薬物の不活性化」、「薬物の作用標的の変異」、「薬物の細胞外への排出」で説明することができる (Fig. 1-4-1)。

「薬物の不活性化」は、薬物が酸化、還元、加水分解、抱合反応を受けることによって起こる。中でも、酸化・還元に関与するシトクロム P450 は、ヒト遺伝子上に 11 種コードされており、「薬物の不活性化」において重要な役割を担っている[19]。「薬物の作用標的の変異」は、薬物の標的タンパク質をコードする遺伝子にアミノ酸置換を伴う変異が生じることによって起こる。「薬物の細胞外への排出」は、薬物を細胞外に排出するタンパク質 (ABC 輸送体)の存在によって起こる。

「薬物の不活性化」、「薬物の作用標的の変異」、「薬物の細胞外への排出」のうち、抗がん剤耐性の原因として広く認識されているものが「薬物の細胞外への排出」である。この「薬物の細胞外への排出」において中心的な役割を担っている ABC 輸送体は、1 分子内に 6～17 回の膜貫通領域と 1～2 つの ATP 結合領域を持つ膜輸送体であり、保存性が高いモチーフ (Walker A、Walker B、Signature)を有する点が大きな特徴である (Fig. 1-4-1)。ヒト遺伝子上には 49 種の ABC 輸送体遺伝子が存在し(Tab. 1-4-1)[20,21]、体外との境界 (腸管上皮細胞、肝臓、腎臓など)や脳との境界 (血液脳関門)、胎児との境界 (胎盤)には、薬物を輸送する ABC 輸送体が高発現している。また、これら薬物を基質として認識して輸送する ABC 輸送体は、多剤耐性を獲得したがん細胞にも高発現していることが広く知られている[22]。なお、ABC 輸送体は、ヒトに限らず、あらゆる生物に発現が認められる。そして、ATP の加水分解エネルギーを利用して基質を輸送し、生体膜を隔てて二分される領域における基質濃度を制御することが、ABC 輸送体の生理機能である (Fig. 1-4-3)。この仕組みは、全ての ABC 輸送体で共通していると考えられており、ATP 結合部位を 2 つ有する状態が 1 機能単位であると考えられている。

「がん細胞の薬剤耐性」における ABC 輸送体の関与は、抗がん剤耐性を示す細胞から ABCB1 (P 糖タンパク質, P-gp, MDR1)が同定され、明らかになった[22–25]。その後、ドキソルビシン耐性のヒト肺癌細胞株から ABCC1 (MRP1)が同定され[26]、次いで、ABCB1 および ABCC1 非依存的に抗がん剤耐性を示したヒト乳癌細胞から ABCG2 (BCRP, MXR1, ABCP)が同定された[27]。そして現在では、ヒトゲノム上に存在する 49 種の ABC 輸送体のうち、22 種類に抗がん剤を輸送する機能が備わっていることが明らかにされている (Tab.1-4-3)[21]。

薬物の不活性化

薬物が化学的に修飾・分解されることによって起こる。

薬物の作用標的の変異

薬物が作用するタンパク質の遺伝子にアミノ酸置換を伴う変異が生じることによって起こる。

薬物の細胞外への排出

薬物を細胞外に排出するタンパク質(ABC輸送体)の発現によって起こる。

Fig. 1-4-1 がん細胞が薬剤耐性を示すメカニズム

ABCA1	922-	FYEGQITSFLGHNGAGKT	TTMSILTGLF	ABCA1	1022-	SSKLKSKTSQLSGGMQRKLSVALA	ABCA1	1043-	ALAFVGGSKVVILDE	PTAGVDPYSR
ABCA1	1935-	IPPGECFGLLVNGAGKS	SSTFKMLTGDT	ABCA1	2034-	VKYGEKYAGNYSGGNKRKLSTAMA	ABCA1	2054-	TAMALIGPPVVFLDE	PTTGMDPKA
ABCB1	417-	VQSGQTVALVGNSSGCGKS	TTVQLMQRLY	ABCB1	521-	DTLVGERGAQLSGGQKQRIAIARA	ABCB1	540-	IARALVRNPKILLDE	ATSALDTES
ABCB1	1060-	VKKGQTLALVGSSGCGKS	TTVQLLERFY	ABCB1	1156-	STKVGDKGTQLSGGQKQRIAIARA	ABCB1	1185-	IARALVRQPHILLDE	ATSALDTES
ABCB4	419-	VQSGQTVALVGNSSGCGKS	TTVQLIQRLY	ABCB4	523-	DTLVGERGAQLSGGQKQRIAIARA	ABCB4	542-	IARALVRNPKILLDE	ATSALDTES
ABCB4	1059-	VKKGQTLALVGNSSGCGKS	TTVQLLERFY	ABCB4	1165-	ETRVGDKGTQLSGGQKQRIAIARA	ABCB4	1184-	IARALIRQPQILLDE	ATSALDTES
ABCC4	434-	VRPGELLAVVGPVGAGKSS	LLSAVLGEL	ABCC4	524-	LTVIGDRGTTLSGGQKARVNLARA	ABCC4	544-	LARAVYQDADIYLLD	DPLSAVDAEV
ABCC4	1064-	IKSQEKVGIVGRTGAGKSS	LISALFRLS	ABCC4	1166-	DTELAESGSNFSVGQRQLVCLARA	ABCC4	1187-	ARAILRKNQILIDE	ATANVDPRTD
ABCC5	584-	IQEGKLVGICGSVSGSKT	SLISAILGQM	ABCC5	674-	LTEIGERGANLSGGQRQRISLARA	ABCC5	694-	LARALYSDRSIYILL	DDPLSALDAHV
ABCC5	1216-	IKPKEKIGIVGRTGSGKSS	LGMAFRLV	ABCC5	1319-	ESEVMENGDNFSVGERQLLCIARA	ABCC5	1340-	ARALLRHCKILILDE	ATAAMDTE
ABCC7	448-	IERGQLLAVAGSTGAGKT	SLLMVIMGEL	ABCC7	538-	NIVLGEIGITLSGGQRARISLARA	ABCC7	557-	LARAVYKDADLYLLD	SPFGYLDVLT
ABCC7	1234-	ISPGQRVGLLGRGTSGKST	LLSAFLRLL	ABCC7	1195-	NSHVKKDDIWPSGGQMTVKDLTAK	ABCC7	1355-	LARSVLSKAKILLDE	PSAHLDPVT
ABCC11	533-	VSKGMMLGVCGNTGSGKSS	LLSAILEEM	ABCC11	623-	MTEIGERGLNLSGGQKQRIISLARA	ABCC11	643-	LARAVYSDRQIYLLD	DPLSAVDAHV
ABCC11	1164-	IRGHEVVGIVGRTGSGKSS	LGMAFRLV	ABCC11	1267-	HTDVENGGNFSVGERQLLCIARA	ABCC11	1288-	ARAVLRNSKIILIDE	ATASIDMETD
ABCG2	69-	IMKPGLNAILGPTGGGKSS	LLDVLAAARK	ABCG2	175-	SKVGTQFIRGVSGGERKRTSIGME	ABCG2	195-	IGMELITDPSILFLD	EPTTGLDSST
ABCG4	91-	FCRRELIGIMGPSGAGKST	FMNILAGYR	ABCG4	190-	MSCSHTRTALLSGGQRKRLAIALE	ABCG4	207-	RLAIALELVNPPVMF	FDEPTSGLD
Walker A (GXXGXGKX-S/T)				Signature (XSXGX)				Walker B (L/I/F-L/I-XD-E/D)		

Fig. 1-4-2 ABC 輸送体における保存性の高い一次構造

ABC 輸送体における保存性の高いモチーフとして、Walker A モチーフ、Walker B モチーフ、Signature モチーフが存在する[28,29]。

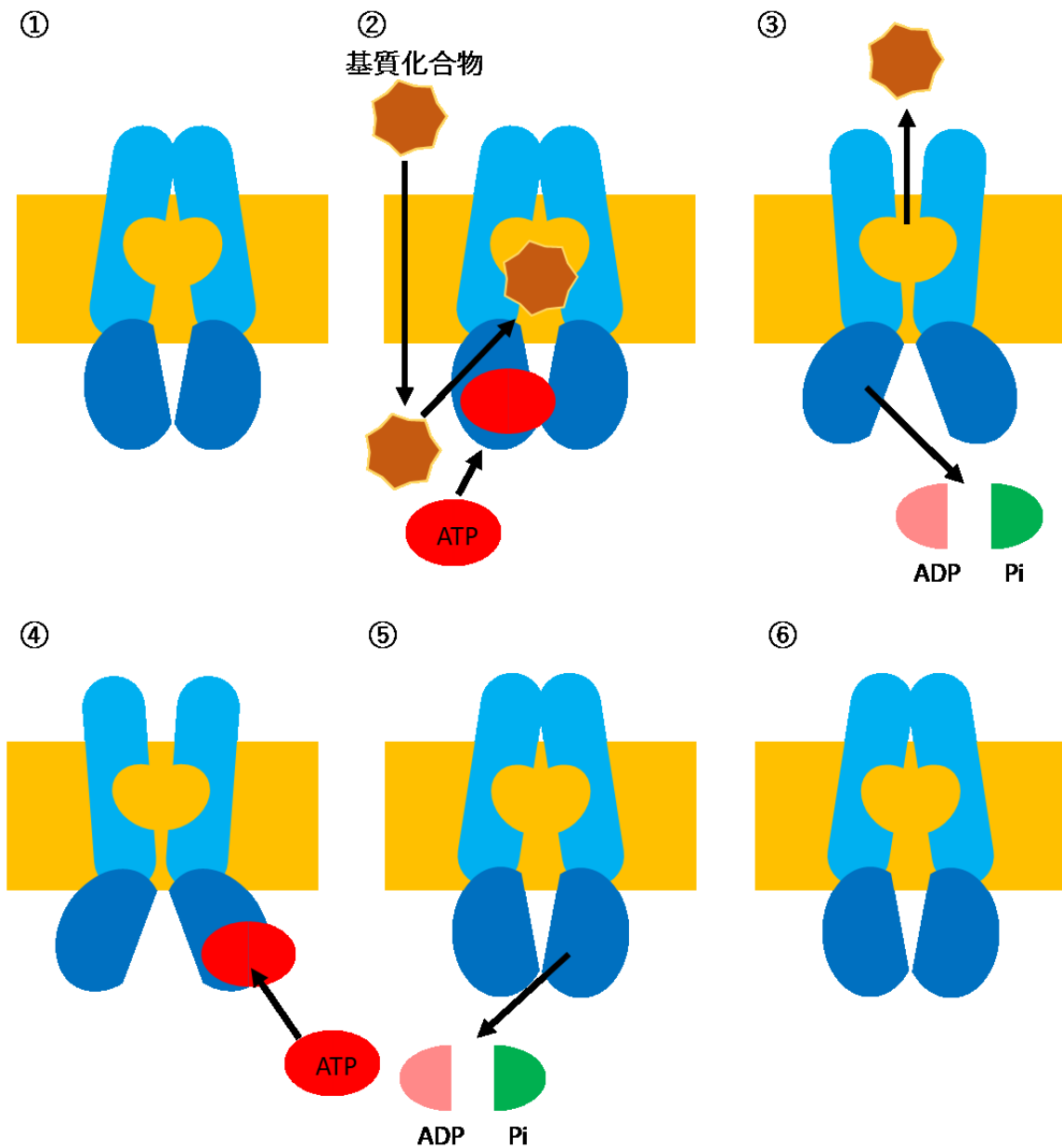


Fig. 1-4-3 ABC 輸送体の基質輸送モデル

細胞膜上に存在する ABC 輸送体 (①) は、細胞内に侵入あるいは細胞膜に浸潤した基質化合物を認識し (②)、ATP が ATP 結合部位に結合する (②)。基質を認識した ABC 輸送体 (②) は、ATP を加水分解してエネルギーを獲得し (③)、基質を細胞外に押し出す (③)。基質を輸送した後の ABC 輸送体には ATP が ATP 結合部位に結合し (④)、ABC 輸送体は、ATP を加水分解して獲得したエネルギー (⑤) を利用し、元の形に戻る (⑥)。

Tab.1-4-1 ヒト ABC 輸送体

ABC1 Subfamily A	MDR/TAP Subfamily B	MRP/CFTR Subfamily C	ALD Subfamily D	PABP Subfamily E	GCN20 Subfamily F	White Subfamily G
ABCA1 (ABC1)	ABCB1 (MDR1 or PGP)	ABCC1 (MRP1)	ABCD1 (ALDP)	ABCE1 (OABP)	ABCF1	ABCG1
ABCA2 (ABC2)	ABCB2 (TAP1)	ABCC2 (MRP2 or cMOAT)	ABCD2 (ALDRP)		ABCF2	ABCG2 (ABCP, BCRP)
ABCA3 (ABC3)	ABCB3 (TAP2)	ABCC3 (MRP3)	ABCD3 (PMP70)		ABCF3	ABCG4
ABCA4 (ABCR)	ABCB4 (MDR2)	ABCC4 (MRP4)	ABCD4			ABCG5
ABCA5	ABCB5	ABCC5 (MRP5)				ABCG8
ABCA6	ABCB6	ABCC6 (MRP6)				
ABCA7 ABC7	ABCB7 (ABC7)	ABCC7 (CFTR)				
ABCA8	ABCB8	ABCC8 (SUR1)				
ABCA9	ABCB9	ABCC9 (SUR2)				
ABCA10	ABCB10	ABCC10 (MRP7)				
ABCA12	ABCB11 (BSEP or SPGP)	ABCC11 (MRP8)				
ABCA13		ABCC12 (MRP9)				
		ABCC13				
※括弧内は別名						

Tab.1-4-2 ヒト ABC 輸送体の機能低下/欠損に伴う表現型

ABCA1 サブファミリー		
ABCA1	家族性高比重リポタンパク欠損症	Tangier 病 [30]
ABCA2	ミエリン形成異常	アルツハイマー病 [31]
ABCA3	新生児呼吸窮迫症候群 [32]	
ABCA4	網膜色素変性症 [33]	錐体桿体ジストロフィー [34]
	加齢性黄斑変性症	Stargardt 病 [35]
ABCA12	胎児先天性魚鱗癬	2 型葉状魚鱗癬 [36]
ABCA13	双極性障害	統合失調症 [37]
ABCB サブファミリー		
ABCB1	がんの多剤耐性 [38]	
ABCB2	裸リンパ球症候群 1 [39]	
ABCB3	不全リンパ球症候群 1 [40]	+Wegener 様肉芽腫症 [41]
ABCB4	進行性家族性肝内胆汁鬱滞症 3 型 [42]	
	胆のう疾患 [43]	妊娠中の肝内胆汁鬱滞 [44]
ABCB7	X 連鎖性鉄芽球性貧血 [45]	
ABCB11	進行性家族性肝内胆汁鬱滞症 2 型 [46]	再発性肝内胆汁鬱滞 [47]
ABCC サブファミリー		
ABCC1	がんの多剤耐性 [48]	
ABCC2	Dubin-Johnson 症候群 [49]	
ABCC6	弾性線維性仮性黄色腫 [50-52]	乳児期全身性動脈石灰化 [53]
ABCC7	嚢胞性線維症 [54]	
ABCC8	家族性新生児持続性高インスリン血性 低血糖症 [55]	インスリン非依存型糖尿病
ABCC9	拡張型心筋症 [56]	家族性心房細動 [57]
ABCC11	耳垢(ウェット/ドライ) [58]	
ABCD サブファミリー		
ABCD1	副腎白質ジストロフィー [59]	
ABCD2	副腎白質ジストロフィー [60]	
ABCD3	Zellweger 症候群 2 [61]	
ABCG サブファミリー		
ABCG1	脂質異常症 [62]	
ABCG2	痛風 [63]	
ABCG5	シトステロール血症 [64]	
ABCG8	シトステロール血症 [64]	胆のう疾患 4 [65]

Tab.1-4-3 ヒト ABC 輸送体の発現部位と主な機能

ABC 輸送体	発現部位[21]	機能
ABCA1	偏在	HDL へのコレステロール輸送
ABCA2*	脳	コレステロール輸送[66]、薬物耐性[67]
ABCA3*	肺	内在性脂質の輸送[68]、薬物耐性[69]
ABCA4	光受容体	
ABCA5	筋肉、心臓、精巣	細胞内ステロール/ステロイド輸送[70]
ABCA6	肝臓	脂質輸送[71]
ABCA7	胸腺	リン脂質輸送[72]
ABCA8*	卵巣	薬物耐性[73]
ABCA9	心臓	
ABCA10	筋肉、心臓	コレステロール応答性[74]
ABCA12	胃	グルコシルセラミド輸送[75]
ABCA13	すべての組織で少ない	
ABCB1*	副腎、腎臓、脳	多剤耐性[22]
ABCB2*	すべての細胞	ペプチド輸送、薬剤耐性[76]
ABCB3	すべての細胞	ペプチド輸送
ABCB4*	肝臓	PC への輸送、薬剤耐性[77]
ABCB5*	偏在	薬剤耐性[78]
ABCB6*	ミトコンドリア	鉄の輸送、薬剤耐性[79]
ABCB7*	ミトコンドリア	Fe/S クラスター輸送、薬剤耐性[79]
ABCB8*	ミトコンドリア	薬剤耐性[80]
ABCB9*	心臓、脳	薬剤耐性[81]
ABCB10	ミトコンドリア	
ABCB11*	肝臓	胆汁塩輸送、薬剤耐性[77]
ABCC1*	肺、精巣、PBMC	多剤耐性[82]
ABCC2*	肝臓	有機アニオン輸送、薬物耐性[83]
ABCC3*	肺、腸、肝臓	薬物耐性[84]
ABCC4*	前立腺	ヌクレオシド輸送、薬剤耐性[85]
ABCC5*	偏在	ヌクレオシド輸送、薬物耐性[83]
ABCC6*	腎臓、肝臓	薬剤耐性[86]
ABCC7*	外分泌組織	塩化物イオンチャネル、薬剤耐性[87]
ABCC8	膵臓	スルホニル尿素受容体、
ABCC9	心臓、筋肉	

ABCC10*	すべての組織で少ない	薬剤耐性[88]
ABCC11*	すべての組織で少ない	薬剤耐性[89]
ABCC12	すべての組織で少ない	
ABCD1	ペルオキシソーム	VLCFA 輸送制御[90]
ABCD2	ペルオキシソーム	
ABCD3	ペルオキシソーム	
ABCD4	ペルオキシソーム	
ABCE1	卵巣、精巣、脾臓	
ABCF1	偏在	
ABCF2	偏在	腫瘍抑制[91]
ABCF3	偏在	
ABCG1	偏在	コレステロール輸送[92]
ABCG2*	血液脳関門、胎盤、腸、腎臓	生体異物輸送[93]、薬剤耐性[94]
ABCG4	肝臓	
ABCG5	肝臓、腸	ステロール輸送[95]
ABCG8	肝臓、腸	ステロール輸送[95]

* 薬剤耐性を有する ABC 輸送体

第5節 研究の目的

我が国では、社会の高齢化が世界に例をみない速度で進行している。2065年には、高齢者の割合は総人口の38.4%に達し、現役世代1.3人で高齢者1人を支える必要があると推計されている[96]。一方、日常生活に制限のない期間と寿命との間には、8~9年の要支援・要介護・寝たきりの期間が存在する[97]。現役世代1.3人が高齢者1人を8年以上支える必要が生じる我が国が社会の高齢化と健全に向き合い続けるためには、日本人の2人に1人が罹患し、3人に1人の死因になる疾患「がん」で命を落とす現役世代の数を減らすことが不可欠である。

厚生労働省が発表した2016年度人口動態統計によると、1981年以来、「がん」は我が国における死因別死亡数の第1位である。また、厚生労働省による発表では、2016年に「がん」で命を落とした人の数は、37万4000人であった（厚生労働省:2016年度人口動態統計）。これは、2016年における全死亡者数129万6000人の28.8%（およそ3人に1人）に相当（厚生労働省:2016年度人口動態統計）する。したがって、「がん」の克服は、焦眉の急である。

がんの治療法には、外科的な手法を用いた「手術療法」、放射線を用いた「放射線療法」、抗がん剤をはじめとする薬物を用いた「化学療法」が存在する。本研究では、8割以上のがん患者が受けている「化学療法」に注目し、特に、がん治療の現場で大きな問題になっている「がん細胞の薬剤耐性」に注目する。

がん細胞に多剤耐性を付与する因子として1976年にABCB1（P糖タンパク質, P-gp, MDR1）の存在が明らかにされ、以降、ABCB1が抗がん剤を含め多くの薬物や生体異物を基質にすることが報告されてきた[22-25,98-100]。つまり、ABCB1は、薬物および生体異物の体内動態を制御しており、生体防御に関わっている。これは、薬物を基質にするABC輸送体のがん細胞に発現している場合、ABC輸送体が「がん細胞を抗がん剤から守る」ことを意味している。したがって、「がんの化学療法」を成功に導き、がんを克服するためには、薬物を輸送するABC輸送体の存在を無視することはできない。また、「がんの化学療法」を成功に導くためには、薬物を輸送するABC輸送体の機能を理解・制御することは不可欠である。そこで、本研究では、化学療法における障害として広く知られているABC輸送体ABCB1が認識する化学構造に関する理解を深め、ABCB1による基質認識に重要なアミノ酸残基を明らかにすることを目指す。

第2章 ヒト ABCB1 の基質探索

第1節 緒言

ABC 輸送体の存在は、がんの克服を目指す人類にとって、大きな障壁の一つである。そのため、細胞に多剤耐性を与える ABC 輸送体 ABCB1 の基質認識機構と基質輸送機構は、その同定以来、精力的に研究されている。特に、ABCB1 による多剤耐性を克服することができる手段として期待された「ABCB1 阻害剤の探索」は、多くの研究者によって行われてきた[101–105]。実際には、カルシウム拮抗剤である Verapamil が ABCB1 の活性を阻害することが報告され[101,102]、次いで、Cyclosporin A および Valspodar (PSC-833)なども ABCB1 に起因する多剤耐性を抑制することが報告されてきた[103–105]。しかしながら、ABCB1 による多剤耐性を克服することを目的として Verapamil が化学療法に使用されることはなかった。Verapamil は、 $K_m = 4.1 \mu\text{M}$ で ABCB1 に認識され、ABCB1 によって認識される薬物と相互作用する[26]。一方、Verapamil は、T 型カルシウムチャネル ($\text{ED}_{50} > 20 \mu\text{M}$) および L 型カルシウムチャネル ($\text{ED}_{50} = \text{約 } 10 \mu\text{M}$)にも作用し、強力な抗不整脈効果を発揮する[15,106]。つまり、抗がん剤と併用処理を行う際には、Verapamil が有する抗不整脈薬としての作用を無視することができなかったのである。

「ABCB1 阻害剤の探索」と並行して行われてきた「ABCB1 の基質探索」は、ABCB1 が多様な化学構造を認識することを明らかにし、「構造活性相関(SAR)解析」および「定量的 SAR (QSAR)解析」を可能にした[107–121]。しかしながら、ABCB1 が認識する化学構造の全容解明には至っていない。そこで、本研究では、ABCB1 が認識する化学構造に関する理解を深め、ABCB1 による基質認識に重要なアミノ酸残基を明らかにするために、ABCB1 の基質を新たに見出すことを目指した。

第2節 ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用解析

[背景と目的]

ABC 輸送体を介した薬剤耐性機構を理解することは、「がん」の克服に不可欠である。本研究の題材である ABCB1 は、「がん」に薬剤耐性を付与する代表的な ABC 輸送体であり、抗がん剤を中心として、これまでに多くの薬物が ABCB1 の基質として報告されてきた(Fig. 2-2-1)。そこで、本研究では、今日使用されている薬物のリード化合物を多数提供してきた天然物に注目した。

臨床で使用されている薬物の多くが ABCB1 によって認識され、細胞外/体外に排出される。臨床で使用されている薬物の多くが天然物をリード化合物としていることから、天然物の中には ABC 輸送体の基質が存在すると考えられる。そこで、本研究では、解析が十分に行われていない南米由来の天然物に注目し、南米原産植物 *Pterogyne Nitens* (Fig. 2-2-2)に含まれるグアニジンアルカロイドを研究題材として選定した。実際には、*Pterogyne Nitens* に含まれるグアニジンアルカロイド Galedine、Nitensidine A、Pterogynine、Pterogynidine (Fig. 2-2-3)を選定した。

化合物を用いて ABCB1 の機能を評価する方法として、①構造が異なる化合物を対象にして ABCB1 との親和性を試験し、ABCB1 との親和性が高い構造および化学的特性を理解する方法、と②ABCB1 の基質として報告されている化合物と構造が似ている化合物・類縁体を対象にして ABCB1 との親和性を試験し、ABCB1 との親和性が高い部分構造および化学的特性を理解する方法、がある。第2節では、*Pterogyne Nitens* に含まれる構造類縁グアニジンアルカロイド Galedine、Nitensidine A、Pterogynine、Pterogynidine を用いて ABCB1 との相互作用を評価し、ABCB1 の機能を分子レベルで理解することを目指した。実際には、ABCB1 発現細胞を用いた「Calcein assay」および「MTT assay」、ABCB1 含有膜画分を用いた「ATP Assay」を実施した。

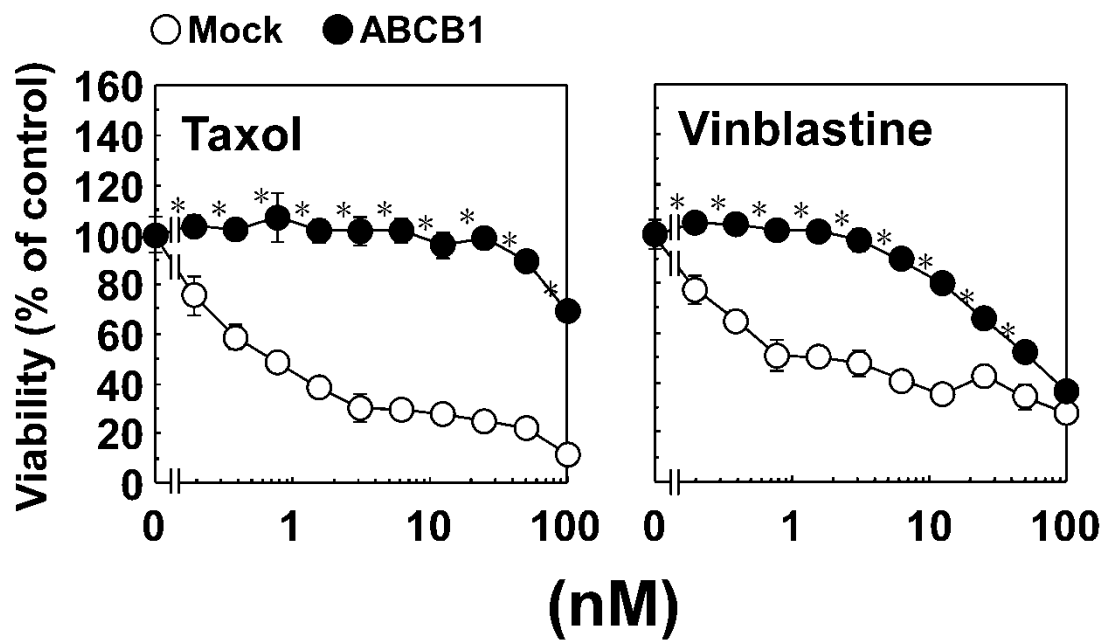


Fig. 2 K. Satake et al.

2-2-1 Flp-In-293/ABCB1 細胞の薬剤耐性

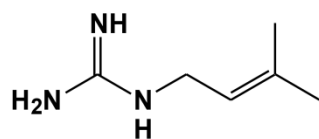
○, Flp-In-293/Mock 細胞; ●, Flp-In-293/ABCB1 細胞。縦軸, 薬剤非存在下で培養した細胞の生存率を 100%とした場合の細胞生存率; 横軸, 化合物の濃度。(*、Mock 群と比較して $P < 0.05$)。



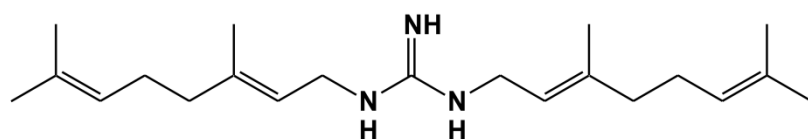
Fig. 2-2-2 南米原産植物 *Pterogyne Nitens*

共同研究者である Prof. Vanderlan Bolzani (São Paulo State University)が提供

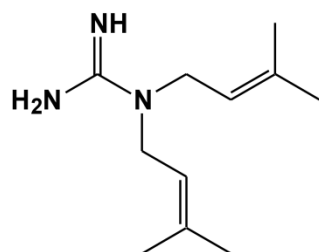
Galegine



Nitesidine A



Pterogynidine



Pterogynine

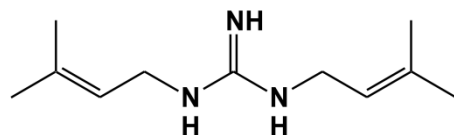


Fig. 2-2-3 本研究で使した 4 種のグアニジンアルカロイドの構造

1. Calcein assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価

[材料および方法]

試薬

10 × D-PBS(-) (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)

Antibiotic-Antimycotic Mixed Stock Solution(100 ×) (NACALAI TESQUE, INC.)

DMEM (High Glucose) (NACALAI TESQUE, INC.)

FETAL BOVINE SERUM (Biochrom AG; EQUITECH-BIO, INC.)

L-Glutamine (NACALAI TESQUE, INC.)

Calcein-AM (nacalai tesque)

Nuc Blue live cell stain (Molecular Probes)

Trypan Blue MW = 960.81 (NACALAI TESQUE, INC.)

Guanidine alkaloids

本研究で試験した 4 種の Guanidine alkaloids は、Bolzani 教授と Regasini 教授らが *Pterogyne nitens* の葉および枝から抽出・精製したものを使用した[122]。

細胞

本研究では、急性 T リンパ芽球性白血病細胞株 CCRF-CEM 細胞と CEM/ADR5000 細胞から樹立された CEM/ADR5000 細胞を使用した[123]。また、過去に樹立された Flp-In-293/ABCB1 細胞および Flp-In-293/Mock 細胞も使用した[124,125]。なお、Flp-In-293 細胞は、invitrogen 社が HEK293 細胞から作製した細胞であり、12 番染色体短腕の一ヶ所に Flp リコンビナーゼ標的サイトが導入されている[97]。したがって、Flp-In-293 細胞の基本的な特性は、HEK293 細胞と同様である[126]。

PBS(-)の調製

10 × D-PBS(-) (50 ml)を超純水 (450 ml)で 10 倍希釈し、調製した。調製後は、直ちにオートクレーブ滅菌 (121°C, 15 分, 2 気圧)を行い、使用時まで 4°C にて保存した。

200 mM L-Glutamine の調製

電子天秤に載せた200 mlビーカーにL-Glutamine (MW = 146.14) (2.92 g)を量り取り、超純水 (100 ml)を加えた。そして、スターラーバーを用いて水溶液を攪拌し、L-Glutamineを溶解した。L-Glutamineの溶解後は、0.22 μm フィルター (MILLEX® GP Syringe Driven Filter Unit) (Sigma-Aldrich Co. LLC.)を付けた50 ml テルモシリンジ® (TERUMO CORPORATION)にL-Glutamine 水溶液を注入し、フィルター滅菌を行った。ろ液については、10 mlずつ15 ml tubeに分注した。その後、使用時まで-30°Cにて保

存した。なお、L-Glutamineを溶解させた後の一連の操作は、クリーンベンチ内で行った。

血清の非働化

-30°Cにて凍結保存していたFETAL BOVINE SERUMを冷蔵庫に移し、一晩かけて融解した。翌日、融解させたFETAL BOVINE SERUMを恒温槽に静置し、FETAL BOVINE SERUMの液面以上になるように恒温槽に水を足した後、恒温槽の水温が56°Cになるまで温めた。水温が56°Cに到達した後は、FETAL BOVINE SERUM を56°Cで30分間温めた。この後、FETAL BOVINE SERUMを恒温槽からクリーンベンチ内に移し、十分に攪拌した後、50 mlずつ50 ml tubeに分注した。その後、使用時まで-30°Cにて保存した。

細胞培養用 RPMI1640 の調製

非働化したFETAL BOVINE SERUM (50 ml)、200 mM L-Glutamine (10 ml)、Antibiotic-Antimycotic Mixed Stock Solution (100 ×) (5 ml)を DMEM (High Glucose) (500 ml)に添加して細胞培養用 RPMI1640 [10%(v/v) 非働化 FBS, 0.8 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, 50 µg/mL kanamycin]を調製した。なお、本論文では細胞培養用 RPMI1640 を「RPMI1640」と記述する。

細胞培養用 DMEM の調製

非働化したFETAL BOVINE SERUM (50 ml)、200 mM L-Glutamine (10 ml)、Antibiotic-Antimycotic Mixed Stock Solution (100 ×) (5 ml)を DMEM (High Glucose) (500 ml)に添加して細胞培養用 DMEM [10%(v/v) 非働化 FBS, 4 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, 250 ng/mL amphotericin B]を調製した。なお、本論文では細胞培養用 DMEM を「DMEM」と記述する。

1M EDTA 水溶液の調製

EDTA (nakarai tesque) (29.224 g)を超純水 (100 ml)に溶解させたものを 1 M EDTA 水溶液とした。

0.25%(w/v)Trypsin-1 mM EDTA 溶液の調製

Trypsin (from Hog Pancreas) (nacalai tesque) (2.5 g)を少量の超純水でペースト状にし、約 90 ml の超純水を加えて氷上で攪拌した。その後、1 M EDTA 水溶液 (100 µl)を加え、さらに超純水を加えて 100 ml にメスアップした。そして、クリーンベンチ内でこの溶液をフィルター滅菌[(Sartolab RF 180C3, 0.22 µm PES) (Sartorius Japan K.K.)]し、得られたろ液を 0.25%Trypsin-1 mM EDTA 溶液とした。

細胞の培養および継代

CCRF-CEM 細胞と CEM/ADR5000 細胞は、37°C, 5%CO₂ の条件下、RPMI1640 中で培養した。継代は、細胞を播種した日を 0 日目とし、3 日目もしくは 4 日目に行った。具体的には、培養ディッシュ中の RPMI1640 と共に細胞を遠沈管に回収した。そして、遠心分離 (300 rpm、5 分、20°C)を行った。遠心後は、アスピレーターを用いて上清を吸引除去し、遠沈管をタッピングして沈殿した細胞をほぐした後、遠沈管に新鮮な RPMI1640 を加えて細胞を懸濁させた。そして、この細胞懸濁液の一部を新鮮な RPMI1640 と混合して新しい培養ディッシュに移し、CO₂ インキュベーター (37°C, 5%CO₂)に静置した。なお、CEM/ADR5000 細胞については、ABCB1 の発現を維持するために、週に一度 2.5 µg/ml doxorubicin を継代前日に添加して培養した。

Flp-In-293/ABCB1 細胞および Flp-In-293/Mock 細胞は、37°C, 5%CO₂ の条件下、DMEM 中で培養した。継代は、細胞を播種した日を 0 日目とし、3 日目もしくは 4 日目に行った。具体的には、アスピレーターを用いて培養ディッシュ中の DMEM を吸引除去し、PBS(-)を用いて細胞表面を洗浄した。アスピレーターを用いて洗浄に使用した PBS(-)を吸引除去した後、0.25%(w/v)Trypsin-1 mM EDTA 溶液を培養ディッシュに加え、CO₂ インキュベーター内に約 2 分間静置した。その後、顕微鏡下で細胞の様子を観察した。細胞の形状が球状に変化し、細胞が培養ディッシュから遊離し始めていることを確認した後、新鮮な DMEM を培養ディッシュに加え、細胞と共に DMEM を遠沈管に回収した。そして、遠心分離 (300 rpm、5 分、20°C)を行った。遠心後は、アスピレーターを用いて上清を吸引除去し、遠沈管をタッピングして沈殿した細胞をほぐした後、遠沈管に新鮮な DMEM を加えて細胞を懸濁させた。そして、この細胞懸濁液の一部を Hygromycin B 溶液 (f.c. = 50 µg/ml)を添加しておいた新鮮な DMEM と混合して新しい培養ディッシュに移し、CO₂ インキュベーター (37°C, 5%CO₂)に静置した。

1 mM Calcein-AM

Calcein-AM (nacalai tesque)(1 mg)を DMSO (1.005 ml)で溶解し、1 mM Calcein-AM を調製した。

0.25% Trypan Blue 溶液

Trypan Blue (NACALAI TESQUE) (0.5 g)を超純水 (100 ml)で溶解し、0.22 µm フィルター (MILLEX® GP Syringe Driven Filter Unit)でろ過して 0.25%Trypan Blue 溶液を調製した。

Calcein assay

1998 年、Calcein-AM および Calcein が ABCB1 によって認識され、細胞外に排出され

ることが報告された[127]。非蛍光物質である Calcein-AM は、細胞内のエステラーゼによって蛍光物質である Calcein とアセトキシメチル基に分断される。この現象を利用し、ABCB1 研究では、細胞内に蓄積する Calcein に由来する蛍光を観察・定量することによって ABCB1 の機能が評価されてきた。

本研究では、CEM/ADR5000 細胞を RPMI1640 と共に 24 well plate (3×10^5 cells/well/1.188 ml)に移し、2.5 mM Verapamil (2.376 μ l) (f.c. = 5 μ M)、10 mM Nitensidine A (2.376 μ l) (f.c. = 20 μ M)をそれぞれのウェルに添加した。また、コントロール群には、試験化合物の溶解に用いた DMSO (2.376 μ l)を添加した。溶液を添加した後は、プレートを CO₂ インキュベーター内 (37°C, 5% CO₂)に静置した。15 分後、1 mM Calcein-AM (Nacalai tesque) (12 μ l) (f.c.=10 μ M)を添加し、再び CO₂ インキュベーター内に静置した。この 30 分後、細胞を培地と共に 1.5 ml チューブに回収し、遠心分離 (2000 rpm、10 分、室温)を行った。その後、デカンテーションによって上清を廃棄し、タッピングを行って細胞塊をほぐした後、1 ml の新鮮な RPMI1640 を加えて再び遠心分離 (2000 rpm、10 分、室温)を行った。一連の遠心後は、デカンテーションによって上清を廃棄し、タッピングを行って細胞塊をほぐした後、1 μ g/ml propidium iodide を含む新鮮な RPMI1640 (700 μ l/tube)を加え、BD a FACSCanto™ II Flow Cytometry System (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ)を用いて細胞に蓄積した Calcein に由来する蛍光の強度を測定した。そして、10000 個の細胞を対象にし、ソフトウェア CellQuest (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ)を用いて細胞に蓄積した Calcein の量を解析した。

一方、Flp-In-293/Mock 細胞および Flp-In-293/ABCB1 細胞をそれぞれ 35 mm glass bottom dish (IWAKI)に播種 (3×10^5 cells /dish/2 ml)し、3 日間培養 (37°C, 5% CO₂)した。その後、これらのディッシュに 10 mM Verapamil (2 μ l) (f.c. = 10 μ M)、10 mM Galedine (2 μ l) (f.c. = 10 μ M)、10 mM Nitensidine A (2 μ l) (f.c. = 10 μ M)、10 mM Pterogynine (2 μ l) (f.c. = 10 μ M)、10 mM Pterogynidine (2 μ l) (f.c. = 10 μ M)をそれぞれ添加した。また、コントロール群には、試験化合物の溶解に用いた DMSO (2 μ l)を添加した。溶液を添加した後は、それぞれのディッシュを CO₂ インキュベーター内 (37°C, 5% CO₂)に静置した。15 分後、1 mM Calcein-AM (Nacalai tesque) (2 μ l) (f.c.=1 μ M)を添加し、再び CO₂ インキュベーター内に静置した。この 30 分後、Biozero 8000 (KEYENCE Corp., Osaka, Japan)に付属の GFP-B フィルターおよび対物レンズ、Plan Apo 20X・CFI (20X/0.75) (Nikon, Japan) および Plan Apo VC60XH・CFI (60X/1.40 oil)(Nikon, Japan)を用いて、calcein (λ_{ex} = 490 nm, λ_{em} = 515 nm)に由来する蛍光を観察して画像を取得した。なお、calcein に由来する蛍光は、1/10 秒の露光時間で取得した。

[結果]

Calcein assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価

CEM/ADR5000 細胞を Verapamil (5 μ M)あるいは Nitensidine A (20 μ M)、DMSO (溶

媒)存在下で培養し、ABCB1 による Calcein 輸送にたいする影響を評価した。その結果、Verapamil (5 μ M)あるいは Nitensidine A (20 μ M)存在下では、DMSO (溶媒)存在下で培養した細胞と比して Calcein 蓄積量が多い細胞が増加していた (Fig. 2-2-4)。また、Verapamil (5 μ M)存在下で培養した細胞の方が、Nitensidine A (20 μ M)存在下で培養した細胞と比して Calcein 蓄積量が多い細胞が多かった (Fig. 2-2-4)。

Flp-In-293/Mock 細胞および Flp-In-293/ABCB1 細胞を Verapamil (10 μ M)あるいは Galedine (10 μ M)、Nitensidine A (10 μ M)、Pterogynine (10 μ M)、Pterogynidine (10 μ M)、DMSO (溶媒)存在下で培養し、ABCB1 による Calcein 輸送にたいする影響を評価した。その結果、4 種のグアニジンアルカロイドを添加した群では、DMSO を添加した群と比して強い蛍光が観察された (Fig. 2-2-5)。一方、4 種のグアニジンアルカロイドを添加した群において観察された蛍光は、Verapamil を添加した群と比して弱かった。なお、観察された蛍光強度は、4 種のグアニジンアルカロイド処理群間で大きな差は認められなかった (Fig. 2-2-4)。

[考察]

Calcein assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価

疎水性であり非蛍光の Calcein-AM は、細胞が生存している培養液中に添加すると、細胞膜を自由に通過して細胞内に移行する。そして、細胞内に移行した Calcein-AM は、細胞内に存在する Esterase によってエステル結合の切断を受け、490 nm～515 nm の励起光の存在下で蛍光を発する Calcein へと変換される。一方、Calcein は親水性であるため膜不透過性であり、細胞が生存して細胞内と細胞外が細胞膜によって厳密に区分されている場合には細胞内に蓄積する。このような特性が注目され、Calcein-AM は、細胞の生死判定に用いられてきた[115,128]。一方、ABCB1 が Calcein-AM および Calcein を基質として認識することが見出されて以降は[127]、ABCB1 の機能解析にも Calcein-AM が使用されている。

ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用を評価するために Calcein assay を行った結果、4 種のグアニジンアルカロイドそれぞれが ABCB1 による Calcein の輸送を阻害することが見出された[123]。この結果は、4 種のグアニジンアルカロイドが ABCB1 の阻害剤あるいは基質であることを示唆する。

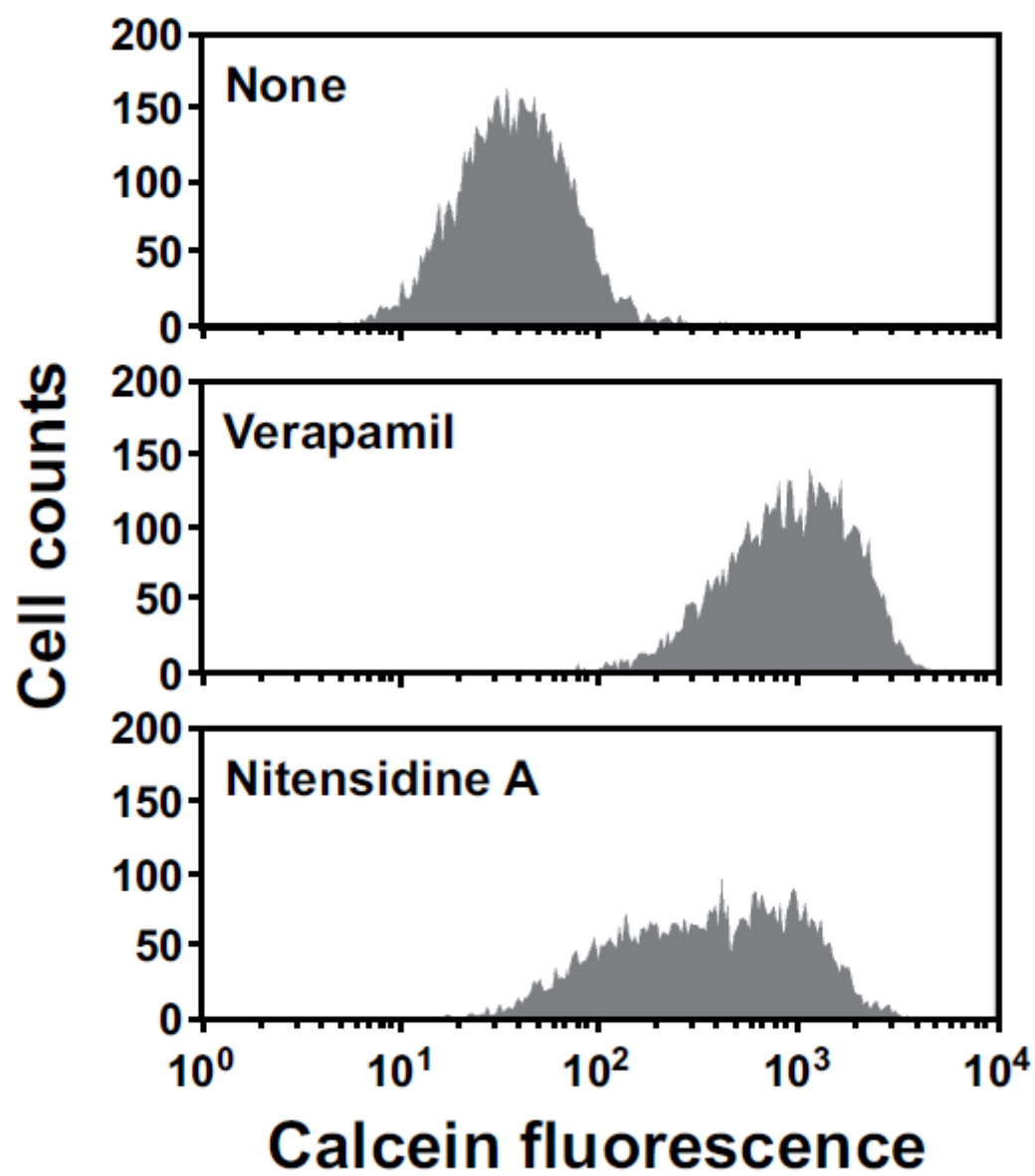


Fig. 2-2-4 Calcein assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドとの相互作用の評価

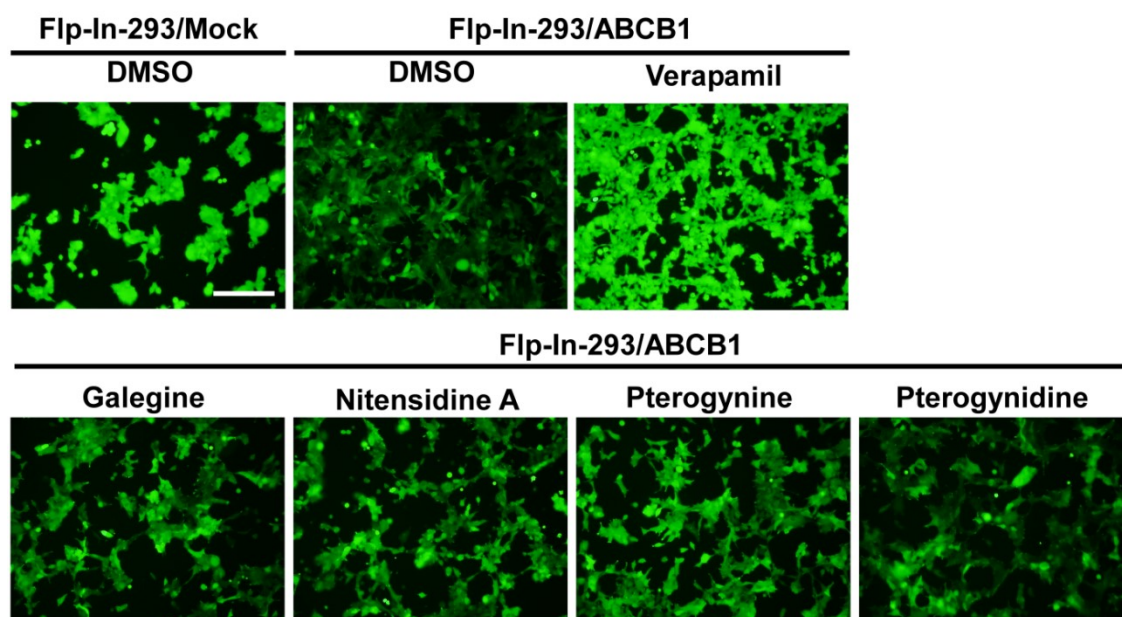


Fig. 2-2-5 Calcein assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドとの相互作用の評価
 化合物濃度は、それぞれ Verapamil (10 μ M)、Galedine (10 μ M)、 Nitensidine A (10 μ M)、
 Pterogynine (10 μ M)、Pterogynidine (10 μ M)である。 緑色は、Calcein に由来する蛍光。
 DMSO, 溶媒として用いた DMSO を添加した群 (negative control)。 Bar = 100 μ m。

2. ATPase assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価

[材料および方法]

試薬

Tris base [tris (hydroxymethyl) aminomethane] (Nacalai Tesque)

MES [2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid] (Nacalai Tesque)

EGTA [ethlen glycol bis (β-aminoethylether)*N,N,N,N*-tetraacetic acid] (Nacalai Tesque)

Dithiothreitol (Nacalai Tesque)

KCl (potassium chloride) (Nacalai Tesque)

NaN₃ (sodium azide) (SIGMA)

Ouabain (SIGMA)

HCl (35% → ~9.6 M) (Nacalai Tesque)

Na₂MoO₄ · 2H₂O (disodium molybdate(6) dihydrate) (SIGMA)

Malachite Green hydrochloride (SIGMA)

Polyvinyl alcohol (Nacalai Tesque)

H₂SO₄ (sulfuric acid, 97%) (Nacalai Tesque)

TCA (trichloroacetic acid) (Nacalai Tesque)

ATP (adenosine-5'-triphosphate magnesium salt) (Nacalai Tesque)

NaHPO₄ · 2H₂O (sodium dihydrophosphate dihydrate) (Nacalai Tesque)

Methanol (Nuclease and Protease tested) (バイオテクノロジーグレード) (NACALAI TESQUE, INC.)

Sodium Lauryl Sulfate (SDS) (NACALAI TESQUE, INC.)

Nitensidine AT, Nitensidine AU

本研究で試験した Nitensidine AT および Nitensidine AU は、Bolzano 教授と Regasini 教授らが合成したものを使用した[129]。

50 mM Tris

Tris base [tris (hydroxymethyl) aminomethane] (Nacalai Tesque) (6.057 g)を超純水で溶解し、1000 ml に調製したものを 50 mM Tris とした。

50 mM MES

MES [2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid] (Nacalai Tesque) (10.663 g)を超純水で溶解し、1000 ml に調製したものを 50 mM MES とした。

50 mM Tris-MES

50 mM Tris (600 ml)と 50 mM MES (750 mM)を混合したものを 50 mM Tris-MES とした。

ATPase buffer

50 mM Tris-MES (700 ml)に EGTA [ethlen glycol bis (β -aminoethylether)*N,N,N,N*-tetraacetic acid] (Nacalai Tesque) (0.761 g)、Dithiothreitol (Nacalai Tesque) (0.309 g)、KCl (potassium chloride) (Nacalai Tesque) (3.728 g)、NaN₃ (sodium azide) (SIGMA) (0.325 g)、Ouabain (SIGMA) (1.169 g)を超純水に溶解し、50 mM Tris あるいは 50 mM MES を用いて pH 6.8 に調製した後、超純水で 1000 ml に調製したものを ATPase buffer (50 mM Tris-MES, pH 6.8, 2 mM dithiothreitol, 50 mM KCl, 5 mM NaN₃, 2 mM ouabain) とした。

Solution A (2M HCl : 0.1 M Na₂MoO₄ = 4 : 3)

HCl (35%→ ~9.6 M) (Nacalai Tesque) (119.05 ml)に Na₂MoO₄ · 2H₂O (disodium molybdate(6) dihydrate) (SIGMA) (10.37 g)を溶解し、超純水で 1000 ml に調製したものを Solution A とした。

Solution B [0.084% (w/v) Malachite Green in 1 % (w/v) polyvinyl alcohol solution]

Malachite Green hydrochloride (SIGMA) (0.84 g)、Polyvinyl alcohol (Nacalai Tesque) (10 g)を超純水で溶解し、1000 ml に調製したものを Solution B とした。

Solution C [7.8% (v/v) H₂SO₄]

H₂SO₄ (sulfuric acid, 97%) (Nacalai Tesque) (80.41 ml)を超純水で 1000 ml に調製したものを Solution C とした。

5%(w/v) TCA

TCA (trichloroacetic acid) (Nacalai Tesque) (80.41 g)を超純水で溶解し、1000 ml に調製したものを 5%(w/v) TCA とした。

80 mM MgATP

ATP (adenosine-5'-triphosphate magnesium salt) (Nacalai Tesque) (1 g)を ATPase buffer で溶解し、23.61 ml に調製して 80 mM MgATP を調製した。

4 mM MgATP

80 mM MgATP (200 μ l)を ATPase buffer (3800 μ l)と混合し、4 mM MgATP を調製した。

200 mM NaH₂PO₄

NaHPO₄ · 2H₂O (sodium dihydrophosphate dihydrate) (Nacalai Tesque) (0.3120 g)を超純水で溶解し、10 ml に調製し、200 mM NaH₂PO₄ を調製した。

1 mM NaH₂PO₄

200 mM NaH₂PO₄ (30 μl)を ATPase buffer (5970 μl)と混合し、1 mM NaH₂PO₄ を調製した。

無機リン酸標準溶液

0 μM NaH₂PO₄ :

1 mM NaH₂PO₄ (0 μl)と ATPase buffer (2000 μl)を混合し、0 μM NaH₂PO₄ を調製した。

100 μM NaH₂PO₄ :

1 mM NaH₂PO₄ (100 μl)と ATPase buffer (1900 μl)を混合し、100 μM NaH₂PO₄ を調製した。

300 μM NaH₂PO₄ :

1 mM NaH₂PO₄ (600 μl)と ATPase buffer (1400 μl)を混合し、300 μM NaH₂PO₄ を調製した。

500 μM NaH₂PO₄ :

1 mM NaH₂PO₄ (1000 μl)と ATPase buffer (1000 μl)を混合し、500 μM NaH₂PO₄ を調製した。

ATPase assay 用の Test sample solution

1 μl の 4 mM Verapamil、4 mM Galedine、4 mM Nitensidine A、4 mM Pterogynine、4 mM Pterogynidine、4 mM Nitensidine AT、4 mM Nitensidine AU をそれぞれ ATPase Buffer (99 μl)に混合し、試験化合物溶液を調製した。また、control 溶液として、溶媒である DMSO (1 μl)と ATPase Buffer (99 μl)を混合したものも調製した。

Membrane vesicle 溶液

Sakurai らの方法[107]に従い、CEM/ADR5000 細胞から Membrane vesicle 溶液を調製した。また、Sakurai らによって調製された ABCB1 発現 Sf-9 細胞の膜画分 (7.35 μg/μl) [107]をタンパク質濃度が 0.1 μg/ml となるように ATPase buffer で希釈し、Membrane vesicle 溶液を調製した。

遊離リン酸定量用の検量線作製

4 本の 1.5 ml tube に超純水 (30 μl)および ATPase Buffer (30 μl)を加え、0, 100, 300,

500 μM NaH_2PO_4 をそれぞれの tube に 60 μl 加えて混合した。これらを 37°C で 30 分間静置し、Solution A (126 μl) を加えて転倒混和した。続いて、Solution B (54 μl) を加えて転倒混和し、Solution C (360 μl) をさらに加えて転倒混和した。この後、これらを室温で 60 分間静置し、Multiskan JX (ThermoLabsystems) にて吸光度 (630 nm) を測定した。

ATPase assay

生体膜を隔てて基質を輸送する ABC 輸送体は、ATP を加水分解して、その駆動力を獲得する (Fig. 1-4-3)。つまり、ATP の加水分解量は、ABCB1 が輸送する基質の量を反映すると考えられる。そのため、ABCB1 研究では、ABCB1 が ATP を分解することによって生じる単位時間あたりの無機リン酸量を定量して、ABCB1 と試験化合物との親和性が評価されてきた。

本研究では、1.5 ml tube に Test sample solution (30 μl)、Membrane vesicle solution (30 μl)、4 mM MgATP (60 μl) を加え、転倒混和した後に 37°C のインキュベーター内に静置して反応を促した。30 分後、反応を停止させるために全てのチューブに TCA (60 μl) を添加した。なお、反応開始時の状態を示す試料として、Test sample solution (30 μl) および Membrane vesicle solution (30 μl) を加えた 1.5 ml tube に 4 mM MgATP (60 μl) を加える直前に TCA (60 μl) を加えた試料も調製した。TCA を添加して反応を停止させた後は、Solution A (126 μl)、Solution B (54 μl)、Solution C (360 μl) の順番に溶液を 1.5 ml tube に添加した。なお、それぞれの溶液を加えた後には、よく転倒混和した。この一連の操作が終了した後は、室温で 60 分間静置し、その後、Multiskan JX (ThermoLabsystems) にて吸光度 (630 nm) を測定した。そして、測定結果を以下の式に当てはめ、1 mg の膜画分が 1 分間に分解する ATP の量 (遊離リン酸の物質量) (nmol) を算出した。なお、本研究では、以下の式から得られた数値を ATPase 活性 (nmol/min/mg protein) とした。

nmol/min/mg protein =

反応後 (nmol) - 反応 (nmol) - (control solution における測定値) (nmol) $\div$ 30 (min) $\div$ 0.0015 (希釈倍率)

また、Hanes-Woolf plot に従って ATPase 活性 (nmol/min/mg protein) と化合物濃度を処理し、 K_m 値と $V_{\max}$ 値を算出した。

[結果]

ATPase assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価

CEM/ADR5000 細胞から調製した膜画分を Verapamil (0-100 μM) あるいは Galedine (0-100 μM)、Nitensidine A (0-100 μM)、Pterogynine (0-100 μM)、Pterogynidine (0-100 μM) と混合し、単位時間あたりに ATP から生じる無機リン酸を定量して、ABCB1 との相互作用

用を評価した。その結果、Galedine を除いて ATP の分解が認められた。ATP の最大分解量は、Verapamil = Nitensidine A > Pterogynidine > Pterogynine > Galedine の順に多かった (Fig. 2-2-5)。また、Verapamil と Nitensidine A については、Hanes-Woolf plot から K_m 値 (Verapamil, 3.7 μM ; Nitensidine A, 6.4 μM) と $V_{\max}$ 値 (Verapamil, 128 μM ; Nitensidine A, 125 μM) が算出された (Fig. 2-2-5)。一方、CEM/ADR5000 細胞から調製した膜画分を Nitensidine A の構造類縁体である Nitensidine AT (0-100 μM) あるいは Nitensidine AU (0-100 μM) と混合し、単位時間あたりに ATP から生じる無機リン酸を定量した。その結果、Nitensidine AT あるいは Nitensidine AU 存在下では、共に ATP の分解が認められた (Fig. 2-2-6)。また、Nitensidine AU については、Hanes-Woolf plot から K_m 値 (2.9 μM) と $V_{\max}$ 値 (18 μM) が算出された (Fig. 2-2-6)。

ABCB1 を過剰発現させた昆虫細胞 Sf-9 から調製した膜画分を Verapamil (10 μM) あるいは Galedine (10 μM)、Nitensidine A (10 μM)、Pterogynine (10 μM)、Pterogynidine (10 μM) と混合し、単位時間あたりに ATP から生じる無機リン酸を定量して、ABCB1 との相互作用を評価した。その結果、Nitensidine A 添加群において、Verapamil 添加群と同程度の ATP の分解が認められた (Fig. 2-2-7)。一方、Pterogynidine あるいは Galedine、Pterogynine 添加群で認められた ATP の分解量は、Verapamil 添加群と比して 50% 以下であった (Fig. 2-2-7)。なお、ATP の分解量は、Verapamil = Nitensidine A > Pterogynidine > Galedine > Pterogynine の順に多かった (Fig. 2-2-4)。

[考察]

ATPase assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価

生体膜を隔てて基質を輸送する ABC 輸送体は、ATP を加水分解して、その駆動力を獲得する (Fig. 1-4-3)。つまり、ABCB1 と ATP、試験化合物を混合した際に生じる無機リン酸を定量することによって、試験化合物が ABCB1 の基質である可能性を評価することができる。

ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用を評価するために ATPase assay を行った結果、グアニジンアルカロイドの存在下において ATP が分解され、無機リン酸が生じることが見出された (Fig. 2-2-5, 2-2-6, 2-2-7)。Calcein assay の結果と合わせると、Nitensidine A、Pterogynine、Pterogynidine は、ABCB1 の基質であると考えられる。また、CEM/ADR5000 細胞から調製した膜画分を用いた実験から得られた結果に基づくと、濃度依存的な ATPase 活性の上昇が認められたため、Nitensidine AT も ABCB1 の基質であると考えられる。Nitensidine AT については、ATPase 活性の上昇が認められたが、実験を行った条件下において K_m 値と $V_{\max}$ 値を算出することが出来なかった。一方、CEM/ADR5000 細胞から調製した膜画分を用いた実験から算出された $V_{\max}$ 値に基づくと、単位時間あたりに ABCB1 によって輸送される化合物の量は、Verapamil = Nitensidine A >> Nitensidine AU の順に多いと考えられる。さらに、CEM/ADR5000 細胞から調製した膜画分を用いた

実験から得られた K_m 値に基づくと、ABCB1 との複合体の形成は、Nitensidine AU = Verapamil > Nitensidine A の順に起こりやすいと考えられる。Nitensidine A と Nitensidine AU の構造の違いに基づくと、Nitensidine A のイミノ基窒素が硫黄に置換されることによって ABCB1 にたいする親和性が高くなると考えられる。つまり、ABCB1 と Nitensidine A の相互作用に Nitensidine A のイミノ基窒素が重要であると考えられる。

ABCB1 を過剰発現させた昆虫細胞 Sf-9 から調製した膜画分を用いた実験において見出された各化合物存在下における ATP の分解量 (Verapamil = Nitensidine A > Pterogynidine > Galedine > Pterogynine) の関係 (Fig. 2-2-6, 2-2-7, 2-2-8) も含めると、ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用は、「ゲラニル基の数」と「グアニジン構造におけるゲラニル基の結合部位」によって変化することが考えられる。

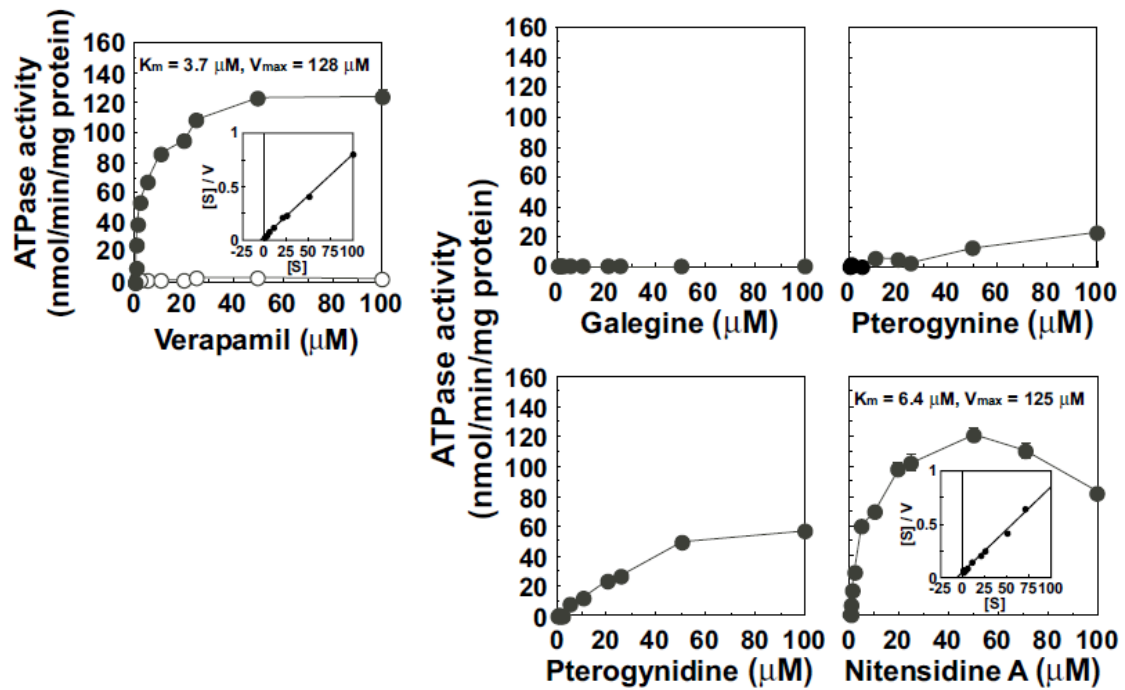


Fig. 2-2-6 Guanidine alkaloids による ABCB1 ATPase 活性の濃度依存的評価

○, CCRF-CEM 細胞; ●, CEM / ADR5000 細胞; 縦軸, ATPase 活性; 横軸, 薬剤濃度。

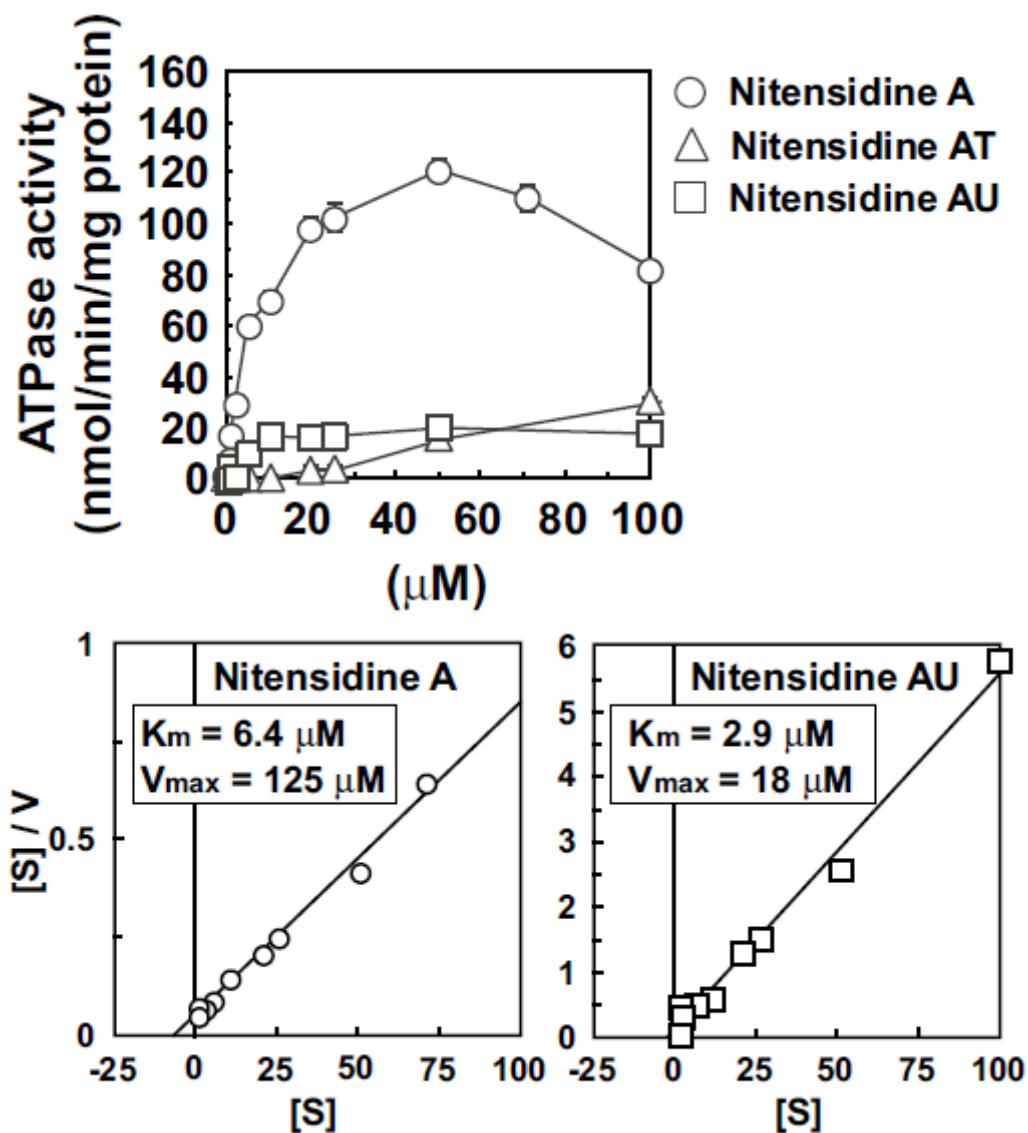


Fig. 2-2-7 Nitensidine A および Nitensidine AU、Nitensidine AT による ABCB1 ATPase 活性の濃度依存的評価

○, Nitensidine A; △, Nitensidine AT; □, Nitensidine AU; 縦軸, ATPase 活性; 横軸, 薬剤濃度。

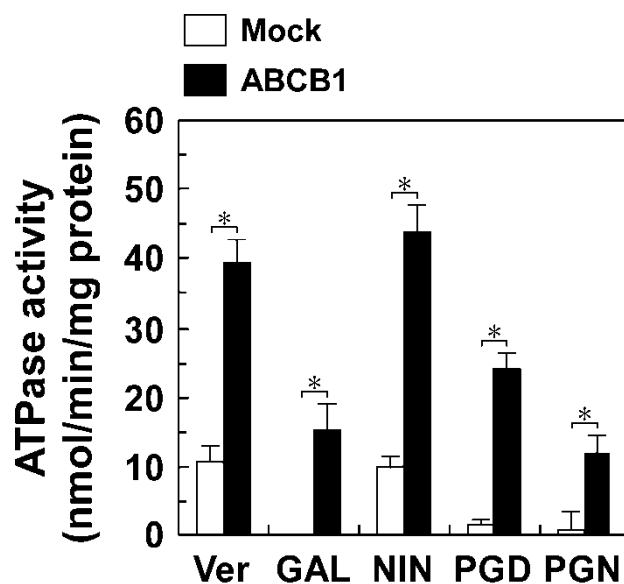


Fig. 2-2-8 ATPase Assay による ABCB1 とグアニジンアルカロイドとの相互作用の評価
 化合物濃度はそれぞれ Verapamil (10 μ M)、Galedine (10 μ M)、 Nitensidine A (10 μ M)、
 Pterogynine (10 μ M)、Pterogynidine (10 μ M)である。縦軸, 1 分あたりに 1 mg のタンパク
 質が分解し生じる遊離リン酸の物質質量。有意差検定は、Microsoft Exel 2003 (Microsoft)の
 T.TEST 関数を用いて行った (*、Mock 群と比較して $P < 0.05$)。(Ver = Verapamil、GAL =
 Galegine、NIN = Nitensidine A、PGD = Pterogynidine、PGN = Pterogynine)

3. MTT assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価

[材料および方法]

試薬

Thiazolyl blue Thtrazolium Bromide MW = 414.32 (SIGMA)

Cell Proliferation Kit II (XTT) (Roche)

細胞

「1. Calcein assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 細胞」と同様の細胞を使用した。

PBS(-)の調製

「1. Calcein assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 PBS(-)の調製」と同様の操作で調製した。

200 mM L-Glutamine の調製

「1. Calcein assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 200 mM L-Glutamine の調製」と同様の操作で調製した。

血清の非働化

「1. Calcein assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 血清の非働化」と同様の操作で調製した。

細胞培養用 DMEM の調製

「1. Calcein assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 細胞培養用 DMEM の調製」と同様の操作で調製した。

1M EDTA 水溶液の調製

「1. Calcein assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 1M EDTA 水溶液の調製」と同様の操作で調製した。

0.25%(w/v)Trypsin-1 mM EDTA 溶液の調製

「1. Calcein assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 0.25%(w/v)Trypsin-1 mM EDTA 溶液の調製」と同様の操作で調製した。

細胞の培養および継代

「1. Calcein assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 細胞の

培養および継代」と同様の操作で調製した。

50 mg/ml MTT 溶液

Thiazolyl blue Thtrazolium Bromide MW = 414.32 (SIGMA) (1 g) を Methanol (Nuclease and Protease tested) (バイオテクノロジーグレード) (NACALAI TESQUE, INC.) (20 ml) で溶解し、50 mg/ml MTT 溶液を調製した。

20% SDS 溶液

ラウリル硫酸ナトリウム(NACALAI TESQUE) (200 g) を超純水 (800 g) で 20%(w/w) に溶解し、20% SDS 溶液を調製した。

MTT assay

MTT [3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, yellow tetrazole] は、ミトコンドリアにある脱水素酵素によって Formazan に変化する。つまり、Formazan の生成量は、細胞が生存している指標とすることができる[130]。

本研究では、「2. Calcein assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 細胞の培養および継代」に記述した方法に従って、100 mm culture dish から細胞を回収し、遠心 (300 rpm、5 分、20°C) して新鮮な培地を用いて懸濁させた後、細胞を 96 well plate に播種した(0 日目)。実際には、遠心分離操作直前に遠沈管から 10 μ l の細胞懸濁液を採取し、同量 (10 μ l) の 0.5% Trypan Blue 溶液と混合して、血球計算盤上で生細胞の数を数えた。遠心後には、アスピレーターを用いて上清を吸引除去し、遠心分離によって沈殿した細胞塊をタッピングによってほぐした後、遠沈管に新鮮な RPMI1640 あるいは DMEM を添加して細胞を分散させた。その後、遠心分離中に計測した細胞数に基づき、必要量の細胞懸濁液と新鮮な RPMI1640 あるいは DMEM をリザーバー上で混合し、96 well plate に細胞 (CCRF-CEM 細胞および CEM/ADR5000 細胞 : 2×10^4 cells/well/50 μ l 、Flp-In-293/Mock 細胞および Flp-In-293/ABCB1 細胞 : 5×10^3 cells/well/100 μ l) を播種した。なお、96 well のうち 4 well には細胞を播種せず、RPMI1640DMEM のみを添加し、「ブランク」として使用した。

96 well plate に細胞を蒔いた後、CCRF-CEM 細胞あるいは CEM/ADR5000 細胞を播種したプレートには、直ちに薬物 (Galedine、Nitensidine A、Pterogynine、Pterogynidine) を添加した。また、CEM/ADR5000 細胞については、verapamil (0, 5, 10, 20 μ M) と共に Nitensidine A を添加する試験も行った。一方、Flp-In-293/Mock 細胞あるいは Flp-In-293/ABCB1 細胞を播種したプレートには、一晩 CO₂ インキュベーター (37°C, 5%CO₂) 内に静置した後 (1 日目)、薬物 (Galedine、Nitensidine A、Pterogynine、Pterogynidine) を添加した。薬物は、いずれも 100 μ M を試験開始濃度とし、RPMI1640 あるいは DMEM で 2 倍ずつ 10 段階に希釈して添加した。薬物添加後は、96 well plate を CO₂ インキュベータ

ー (37℃, 5%CO₂)内に静置し、72 時間培養した。72 時間後 (CCRF-CEM 細胞および CEM/ADR5000 細胞 : 3 日目、Flp-In-293/Mock 細胞および Flp-In-293/ABCB1 細胞 : 4 日目)、Cell Proliferation Kit II (XTT)を用いて CCRF-CEM 細胞および CEM/ADR5000 細胞の生存率を算出した。Flp-In-293/Mock 細胞および Flp-In-293/ABCB1 細胞については、PBS(-)で 10 倍に希釈した 50 mg/ml MTT 溶液を 96 well plate の全ての well に 10 μl/well 添加し、CO₂ インキュベーター (37℃, 5%CO₂)内で 3 時間培養した。その後、20% SDS 溶液を 100 μl/well 添加して細胞を溶解し、CO₂ インキュベーター (37℃, 5%CO₂)内に plate を一晩静置して、細胞内で生じた Formazan を培養液中に拡散させた。そして、翌日 (5 日目)、Multiskan JX (ThermoLabsystems)にて吸光度 (570 nm, 630 nm)を測定した。得られた測定値は、以下の式に当てはめ、薬物未処理群 (コントロール) における測定値にたいする百分率として細胞の生存率(% of control) の算出に使用した。

細胞の生存率 (% of control) =

$$\{[(\text{薬物処理群のA570}) - (\text{薬物処理群のA630})] - \text{平均}[(\text{ブランクのA570}) - (\text{ブランクのA630})]\} \div \{[(\text{コントロール群のA570}) - (\text{コントロール群のA630})] - \text{平均}[(\text{ブランクのA570}) - (\text{ブランクのA630})]\} \times 100$$

有意差検定

有意差検定は、Microsoft Excel 2003 (Microsoft)の T.TEST 関数を用いて行った (*、Mock 群と比較して P <0.05)。

[結果]

MTT Assay を用いた ABCB1 発現細胞にたいするグアニジンアルカロイドの影響の評価

CCRF-CEM 細胞および CEM/ADR5000 細胞、Flp-In-293/Mock 細胞および Flp-In-293/ABCB1 細胞をそれぞれ Galedine、Nitensidine A、Pterogynine、Pterogynidine 存在下で培養し、細胞増殖にたいする各化合物の影響を評価した。その結果、4 種のグアニジンアルカロイドは、濃度依存的に CCRF-CEM 細胞および CEM/ADR5000 細胞、Flp-In-293/Mock 細胞および Flp-In-293/ABCB1 細胞の生存率を低下させた (Fig.2-2-9, 2-2-10)。なお、CEM/ADR5000 細胞と Flp-In-293/ABCB1 細胞は、CCRF-CEM 細胞と Flp-In-293/Mock 細胞に比して、4 種のグアニジンアルカロイドに抵抗性を示した (Fig.2-2-9, 2-2-10)。また、4 種のグアニジンアルカロイドにたいする感受性は、細胞間で異なっていた (Tab. 2-2-1)。一方、CEM/ADR5000 細胞の増殖にたいする Nitensidine A の影響を Verapamil (0, 5, 10, 20 μM) 存在下で評価した結果、添加された Verapamil の濃度依存的に CEM/ADR5000 細胞が示す生存曲線が低濃度側にシフトした (Fig. 2-2-11)。

[考察]

MTT Assay を用いた ABCB1 発現細胞にたいするグアニジンアルカロイドの影響の評価

CCRF-CEM 細胞および CEM/ADR5000 細胞、Flp-In-293/Mock 細胞および Flp-In-293/ABCB1 細胞を用いて、4 種のグアニジンアルカロイドにたいする各細胞の感受性を評価した。その結果、4 種のグアニジンアルカロイドが、CCRF-CEM 細胞および CEM/ADR5000 細胞、Flp-In-293/Mock 細胞および Flp-In-293/ABCB1 細胞にたいして濃度依存的な細胞毒性を示すことが見出された。ABCB1 の発現が認められる CEM/ADR5000 細胞と Flp-In-293/ABCB1 細胞が ABCB1 の発現が認められない CCRF-CEM 細胞と Flp-In-293/Mock 細胞よりも 4 種のグアニジンアルカロイドに抵抗性を示したことから、CEM/ADR5000 細胞と Flp-In-293/ABCB1 細胞が 4 種のグアニジンアルカロイドを細胞外に排出していることが示唆された。一方、細胞増殖にたいする Nitensidine A の影響を Verapamil (0, 5, 10, 20 μ M) 存在下で評価した結果、Nitensidine A にたいする CEM/ADR5000 細胞の感受性が、添加された verapamil の濃度依存的に上がることが見出された。これは、CEM/ADR5000 細胞に発現している ABCB1 が、Nitensidine A に加えて ABCB1 の典型的な基質である Verapamil も排出していることが原因であると考えられる。つまり、Verapamil と Nitensidine A が ABCB1 にたいして拮抗し、CEM/ADR5000 細胞から Nitensidine A が排出され難くなったことが原因として考えられる。

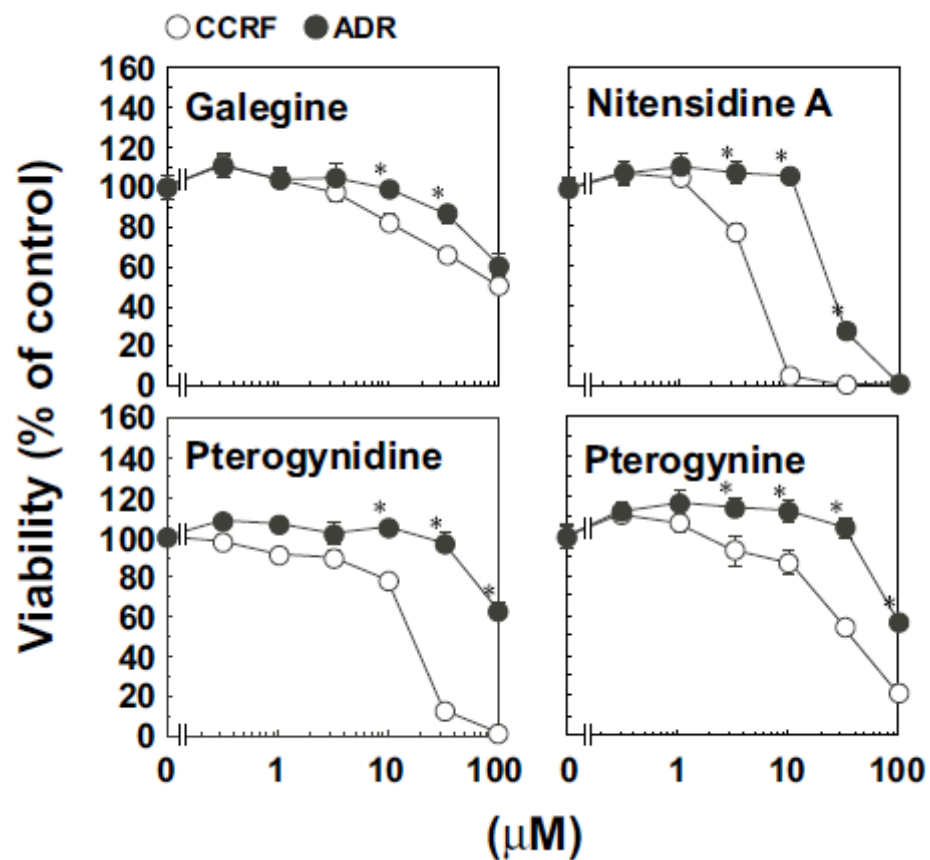


Fig. 2-2-9 CCRF-CEM および CEM / ADR5000 細胞の生存率に対するグアニジンアルカロイドの影響

○, CCRF-CEM 細胞、●, CEM / ADR5000 細胞、縦軸, ATPase 活性、横軸, 薬剤濃度とした。(*、CCRF-CEM 細胞群と比較して $P < 0.05$)。

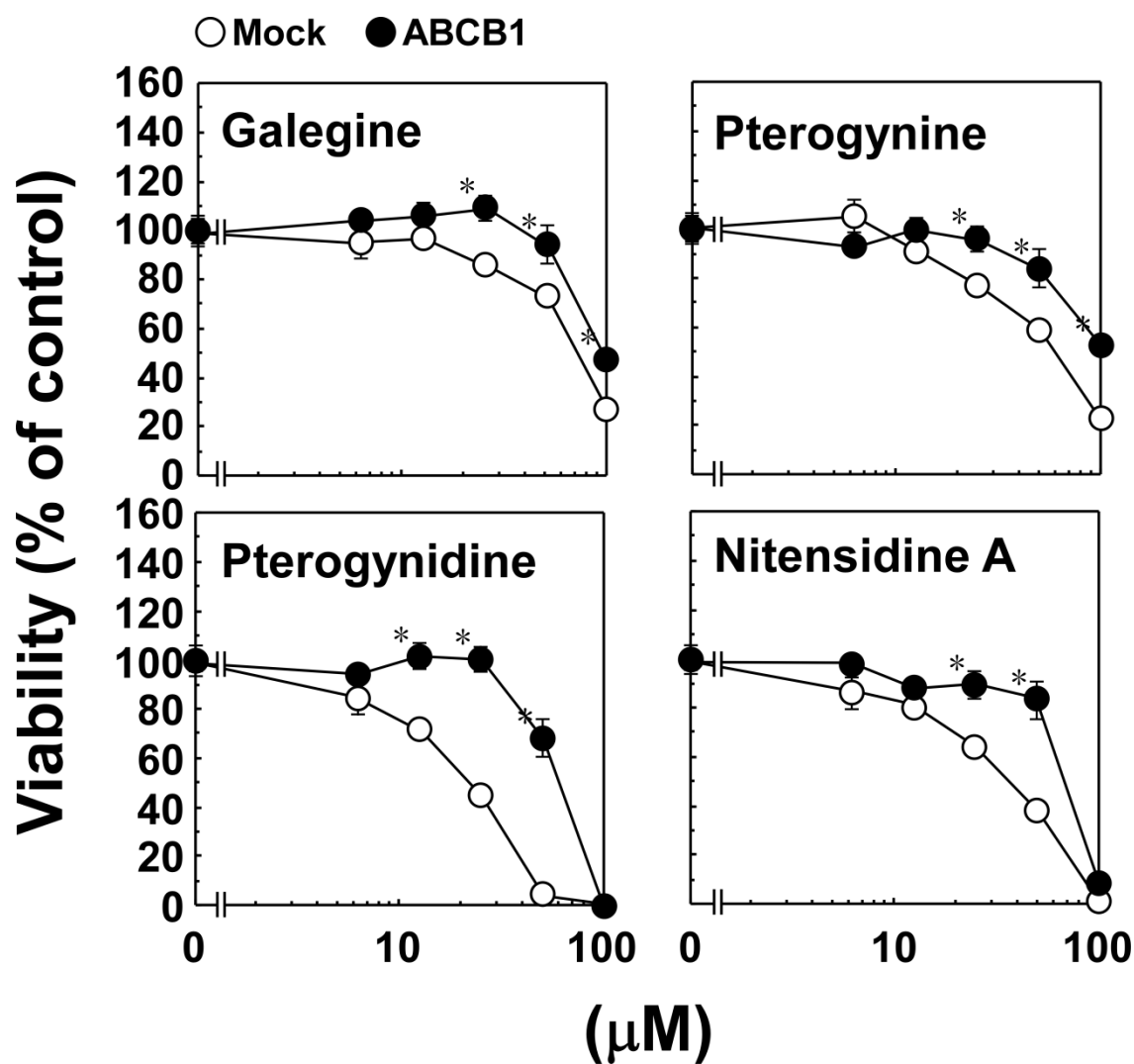


Fig.2-2-10 MTT assay による ABCB1 とグアニジンアルカロイドとの相互作用の評価

○, Flp-In-293/Mock 細胞; ●, Flp-In-293/ABCB1 細胞。縦軸, 薬剤非存在下で培養した細胞の生存率を 100%とした場合の細胞生存率; 横軸, 化合物の濃度。

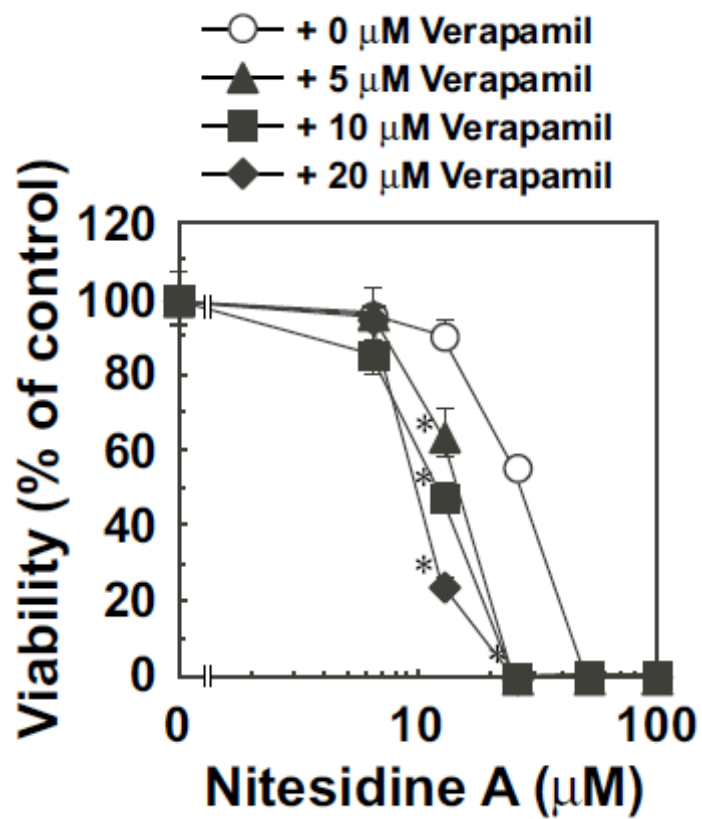


Fig. 2-2-11 CEM / ADR5000 細胞の生存率にたいする Nitesidine A と Verapamil の併用処理の効果

Verapamil (○, 0 μM; ▲, 5 μM; ■, 10 μM; ◆, 20 μM) ; 縦軸, 細胞生存率; 横軸, Nitesidine A 濃度。

Tab. 2-2-1

Compounds	IC ₅₀ (μM)	
	CCRF-CEM cells	CEM/ADR5000 cells
Galegine	> 100	> 100
Nitensidine A	4.9 ± 0.03	23 ± 2
Pterogynidine	16 ± 0.8	> 100
Pterogynine	37 ± 3	> 100

データは 3 回の測定の平均 ± SEM として表す。

第 3 節 ABCB1 と辛夷リグナンとの相互作用解析

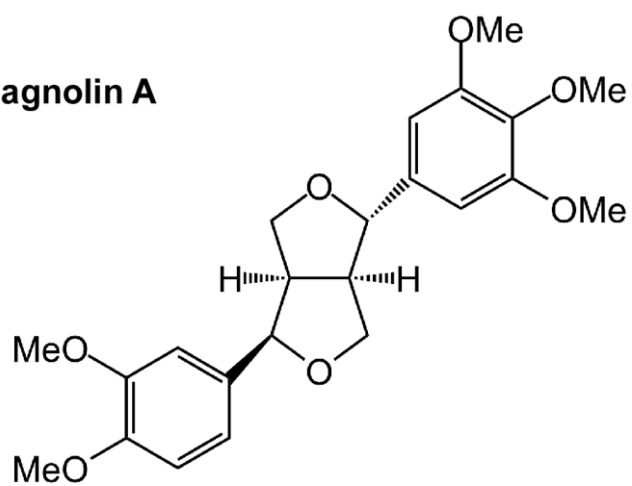
[背景と目的]

ABC 輸送体を介した薬剤耐性機構を理解することは、「がん」の克服に不可欠である。本研究の題材である ABCB1 は、「がん」に薬剤耐性を付与する代表的な ABC 輸送体であり、抗がん剤を中心として、これまでに多くの薬物が ABCB1 の基質として報告されてきた。そして、本研究では、今日使用されている薬物のリード化合物を多数提供してきた天然物に注目し、第 2 節において、南米原産植物 *Pterogyne Nitens* (Fig. 2-2-2) に含まれるグアニジンアルカロイド (Fig. 2-2-3) が ABCB1 と相互作用することを示した[123,131]。

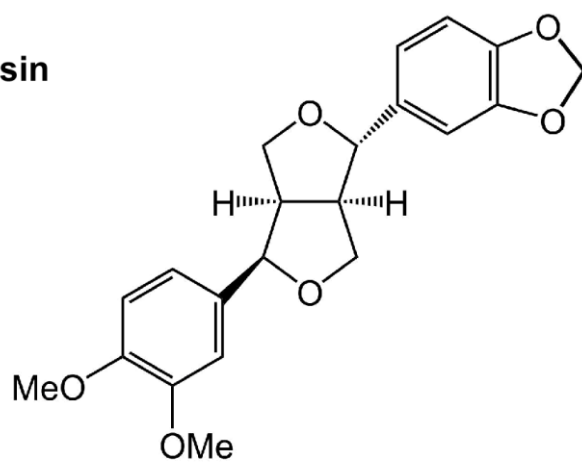
我々が利用している薬は、大きく「西洋薬」と「漢方薬」に分類することができ、西洋薬が単一成分の薬剤であるのに対し、漢方薬は多成分系の薬剤である。一つの症状に対して的を絞り、有効成分を抽出し、有効性と共に安全性を評価しながら使用に至る西洋薬に対し、1000 年以上に渡って積み重ねられた経験に基づいて使用されているのが漢方薬である。このため、漢方薬の有効性や体内動態は、西洋薬ほど科学的に理解されていない。そこで、本研究では、共同研究先である中部大学 生物機能開発研究所 禹研究室で研究対象になっていた生薬「辛夷 (シンイ)」を研究題材として選定した。実際には、シンイから単離されたリグナン Epimagnolin A および Fargesin、Kobusin (Fig. 2-3-1) を研究題材として選定した。

化合物を用いて ABCB1 の機能を評価する方法として、①構造が異なる化合物を対象にして ABCB1 との親和性を試験し、ABCB1 との親和性が高い構造および化学的特性を理解する方法、と②ABCB1 の基質として報告されている化合物と構造が似ている化合物・類縁体を対象にして ABCB1 との親和性を試験し、ABCB1 との親和性が高い部分構造および化学的特性を理解する方法、がある。第 3 節では、辛夷に含まれるリグナン Epimagnolin A および Fargesin を用いて ABCB1 との相互作用を評価し、ABCB1 の機能を分子レベルで理解することを目指した。実際には、ABCB1 発現細胞を用いた「Calcein assay」および「MTT assay」、ABCB1 含有膜画分を用いた「ATP Assay」を実施した。

Epimagnolin A



Fargesin



Kobsin

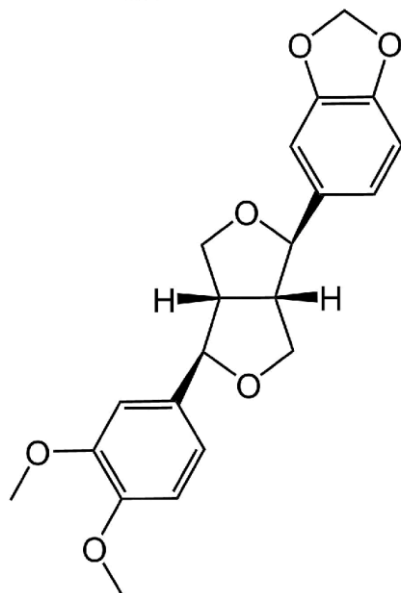


Fig.2-3-1 第3節で使用した辛夷リグナンの構造式

1. Calcein assay を用いた ABCB1 と辛夷リグナンの相互作用評価

[材料および方法]

試薬

「第2章 第2節 1. Calcein assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 試薬」と同一の試薬を用いた。なお、本研究に用いた Epimagnolin A および Fargesin は中部大学 応用生物学部 禹済泰教授から提供して頂いた。

細胞

「第2章 第2節 1. Calcein assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 細胞」の中で、利用した Flp-In-293/Mock 細胞および Flp-In-293/ABCB1 細胞を用いた。

PBS(-)の調製

「第2章 第2節 1. Calcein assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 PBS(-)の調製」と同様に調製した。

200 mM L-Glutamine の調製

「第2章 第2節 1. Calcein assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 200 mM L-Glutamine の調製」と同様に調製した。

血清の非働化

「第2章 第2節 1. Calcein assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 血清の非働化」と同様に調製した。

細胞培養用 DMEM の調製

「第2章 第2節 1. Calcein assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 血清の非働化」と同様に調製した。

1 M EDTA 水溶液の調製

「第2章 第2節 1. Calcein assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 1M EDTA 水溶液の調製」と同様に調製した。

0.25%(w/v)Trypsin-1 mM EDTA 溶液の調製

「第2章 第2節 1. Calcein assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 0.25%(w/v)Trypsin-1 mM EDTA 溶液の調製」と同様に調製した。

細胞の培養および継代

「第2章 第2節 1. Calcein assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 細胞の培養および継代」と同様に実施した。

1 mM Calcein-AM

「第2章 第2節 1. Calcein assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 1 mM Calcein-AM」と同様に調製した。

0.25% Trypan Blue 溶液

「第2章 第2節 1. Calcein assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 0.25% Trypan Blue 溶液」と同様に調製した。

Calcein assay

「第2章 第2節 1. Calcein assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 Calcein assay」と同様に実施した。なお、dish には、Verapamil (10 μ M)、Epimagnolin A (40 μ M)、Fargesin (40 μ M)、Kobusin (50 μ M) をそれぞれ添加し、コントロール群には、試験化合物の溶解に用いた DMSO (2 μ l) を添加した。また、化合物および DMSO を添加して 15 分間 CO₂ インキュベーター内に静置した後は、1 mM Calcein-AM (Nacalai tesque) (2 μ l) (f.c.=1 μ M)に加えて、2 滴の Nuc Blue live cell stain (Molecular Probes)を添加した。この 30 分後、Biozero 8000 (KEYENCE Corp., Osaka, Japan)に付属の GFP-B フィルターと DAPI -B フィルターおよび、対物レンズ、Plan Apo 20X・CFI (20X/0.75) (Nikon, Japan)および Plan Apo VC60XH・CFI (60X/1.40 oil)(Nikon, Japan)を用いて、それぞれ calcein (λ_{ex} = 490 nm, λ_{em} = 515 nm)と Nuc Blue live cell stain (λ_{ex} = 360 nm, λ_{em} = 460 nm)に由来する蛍光を観察して画像を取得した。なお、calcein に由来する蛍光は、1/6 秒の露光時間で取得した。また、Nuc Blue live cell stain に由来する蛍光は、2 秒の露光時間で取得した。

[結果]

Calcein assay を用いた ABCB1 と辛夷リグナンの相互作用評価

Calcein assay では、Flp-In-293/ABCB1 細胞を Verapamil (10, 40 μ M)あるいは Epimagnolin A (10, 40 μ M)、Fargesin (10, 40 μ M)、DMSO (溶媒)存在下で培養し、ABCB1 による Calcein 輸送にたいする影響を評価した。その結果、Verapamil (10 μ M)あるいは Epimagnolin A (10, 40 μ M)、Fargesin (10, 40 μ M)存在下では、DMSO (溶媒)存在下と比して calcein に由来する蛍光が強く観察される細胞が多く認められた (Fig. 2-3-2)。また、Verapamil (10 μ M)存在下の方が、Epimagnolin A (10 μ M)、Fargesin (10 μ M)存在下と比して calcein に由来する蛍光が強く観察された (Fig. 2-3-2)。なお、観察された蛍光の強度

は、Verapamil > Epimagnolin A = Fargesin > DMSO であった。一方、40 μ M の化合物存在下では、添加した化合物間で観察された蛍光強度に差は認められなかった (Fig. 2-3-2)。

[考察]

Calcein assay を用いた ABCB1 と辛夷リグナンの相互作用評価

疎水性であり非蛍光の Calcein-AM は、細胞が生存している培養液中に添加すると、細胞膜を自由に通過して細胞内に移行する。そして、細胞内に移行した Calcein-AM は、細胞内に存在する Esterase によってエステル結合の切断を受け、490 nm~515 nm の励起光の存在下で蛍光を発する Calcein へと変換される。一方、Calcein は親水性であるため膜不透過性であり、細胞が生存して細胞内と細胞外が細胞膜によって厳密に区分されている場合には細胞内に蓄積する。このような特性が注目され、Calcein-AM は、細胞の生死判定に用いられてきた[115,128]。一方、ABCB1 が Calcein-AM および Calcein を基質として認識することが見出されて以降は[127]、ABCB1 の機能解析にも Calcein-AM が使用されている。

ABCB1 と辛夷リグナンの相互作用を評価するために Calcein assay を行った結果、Epimagnolin A と Fargesin が ABCB1 による Calcein の輸送を阻害することが見出された。この結果は、Epimagnolin A と Fargesin、Kobusin が ABCB1 の阻害剤あるいは基質であることを示唆する。

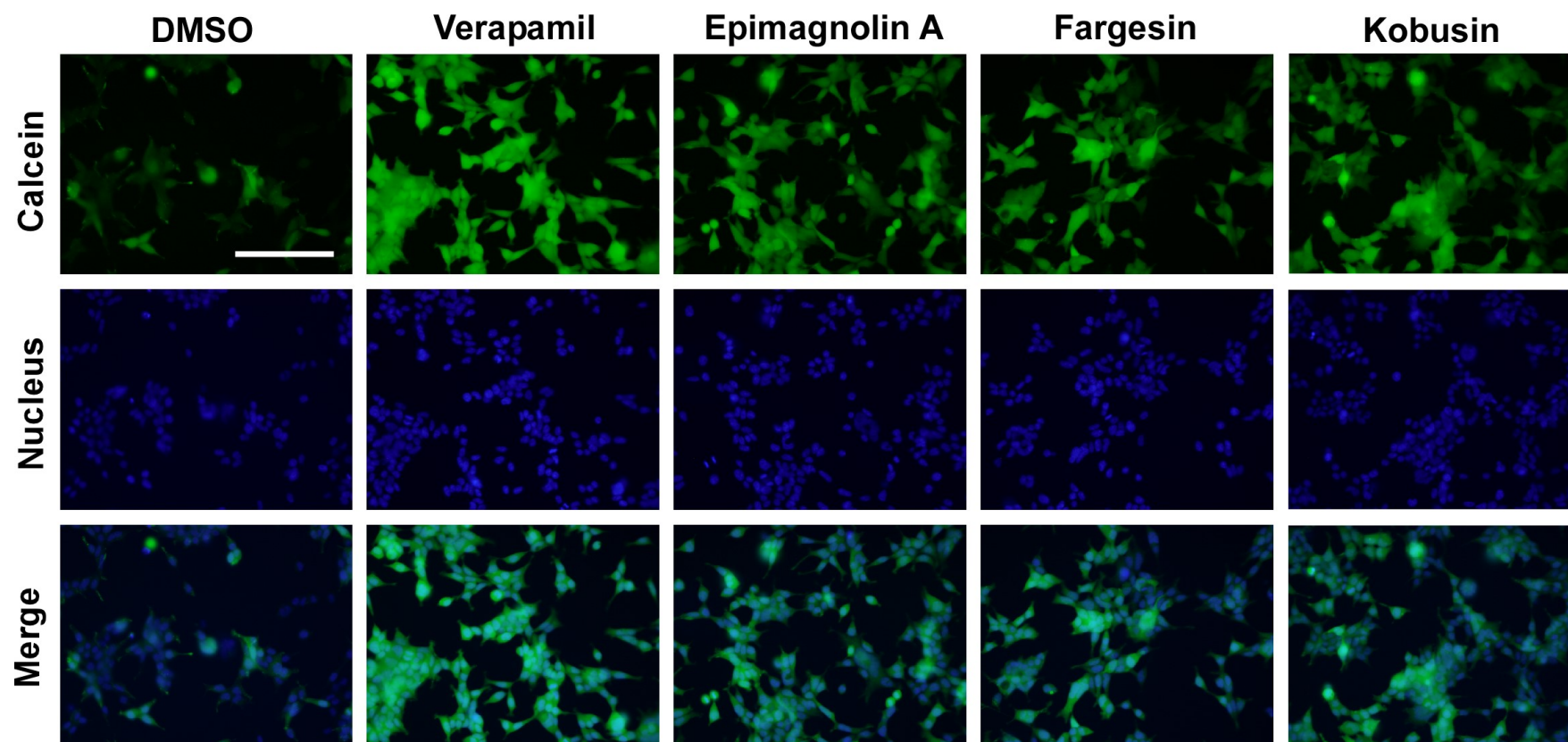


Fig. 2-3-2 Calcein Assay における Epimagnolin A 添加時の Flp-In-293/ABCB1 細胞

化合物濃度はそれぞれ Verapamil (10 μ M) 、 Epimagnolin A (40 μ M)、 Fargesin (40 μ M)、 Kobusin (40 μ M)で添加した。上段は Calcein 由来の蛍光を 1/2.5 秒で露光し撮影した。中段は Nuc Blue Live cell stain 由来の蛍光を 4 秒の露光で撮影した。下段は Calcein 由来および Nuc Blue Live cell stain 由来の蛍光を撮影したものを比較明合成したものである。スケールバーは 100 μ m である。

2. ATPase assay を用いた ABCB1 と辛夷リグナンの相互作用評価

[材料および方法]

試薬

「第2章 第2節 2. ATPase assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 試薬」と同一の試薬を使用した。

50 mM Tris

「第2章 第2節 2. ATPase assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 50 mM Tris」と同様に調製した。

50 mM MES

「第2章 第2節 2. ATPase assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 50 mM MES」と同様に調製した。

50 mM Tris-MES

「第2章 第2節 2. ATPase assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 50 mM Tris-MES」と同様に調製した。

ATPase buffer

「第2章 第2節 2. ATPase assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 ATPase buffer」と同様に調製した。

Solution A (2M HCl : 0.1 M Na₂MoO₄ = 4 : 3)

「第2章 第2節 2. ATPase assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 Solution A (2M HCl : 0.1 M Na₂MoO₄ = 4 : 3)」と同様に調製した。

Solution B [0.084% (w/v) Malachite Green in 1 % (w/v) polyvinyl alcohol solution]

「第2章 第2節 2. ATPase assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 Solution B [0.084% (w/v) Malachite Green in 1 % (w/v) polyvinyl alcohol solution]」と同様に調製した。

Solution C [7.8% (v/v) H₂SO₄]

「第2章 第2節 2. ATPase assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 Solution C [7.8% (v/v) H₂SO₄]」と同様に調製した。

5%(w/v) TCA

「第2章 第2節 2. ATPase assay を用いた ABCB1 とグアニジナルカロイドの相互作用評価 5%(w/v) TCA」と同様に調製した。

80 mM MgATP

「第2章 第2節 2. ATPase assay を用いた ABCB1 とグアニジナルカロイドの相互作用評価 80 mM MgATP」と同様に調製した。

4 mM MgATP

「第2章 第2節 2. ATPase assay を用いた ABCB1 とグアニジナルカロイドの相互作用評価 4 mM MgATP」と同様に調製した。

200 mM NaH₂PO₄

「第2章 第2節 2. ATPase assay を用いた ABCB1 とグアニジナルカロイドの相互作用評価 200 mM NaH₂PO₄」と同様に調製した。

1 mM NaH₂PO₄

「第2章 第2節 2. ATPase assay を用いた ABCB1 とグアニジナルカロイドの相互作用評価 1 mM NaH₂PO₄」と同様に調製した。

無機リン酸標準溶液

「第2章 第2節 2. ATPase assay を用いた ABCB1 とグアニジナルカロイドの相互作用評価 無機リン酸標準溶液」と同様に調製した。

Membrane vesicle 溶液

「第2章 第2節 2. ATPase assay を用いた ABCB1 とグアニジナルカロイドの相互作用評価 Membrane vesicle 溶液」と同様に調製した。

遊離リン酸定量用の検量線作製

「第2章 第2節 2. ATPase assay を用いた ABCB1 とグアニジナルカロイドの相互作用評価 遊離リン酸定量用の検量線作製」と同様に作製した。

ATPase assay 用の Test sample solution

Assay 系における DMSO の濃度が 1%になるように 1 μ l の Verapamil (4 mM)、Epimagnolin A (4 mM)、Fargesin (4 mM)、Kobsin (4 mM)、および溶媒である DMSO それぞれを ATPase Buffer (99 μ l)と混合し、ATPase Assay 用の Test sample solution とし

た。

ATPase assay

「第2章 第2節 2. ATPase assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 ATPase assay」と同様に実施した。

[結果]

ATPase assay を用いた ABCB1 と辛夷リグナンの相互作用解析

ABCB1 を過剰発現させた昆虫細胞 Sf-9 から調製した膜画分を Verapamil (10 μ M)あるいは Epimagnolin A (10 μ M)、Fargesin (10 μ M)と混合し、単位時間あたりに ATP から生じる無機リン酸を定量して、ABCB1 との相互作用を評価した。その結果、Epimagnolin A 添加群において、Verapamil 添加群の 60%程度の ATP の分解が認められた (Fig. 2-3-3)。一方、Fargesin 添加群で認められた ATP の分解量は、Verapamil 添加群と比して 30%以下であった (Fig. 2-3-3)。なお、ATP の分解量は、Verapamil > Epimagnolin A > Fargesin の順に多かった (Fig.2-3-4)。また、Verapamil と Epimagnolin A については、Hanes-Woolf plot から K_m 値 (Verapamil, 12.3 μ M; Epimagnolin A, 4.29 μ M)と V_{max} 値 (Verapamil, 109 μ M; Epimagnolin A, 156 μ M)が算出された (Fig. 2-3-4)。

[考察]

ATPase assay を用いた ABCB1 と辛夷リグナンの相互作用解析

生体膜を隔てて基質を輸送する ABC 輸送体は、ATP を加水分解して、その駆動力を獲得する (Fig. 1-4-3)。つまり、ABCB1 と ATP、試験化合物を混合した際に生じる無機リン酸を定量することによって、試験化合物が ABCB1 の基質である可能性を評価することができる。

ABCB1 と辛夷リグナンの相互作用を評価するために ATPase assay を行った結果、辛夷リグナンの存在下において ATP が分解され、無機リン酸が生じることが見出された (Fig. 2-3-3)。Calcein assay の結果と合わせると、Epimagnolin A と Fargesin は、ABCB1 の基質であると考えられる。また、Fargesin についても、濃度依存的な ATPase 活性の上昇が認められたため、ABCB1 の基質であると考えられる。実験を行った条件下において K_m 値と V_{max} 値を算出することが出来なかった。一方、算出された V_{max} 値に基づくと、単位時間あたりに ABCB1 によって輸送される化合物の量は、Epimagnolin A > Verapamil の順に多いと考えられる。さらに、得られた K_m 値に基づくと、ABCB1 との複合体の形成は、Verapamil > Epimagnolin A の順に起こりやすいと考えられる。Epimagnolin A と Fargesin の構造の違いに基づくと、Fargesin におけるベンゾジオキソール構造がトリメトキシフェニル構造に置換されることによって ABCB1 にたいする親和性が高くなると考えられる。

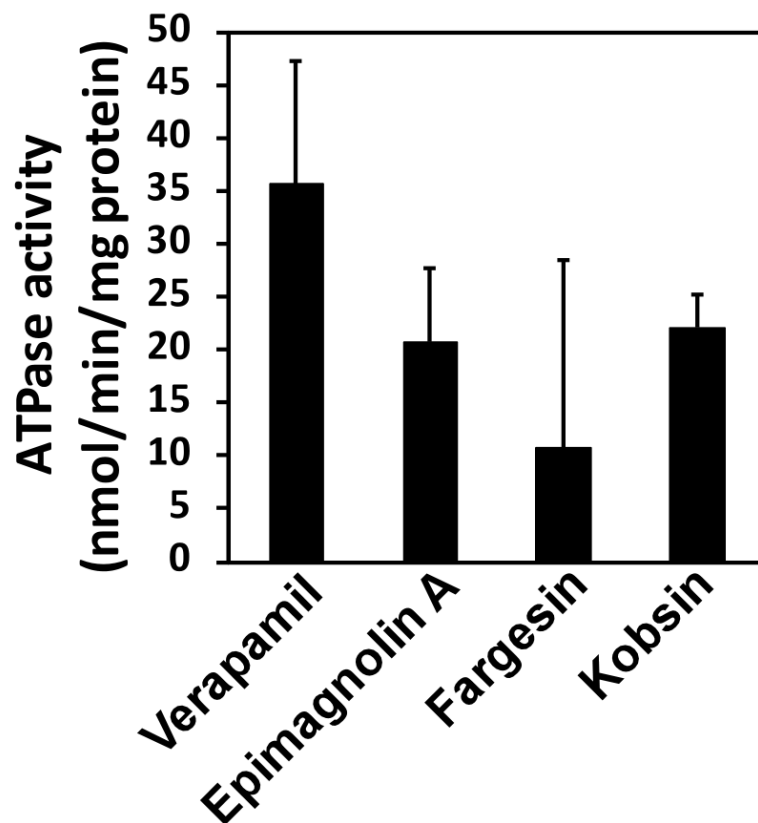


Fig. 2-3-3 ABCB1 膜画分にたいする Epimagnolin A および Fargesin、Kobsin の ATPase Assay による ABCB1 発現膜画分の ATPase 活性

化合物濃度はそれぞれ Verapamil (10 μ M)、Epimagnolin A (10 μ M)、Farugesin (10 μ M)、Kobsin (10 μ M)である。縦軸, 1 分あたりに 1 mg のタンパク質が分解し生じる遊離リン酸の物質質量。

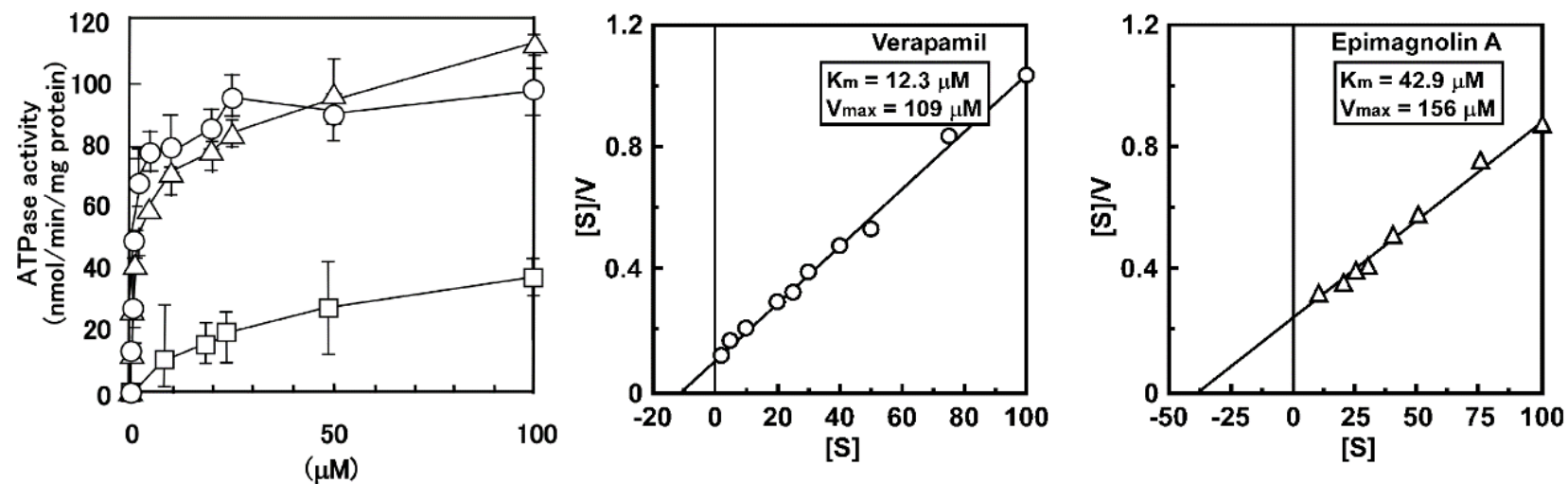


Fig. 2-3-4 ABCB1 膜画分にたいする Epimagnolin A および Fargesin の ATPase Assay による ABCB1 発現膜画分の ATPase 活性
 化合物濃度は○, Verapamil (10 μM) 、△, Epimagnolin A (10 μM)、□, Fargesin (10 μM)、で実施し、縦軸は 1 mg protein の Membrane vesicle が 1 分間に ATP を分解して生じた遊離リン酸の物質(nmol)を ATPase 活性として算出した。有意性の統計解析は、One-way ANOVA および Tukey Kramer 法を用いて行った(*、Mock 群と比較して P < 0.05)。

3. MTT assay を用いた ABCB1 と辛夷リグナンの相互作用評価

[材料および方法]

試薬

「第 2 章 第 2 節 3. MTTase assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 試薬」と同一の試薬を使用した。

細胞

「第 2 章 第 2 節 3. MTTase assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 細胞」と同一の細胞を使用した。

PBS(-)の調製

「第 2 章 第 2 節 3. MTTase assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 PBS(-)の調製」と同様の操作で調製した。

200 mM L-Glutamine の調製

「第 2 章 第 2 節 3. MTTase assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 200 mM L-Glutamine の調製」と同様の操作で調製した。

血清の非働化

「第 2 章 第 2 節 3. MTTase assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 血清の非働化」と同様の操作で調製した。

細胞培養用 DMEM の調製

「第 2 章 第 2 節 3. MTTase assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 細胞培養用 DMEM の調製」と同様の操作で調製した。

1M EDTA 水溶液の調製

「第 2 章 第 2 節 3. MTTase assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 1M EDTA 水溶液の調製」と同様の操作で調製した。

0.25%(w/v)Trypsin-1 mM EDTA 溶液の調製

「第 2 章 第 2 節 3. MTTase assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 0.25%(w/v)Trypsin-1 mM EDTA 溶液の調製」と同様の操作で調製した。

細胞の培養および継代

「第2章 第2節 3. MTTase assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 細胞の培養および継代」と同様の操作で実施した。

50 mg/ml MTT 溶液

「第2章 第2節 3. MTTase assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 50 mg/ml MTT 溶液」と同様の操作で調製した。

20% SDS 溶液

「第2章 第2節 3. MTTase assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 20% SDS 溶液」と同様の操作で調製した。

MTT assay

「第2章 第2節 3. MTTase assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 MTT assay」と同様の操作で実施した。ただし、第3節では、Epimagnolin A (0, 10 μ M) 存在下で Flp-In-293/Mock 細胞および Flp-In-293/ABCB1 細胞の抗がん剤 Daunorubicin、Doxorubicin、Vanblastine、Vincristine 感受性も評価した。なお、Epimagnolin A、Daunorubicin、Doxorubicin、Vanblastine、Vincristine は、それぞれ 100 μ M、1 μ M、1 μ M、100 nM、100 nM を試験開始濃度とした。

[結果]

MTT Assay を用いた ABCB1 発現細胞にたいする辛夷リグナンの影響の評価

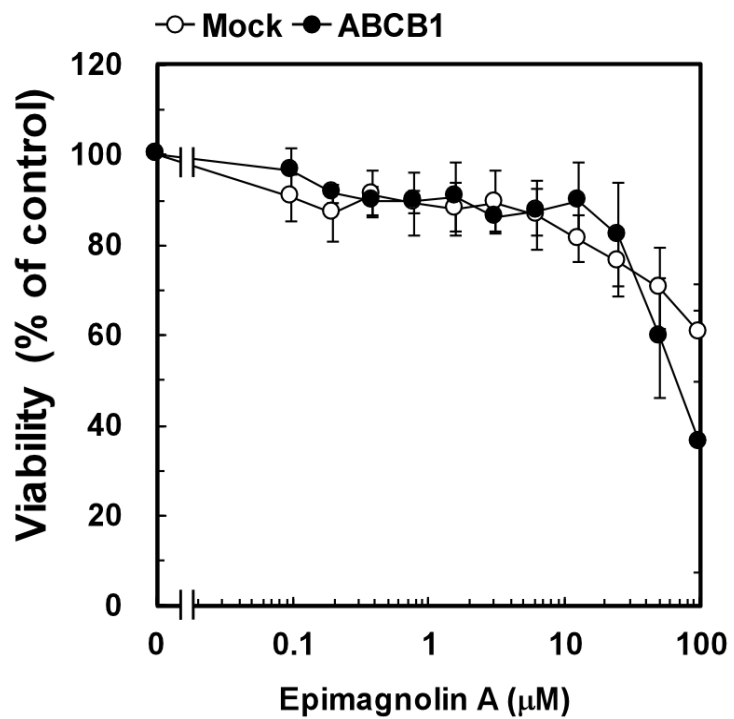
Flp-In-293/Mock 細胞および Flp-In-293/ABCB1 細胞を Epimagnolin A 存在下で培養し、細胞増殖にたいする Epimagnolin A の影響を評価した。その結果、50 μ M と 100 μ M の Epimagnolin A 存在下において Flp-In-293/Mock 細胞および Flp-In-293/ABCB1 細胞の生存率が低下する傾向が認められた (Fig. 2-3-5)。なお、Flp-In-293/Mock 細胞および Flp-In-293/ABCB1 細胞の Epimagnolin A 感受性には顕著な差は認められなかった。一方、Flp-In-293/Mock 細胞および Flp-In-293/ABCB1 細胞の増殖にたいする Daunorubicin、Doxorubicin、Vinblastine、Vincristine の影響を細胞毒性が認められない濃度の Epimagnolin A (10 μ M) 存在下で評価した結果、Flp-In-293/ABCB1 細胞群において 10 μ M Epimagnolin A の添加に依存して Flp-In-293/ABCB1 細胞が示す生存曲線が低濃度側にシフトした (Fig. 2-3-6, 2-3-7, Tab. 2-3-1)。

[考察]

MTT Assay を用いた ABCB1 発現細胞にたいする辛夷リグナンの影響の評価

細胞増殖にたいする Epimagnolin A の影響を評価した結果、顕著な細胞毒性が認められず、Flp-In-293/Mock 細胞および Flp-In-293/ABCB1 細胞の Epimagnolin A 感受性に差は

認められなかった。この結果は、Epimagnolin A が ABCB1 の基質ではない可能性を示唆する。一方、Calcein assay および ATPase assay の結果は、Epimagnolin A が ABCB1 の基質である可能性を示唆している。また、ABCB1 の基質である抗がん剤 Daunorubicin、Doxorubicin、Vinblastine、Vincristine[132–134]にたいする Flp-In-293/ABCB1 細胞の感受性が 10 μ M Epimagnolin A の添加によって高まり、Flp-In-293/Mock 細胞の感受性が 10 μ M Epimagnolin A の添加によって変化しなかったことは、Epimagnolin A が ABCB1 にたいして Daunorubicin、Doxorubicin、Vinblastine、Vincristine と拮抗し、Flp-In-293/ABCB1 細胞から Daunorubicin、Doxorubicin、Vinblastine、Vincristine が排出され難くなっている可能性を示唆している。したがって、Epimagnolin A は、ABCB1 の基質であると考えられる。また、Flp-In-293/Mock 細胞および Flp-In-293/ABCB1 細胞の Epimagnolin A 感受性に差が認められなかった原因は、50 μ M と 100 μ M の Epimagnolin A が非特異的に Flp-In-293/Mock 細胞および Flp-In-293/ABCB1 細胞の生存率を低下させたためであると考えられる。例えば、50 μ M と 100 μ M の Epimagnolin A が培養環境に影響を及ぼし、間接的に Flp-In-293/Mock 細胞および Flp-In-293/ABCB1 細胞の生存率を低下させているとすれば、ABCB1 の存在は細胞の Epimagnolin A 感受性に影響を及ぼさないであろう。



2-3-5 MTT Assay による ABCB1 と Epimagnolin A との相互作用の評価

○, Flp-In-293/Mock 細胞; ●, Flp-In-293/ABCB1 細胞。縦軸, 薬剤非存在下で培養した細胞の生存率を 100%とした場合の細胞生存率; 横軸, 化合物の濃度。

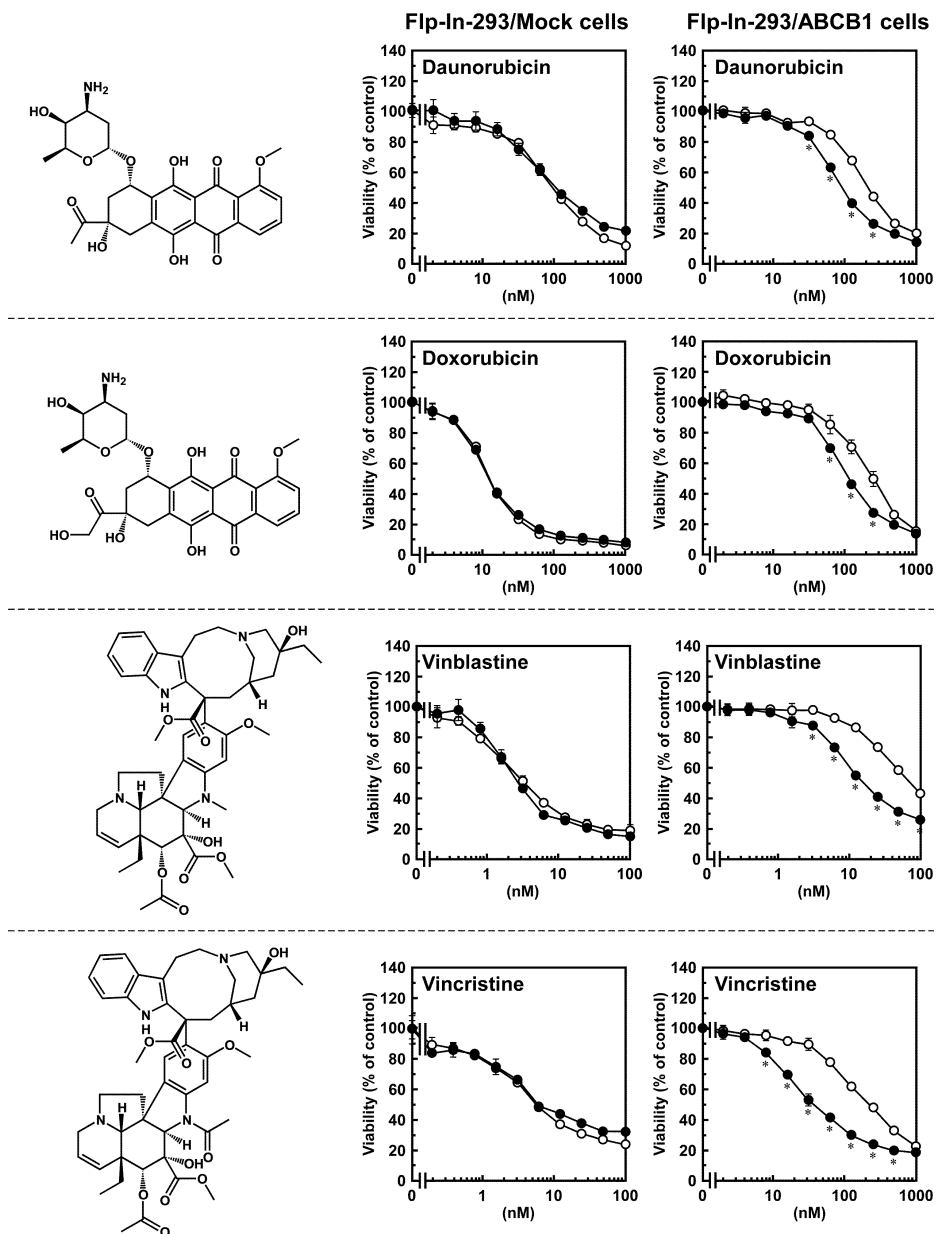


Fig. 5 Y. Mitani et al.

2-3-6 MTT assay による ABCB1 と Epimagnolin A と抗がん剤との併用処理の相互作用の評価

左、化合物の構造、右、○, DMSO、●, Epimagnolin A (10 μ M)、縦軸、細胞生存率、横軸、抗がん剤濃度。

Tab. 2-3-1 ABCB1 の基質である抗がん剤と Epimagnolin A を併用処理した際の IC₅₀ 値

Compound (nM)	IC ₅₀			
	Mock		ABCB1	
	DMSO	Epimagnolin A	DMSO	Epimagnolin A
Daunorubicin	12.56±2.30	12.34±1.73	242.76±47.26	115.43±17.24 *
Doxorubicin	14.28±2.85	17.91±2.97	287.63±36.29	116.92±3.57 *
Vinblastine	3.54±0.30	2.54±0.27	75.07±10.25	20.45±3.63 *
Vincristine	4.99±1.47	5.49±2.12	308.94±37.12	38.53±5.19 *

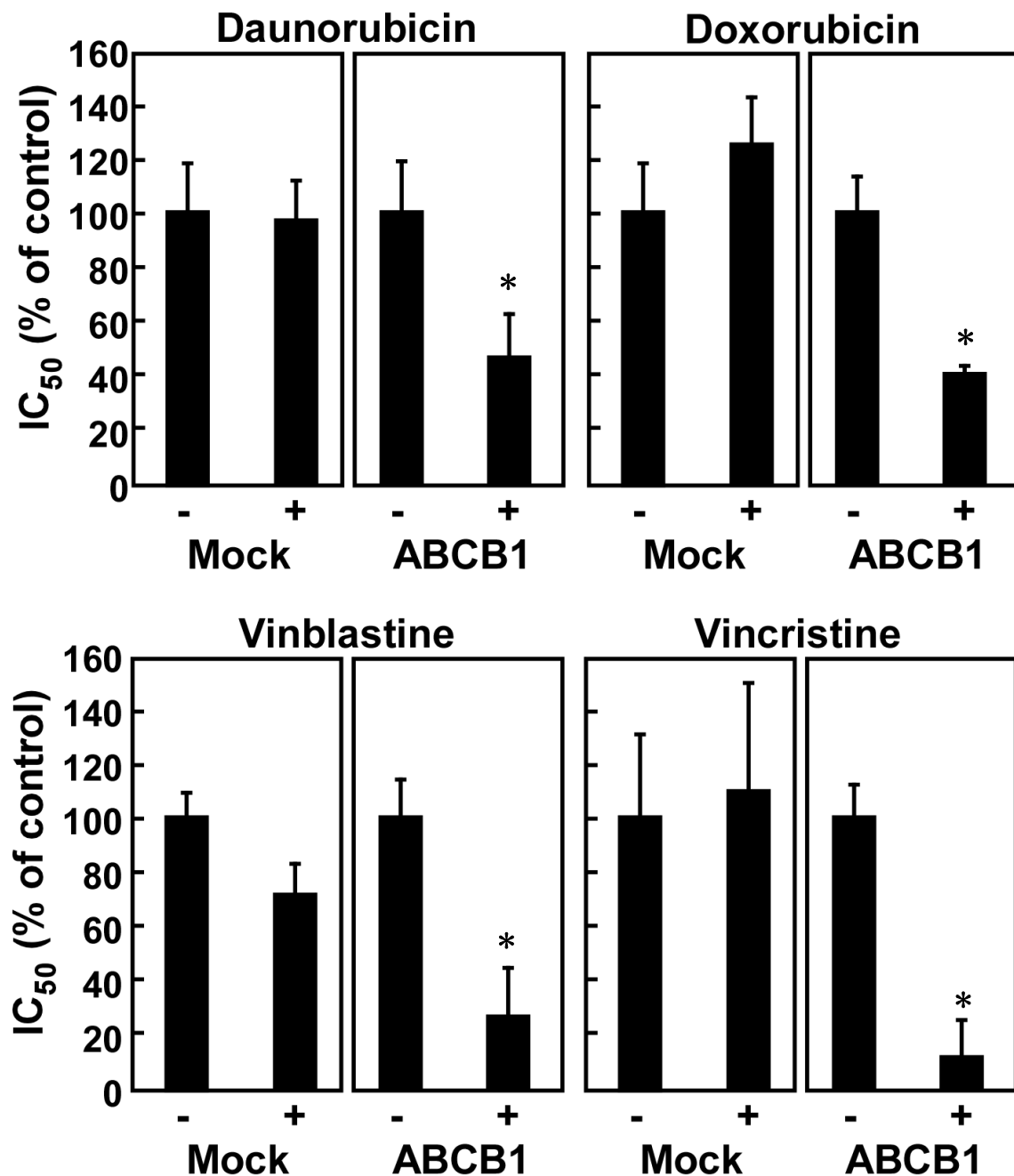


Fig. 2-3-7 ABCB1 の基質である抗がん剤と Epimagnolin A の併用処理による IC₅₀ 値の比率

Flp-In-293/Mock 細胞および Flp-In-293/ABCB1 細胞にたいする基質である抗がん剤と Epimagnolin A 添加における影響を細胞生存率として評価した。

縦軸は化合物の溶解に用いた DMSO 添加群(Control)を 100 とした時に Epimagnolin A 添加群の比率。 - は DMSO 添加群、+ は 10 μM Epimagnolin A 有意性の統計解析は、One-way ANOVA および Tukey Kramer 法を用いて行った(*、DMSO 添加群と比較して P < 0.05)。

第 4 節 ABCB1 と胡麻リグナンとの相互作用解析

[背景と目的]

ABC 輸送体を介した薬剤耐性機構を理解することは、「がん」の克服に不可欠である。本研究の題材である ABCB1 は、「がん」に薬剤耐性を付与する代表的な ABC 輸送体であり、抗がん剤を中心として、これまでに多くの薬物が ABCB1 の基質として報告されてきた。そして、本研究では、今日使用されている薬物のリード化合物を多数提供してきた天然物に注目し、第 2 節において、南米原産植物 *Pterogyne Nitens* (Fig. 2-2-2) に含まれるグアニジンアルカロイド (Fig. 2-2-3) が ABCB1 と相互作用することを示した[123,131]。そして、第 3 節において、生薬「辛夷」に含まれるリグナン (Fig. 2-3-1) が ABCB1 と相互作用することを示した[69]。

我々が利用している薬は、大きく「西洋薬」と「漢方薬」に分類することができ、西洋薬が単一成分の薬剤であるのに対し、漢方薬は多成分系の薬剤である。一つの症状に対して的を絞り、有効成分を抽出し、有効性と共に安全性を評価しながら使用に至る西洋薬に対し、1000 年以上に渡って積み重ねられた経験に基づいて使用されているのが漢方薬である。このため、漢方薬の有効性や体内動態は、西洋薬ほど科学的に理解されていない。そこで、本研究では、第 3 節において研究対象にした辛夷リグナンと Sesamin に代表される胡麻リグナンの構造が類似している点に注目した。そして、胡麻リグナン 13 種 (Fig. 2-4-1) を研究題材として選定した。

化合物を用いて ABCB1 の機能を評価する方法として、①構造が異なる化合物を対象にして ABCB1 との親和性を試験し、ABCB1 との親和性が高い構造および化学的特性を理解する方法、と②ABCB1 の基質として報告されている化合物と構造が似ている化合物・類縁体を対象にして ABCB1 との親和性を試験し、ABCB1 との親和性が高い部分構造および化学的特性を理解する方法、がある。第 4 節では、胡麻に含まれるリグナン 13 種を用いて ABCB1 との相互作用を評価し、ABCB1 の機能を分子レベルで理解することを目指した。実際には、ABCB1 発現細胞を用いた「Calcein assay」および「MTT assay」、ABCB1 含有膜画分を用いた「ATP Assay」を実施した。

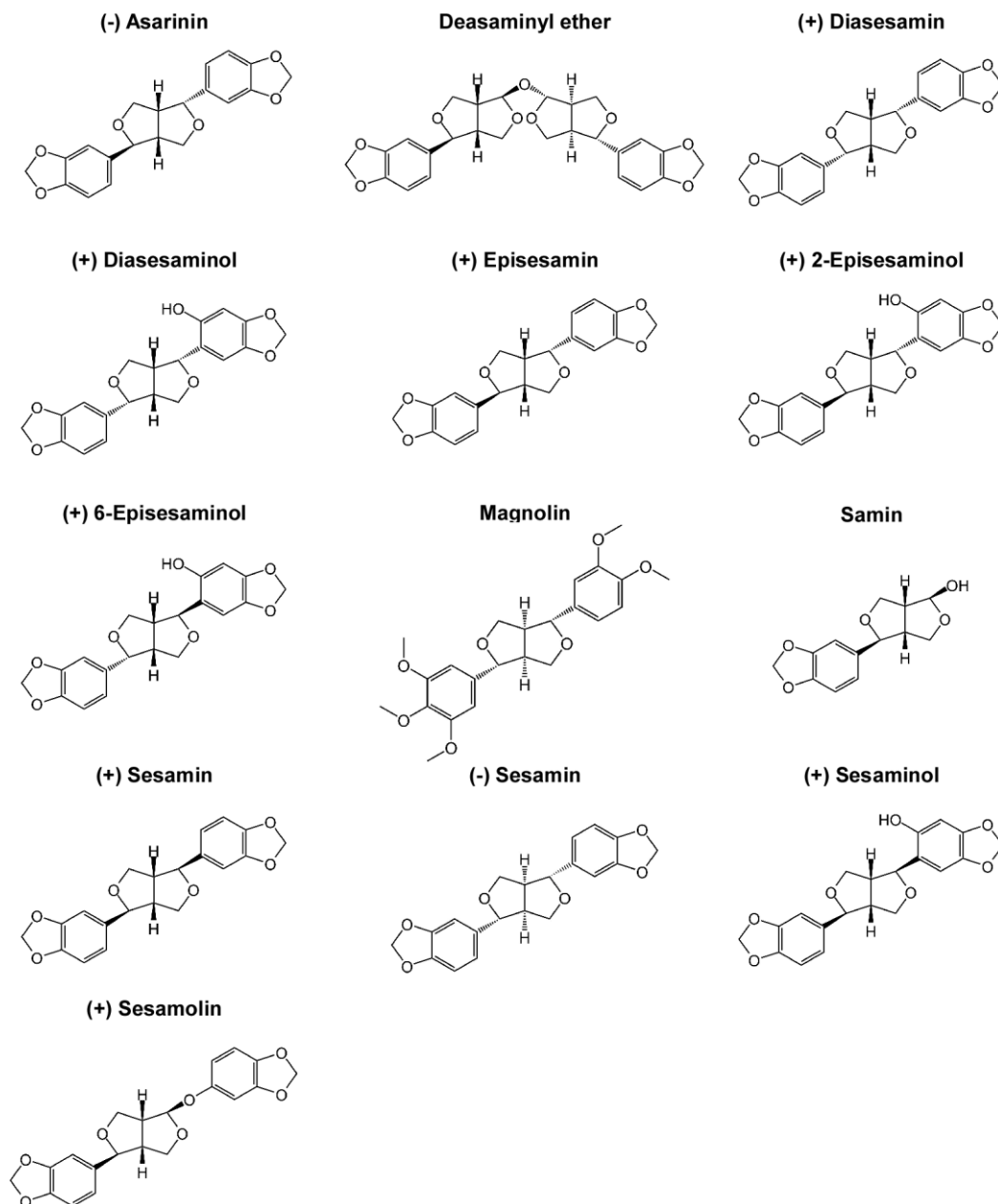


Fig. 2-4-1 13 種の胡麻リグナンの構造

(-)Asarinin、Diasaminyl ether、(+)Diasesamin、(+)Diasesaminol、(+)Episesamin、(+)2-Episesaminol、(+)6-Episesaminol、Magnolin、Samin、(+)Sesamin、(-)Sesamin、(+)Sesaminol、(+)Sesamolin の構造

1. Calcein Assay を用いた ABCB1 と胡麻リグナンの相互作用評価

[材料と方法]

試薬

「第2章 第2節 1. Calcein assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 試薬」と同一の試薬を用いた。

試験試薬である胡麻リグナンについては、「長良サイエンス株式会社」より購入した。

細胞

「第2章 第3節 1. ABCB1 と辛夷リグナンの相互作用評価 細胞」と同一の細胞を用いた。

PBS(-)の調製

「第2章 第2節 1. Calcein assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 PBS(-)の調製」と同様に調製した。

200 mM L-Glutamine の調製

「第2章 第2節 1. Calcein assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 200 mM L-Glutamine の調製」と同様に調製した。

血清の非働化

「第2章 第2節 1. Calcein assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 血清の非働化」と同様に調製した。

細胞培養用 DMEM の調製

「第2章 第2節 1. Calcein assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 血清の非働化」と同様に調製した。

1 M EDTA 水溶液の調製

「第2章 第2節 1. Calcein assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 1 M EDTA 水溶液の調製」と同様に調製した。

0.25%(w/v)Trypsin-1 mM EDTA 溶液の調製

「第2章 第2節 1. Calcein assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 0.25%(w/v)Trypsin-1 mM EDTA 溶液の調製」と同様に調製した。

細胞の培養および継代

「第2章 第2節 1. Calcein assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 細胞の培養および継代」と同様に実施した。

1 mM Calcein-AM

「第2章 第2節 1. Calcein assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 1 mM Calcein-AM」と同様に調製した。

0.25% Trypan Blue 溶液

「第2章 第2節 1. Calcein assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 0.25% Trypan Blue 溶液」と同様に調製した。

Calcein assay

「第2章 第2節 1. Calcein assay を用いた ABCB1 と辛夷リグナンの相互作用評価 Calcein assay」と同様に実施した。なお、dish には、終濃度が 10 μ M および 50 μ M になるように 10 mM の(-)Asarinin、Diasaminyl ether、(+)-Diasamin、(+)-Episesamin、(+)-2-Episesaminol、(+)-6-Episesaminol、Magnolin、Samin、(+)-Sesamin、(-)-Sesamin、(+)-Sesaminol、(+)-Sesaminol をそれぞれ 2 μ l および 10 μ l 添加した。一方、コントロール群には、試験化合物の溶解に用いた DMSO (2 μ l) を添加した。また、終濃度が 10 μ M になるように 10 mM Verapamil を添加した群と終濃度が 10 μ M および 50 μ M になるように 10 mM Epimagnolin A を 2 μ l 添加した群も用意した。

[結果]

Calcein assay を用いた ABCB1 と胡麻リグナンの相互作用評価

Calcein assay では、Flp-In-293/ABCB1 細胞を 10 μ M および 50 μ M の試験化合物あるいは DMSO (溶媒) 存在下で培養し、ABCB1 による Calcein 輸送にたいする影響を評価した。その結果、40 μ M の試験化合物存在下では、DMSO (溶媒) 存在下と比して calcein に由来する蛍光が強く観察される細胞が多く認められた (Fig. 2-4-2)。一方、10 μ M の試験化合物存在下では、Epimagnolin A あるいは(+)-Sesaminol 存在下以外において、DMSO (溶媒) 存在下と比して calcein に由来する蛍光が強く観察される細胞が多く認められた (Fig. 2-4-2)。なお、観察された calcein に由来する蛍光の強度は、Verapamil > 胡麻リグナン > DMSO であった。

[考察]

Calcein assay を用いた ABCB1 と胡麻リグナンの相互作用評価

疎水性であり非蛍光の Calcein-AM は、細胞が生存している培養液中に添加すると、細胞膜を自由に通過して細胞内に移行する。そして、細胞内に移行した Calcein-AM は、細胞

内に存在する **Esterase** によってエステル結合の切断を受け、490 nm～515 nm の励起光の存在下で蛍光を発する **Calcein** へと変換される。一方、**Calcein** は親水性であるため膜不透過性であり、細胞が生存して細胞内と細胞外が細胞膜によって厳密に区分されている場合には細胞内に蓄積する。このような特性が注目され、**Calcein-AM** は、細胞の生死判定に用いられてきた[115,128]。一方、**ABCB1** が **Calcein-AM** および **Calcein** を基質として認識することが見出されて以降は[127]、**ABCB1** の機能解析にも **Calcein-AM** が使用されている。

ABCB1 と胡麻リグナンの相互作用を評価するために **Calcein assay** を行った結果、試験した化合物全てが **ABCB1** による **Calcein** の輸送を阻害することが見出された。この結果は、胡麻リグナンが **ABCB1** の阻害剤あるいは基質であることを示唆する。

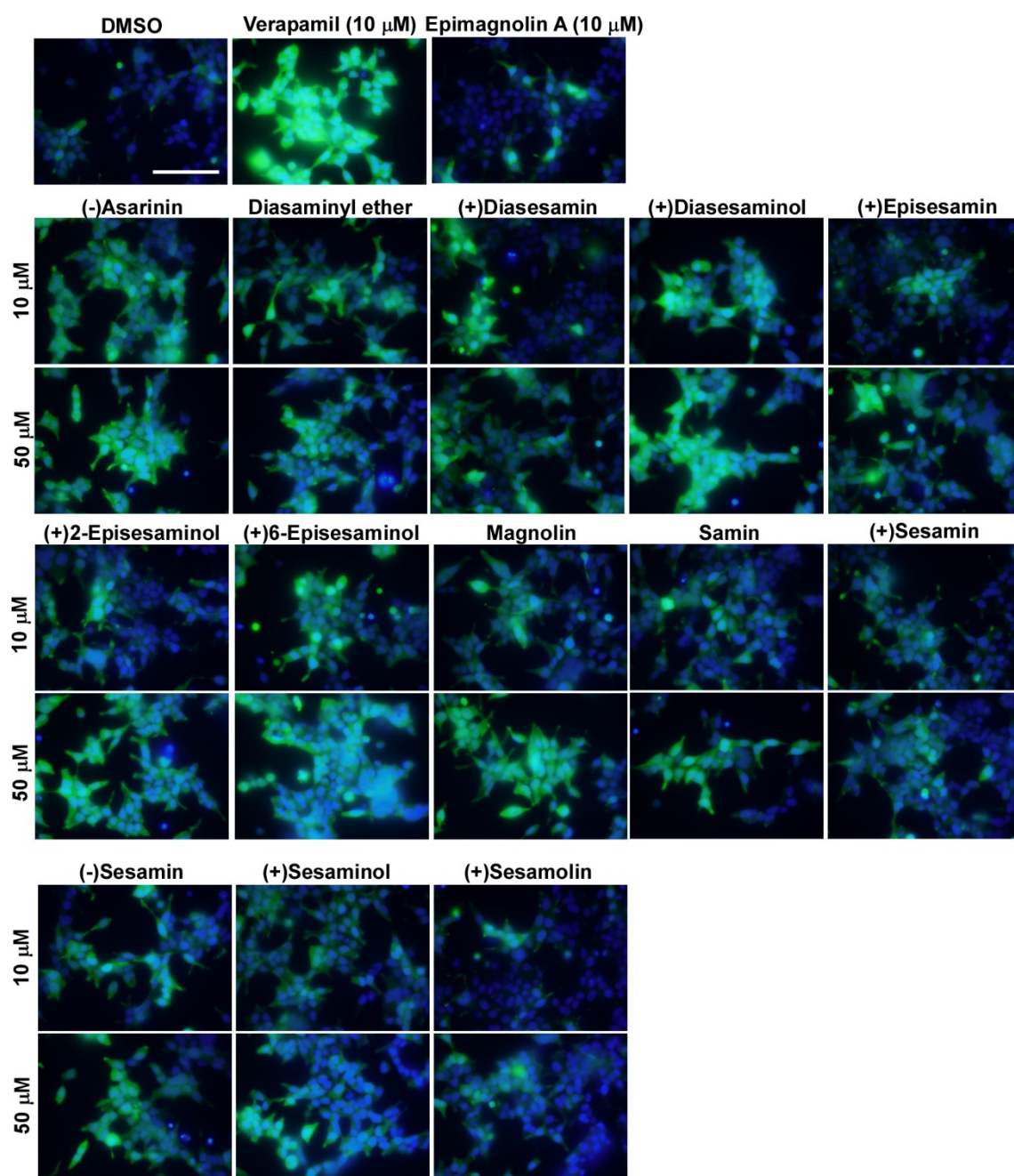


Fig. 2-4-2 Calcein Assay における Sesamin および Sesamin 類縁体添加時の Flp-In-293 細胞

化合物濃度はそれぞれ 10 μ M(上段)および 50 μ M(下段)で添加した。Calcein 由来(緑色)および Nuc Blue Live cell stain 由来(青色)の蛍光を撮影したものを比較明合成したものである。スケールバーは 100 μ m である。

2. ATPase assay を用いた ABCB1 と胡麻リグナンの相互作用評価

[材料と方法]

試薬

「第2章 第2節 2. ATPase assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 試薬」と同一の試薬を使用した。

試験試薬である胡麻リグナンについては、「長良サイエンス株式会社」より購入した。

50 mM Tris

「第2章 第2節 2. ATPase assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 50 mM Tris」と同様に調製した。

50 mM MES

「第2章 第2節 2. ATPase assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 50 mM MES」と同様に調製した。

50 mM Tris-MES

「第2章 第2節 2. ATPase assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 50 mM Tris-MES」と同様に調製した。

ATPase buffer

「第2章 第2節 2. ATPase assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 ATPase buffer」と同様に調製した。

Solution A (2M HCl : 0.1 M Na₂MoO₄ = 4 : 3)

「第2章 第2節 2. ATPase assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 Solution A (2M HCl : 0.1 M Na₂MoO₄ = 4 : 3)」と同様に調製した。

Solution B [0.084% (w/v) Malachite Green in 1 % (w/v) polyvinyl alcohol solution]

「第2章 第2節 2. ATPase assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 Solution B [0.084% (w/v) Malachite Green in 1 % (w/v) polyvinyl alcohol solution]」と同様に調製した。

Solution C [7.8% (v/v) H₂SO₄]

「第2章 第2節 2. ATPase assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 Solution C [7.8% (v/v) H₂SO₄]」と同様に調製した。

5%(w/v) TCA

「第2章 第2節 2. ATPase assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 5%(w/v) TCA」と同様に調製した。

80 mM MgATP

「第2章 第2節 2. ATPase assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 80 mM MgATP」と同様に調製した。

4 mM MgATP

「第2章 第2節 2. ATPase assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 4 mM MgATP」と同様に調製した。

200 mM NaH₂PO₄

「第2章 第2節 2. ATPase assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 200 mM NaH₂PO₄」と同様に調製した。

1 mM NaH₂PO₄

「第2章 第2節 2. ATPase assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 1 mM NaH₂PO₄」と同様に調製した。

無機リン酸標準溶液

「第2章 第2節 2. ATPase assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 無機リン酸標準溶液」と同様に調製した。

Membrane vesicle 溶液

「第2章 第2節 2. ATPase assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 Membrane vesicle 溶液」と同様に調製した。

遊離リン酸定量用の検量線作製

「第2章 第2節 2. ATPase assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 遊離リン酸定量用の検量線作製」と同様に作製した。

ATPase Assay 用の Test sample solution

Assay 系における DMSO の濃度が 1%になるように 1 µl の Verapamil (4 mM)、(-) Asarinin (4 mM)、Diasaminyl ether (4 mM)、(+) Diasesamin (4 mM)、Epimagnolin A (4

mM)、(+ Episesamin (4 mM)、(+ 2-Episesaminol (4 mM)、(+ 6-Episesaminol (4 mM)、Magnolin (4 mM)、Samin (4 mM)、(+ Sesamin (4 mM)、(-) Sesamin (4 mM)、(+ Sesaminol (4 mM)、あるいは(+ Sesamolol (4 mM)、および溶媒である DMSO それぞれを ATPase Buffer (99 μ l)と混合し、ATPase Assay 用の Test sample solution とした。

ATPase assay

「第2章 第2節 2. ATPase assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 ATPase assay」と同様に実施した。

[結果]

ATPase assay を用いた ABCB1 と胡麻リグナンの相互作用評価

ABCB1 を過剰発現させた昆虫細胞 Sf-9 から調製した膜画分を Verapamil (10 μ M)あるいは 10 μ M の(-)Asarinin、Diasaminyl ether、(+Diasesamin、(+Diasesaminol、Epimagnolin A、(+Episesamin、(+2-Episesaminol、(+6-Episesaminol、Magnolin、Samin、(+Sesamin、(-)Sesamin、(+Sesaminol、(+Sesamolol と混合し、単位時間あたりに ATP から生じる無機リン酸を定量して ABCB1 との相互作用を評価した。その結果、胡麻リグナン添加群全てにおいて ATP の分解が認められた (Fig. 2-4-3)。なお、(+2-Episesaminol、(+6-Episesaminol、Magnolin、(+Sesamolol 添加群においては、Verapamil 添加群の 60%程度の ATP の分解が認められ、(-)Asarinin、(+Diasesamin、(+Diasesaminol、(+Episesamin、Samin、(+Sesamin、(-)Sesamin 添加群においては、Verapamil 添加群の 30%以下の ATP の分解が認められた (Fig. 2-4-3)。

[考察]

ATPase assay を用いた ABCB1 と胡麻リグナン類縁体の相互作用評価

生体膜を隔てて基質を輸送する ABC 輸送体は、ATP を加水分解して、その駆動力を獲得する (Fig. 1-4-3)。つまり、ABCB1 と ATP、試験化合物を混合した際に生じる無機リン酸を定量することによって、試験化合物が ABCB1 の基質である可能性を評価することができる。

ABCB1 と胡麻リグナンの相互作用を評価するために ATPase assay を行った結果、胡麻リグナンの存在下において ATP が分解され、無機リン酸が生じることが見出された (Fig. 2-4-3)。Calcein assay の結果と合わせると、辛夷リグナンと同様に胡麻リグナンも ABCB1 の基質であると考えられる。化合物の量の都合上、本研究では胡麻リグナンの濃度依存的な ATP の分解量を評価することが出来なかった。したがって、本研究において、試験化合物間における最大反応速度および ABCB1 との複合体形成については、比較を行えない。しかしながら、ベンゾジオキソール構造を分子内に 2 つ有する化合物間において ATP の分解量に差が認められたことから、furo[3,4-c]furan 構造が形成する面にたいするベンゾ

ジオキソール構造の立体が胡麻リグナンと ABCB1 との相互作用に影響を及ぼしていることが示唆された。ATP の分解量が Verapamil 添加群の 60%程度であった群[(+)-2-Episesaminol、(+)-6-Episesaminol、(+)-Sesamolin]と 30%以下であった群[(-)-Asarinin、(+)-Diasesamin、(+)-Diasesaminol、(+)-Episesamin、(+)-Sesamin、(-)-Sesamin]の構造を比較すると、furo[3,4-c]furan 構造が形成する面にたいして 2 つのベンゾジオキソール構造が同じ側にある場合には ABCB1 と相互作用し難くなると思われる。一方、furo[3,4-c]furan 構造とベンゾジオキソール構造が(+)-2-Episesaminol、(+)-6-Episesaminol、(+)-Sesamolin のような位置関係にある場合には、ABCB1 と相互作用しやすくなると思われる。

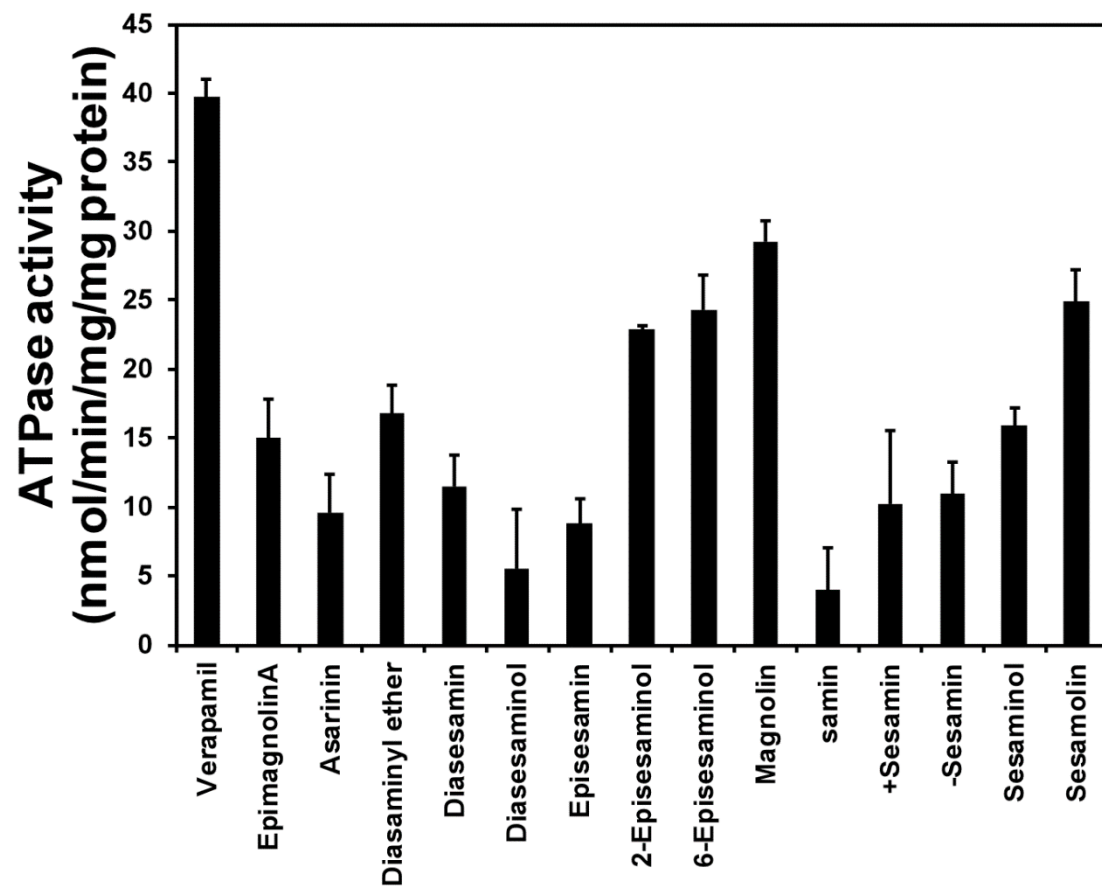


Fig. 2-4-3 ABCB1 膜画分にたいする Sesamin および Sesamin 類縁体の ATPase Assay における ABCB1 膜画分の ATPase 活性
 化合物濃度はそれぞれの化合物において 10 μ M で実施し、縦軸は 1 mg protein の Membrane vesicle が 1 分間に ATP を分解して生じた遊離リン酸の物質質量(nmol)を ATPase 活性として算出した。

3. MTT assay を用いた ABCB1 と胡麻リグナンの相互作用評価

[材料と方法]

試薬

「第 2 章 第 2 節 3. MTTase assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 試薬」と同一の試薬を利用し、胡麻リグナンについては、長良サイエンス株式会社より購入した。

細胞

「第 2 章 第 2 節 3. MTTase assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 細胞」と同一の細胞を使用した。

PBS(-)の調製

「第 2 章 第 2 節 3. MTTase assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 PBS(-)の調製」と同様の操作で調製した。

200 mM L-Glutamine の調製

「第 2 章 第 2 節 3. MTTase assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 200 mM L-Glutamine の調製」と同様の操作で調製した。

血清の非働化

「第 2 章 第 2 節 3. MTTase assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 血清の非働化」と同様の操作で調製した。

細胞培養用 DMEM の調製

「第 2 章 第 2 節 3. MTTase assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 細胞培養用 DMEM の調製」と同様の操作で調製した。

1M EDTA 水溶液の調製

「第 2 章 第 2 節 3. MTTase assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 1M EDTA 水溶液の調製」と同様の操作で調製した。

0.25%(w/v)Trypsin-1 mM EDTA 溶液の調製

「第 2 章 第 2 節 3. MTTase assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 0.25%(w/v)Trypsin-1 mM EDTA 溶液の調製」と同様の操作で調製した。

細胞の培養および継代

「第2章 第2節 3. MTTase assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 細胞の培養および継代」と同様の操作で実施した。

50 mg/ml MTT 溶液

「第2章 第2節 3. MTTase assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 50 mg/ml MTT 溶液」と同様の操作で調製した。

20% SDS 溶液

「第2章 第2節 3. MTTase assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 20% SDS 溶液」と同様の操作で調製した。

MTT assay

「第2章 第2節 3. MTTase assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 MTT assay」と同様の操作で実施した。

[結果]

MTT assay を用いた ABCB1 とリグナン類縁体の相互作用評価

Flp-In-293/Mock 細胞および Flp-In-293/ABCB1 細胞を胡麻リグナン存在下で培養し、細胞増殖にたいする胡麻リグナンの影響を評価した。その結果、10~100 μ Mの範囲において細胞毒性が認められた(Fig.2-4-4)。(+)Diasesamin と(+)Sesamolin 以外は、Flp-In-293/Mock 細胞と Flp-In-293/ABCB1 細胞との間で試験化合物にたいする感受性に違いが認められなかった。(+)Diasesamin については、Flp-In-293/ABCB1 細胞の方が Flp-In-293/Mock 細胞よりも強い感受性を示した。また、(+)Sesamolin については、Flp-In-293/Mock 細胞の方が Flp-In-293/ABCB1 細胞よりも強い感受性を示した。

[考察]

MTT assay を用いた ABCB1 とリグナン類縁体の相互作用評価

細胞増殖にたいする胡麻リグナンの影響を評価した結果、10~100 μ Mの範囲において細胞毒性細胞毒性が認められた。一方、(+)Diasesamin と(+)Sesamolin を除き、Flp-In-293/Mock 細胞および Flp-In-293/ABCB1 細胞との間で試験化合物にたいする感受性に差は認められなかった。この結果は、胡麻リグナンが ABCB1 の基質ではない可能性を示唆する。一方、Calcein assay および ATPase assay の結果は、胡麻リグナンが ABCB1 の基質である可能性を示唆している。ABCB1 の基質である抗がん剤 Daunorubicin、Doxorubicin、Vinblastine、Vincristine[132-134]にたいする Flp-In-293/ABCB1 細胞の感受性が胡麻リグナンの添加によって高まることを確認する必要があるが、Epimagnolin A を用いた試験結果(Fig. 2-3-4, 2-3-5, Tab. 2-3-1)から推測すると、本研究で使用した胡麻リグナンは、

ABCB1 の基質であると考えられる。(+)Sesamolin を除き、Flp-In-293/Mock 細胞および Flp-In-293/ABCB1 細胞の胡麻リグナン感受性に差が認められなかった原因は、Epimagnolin A 同様に(+)Sesamolin を除く胡麻リグナンが非特異的に Flp-In-293/Mock 細胞および Flp-In-293/ABCB1 細胞の生存率を低下させたためであると考えられる。例えば、胡麻リグナンが培養環境に影響を及ぼし、間接的に Flp-In-293/Mock 細胞および Flp-In-293/ABCB1 細胞の生存率を低下させているとすれば、ABCB1 の存在は細胞の Epimagnolin A 感受性に影響を及ぼさないであろう。Flp-In-293/Mock 細胞よりも Flp-In-293/ABCB1 細胞の方が(+)Diasesamin 感受性が高かったことは、この可能性を支持すると考えている。

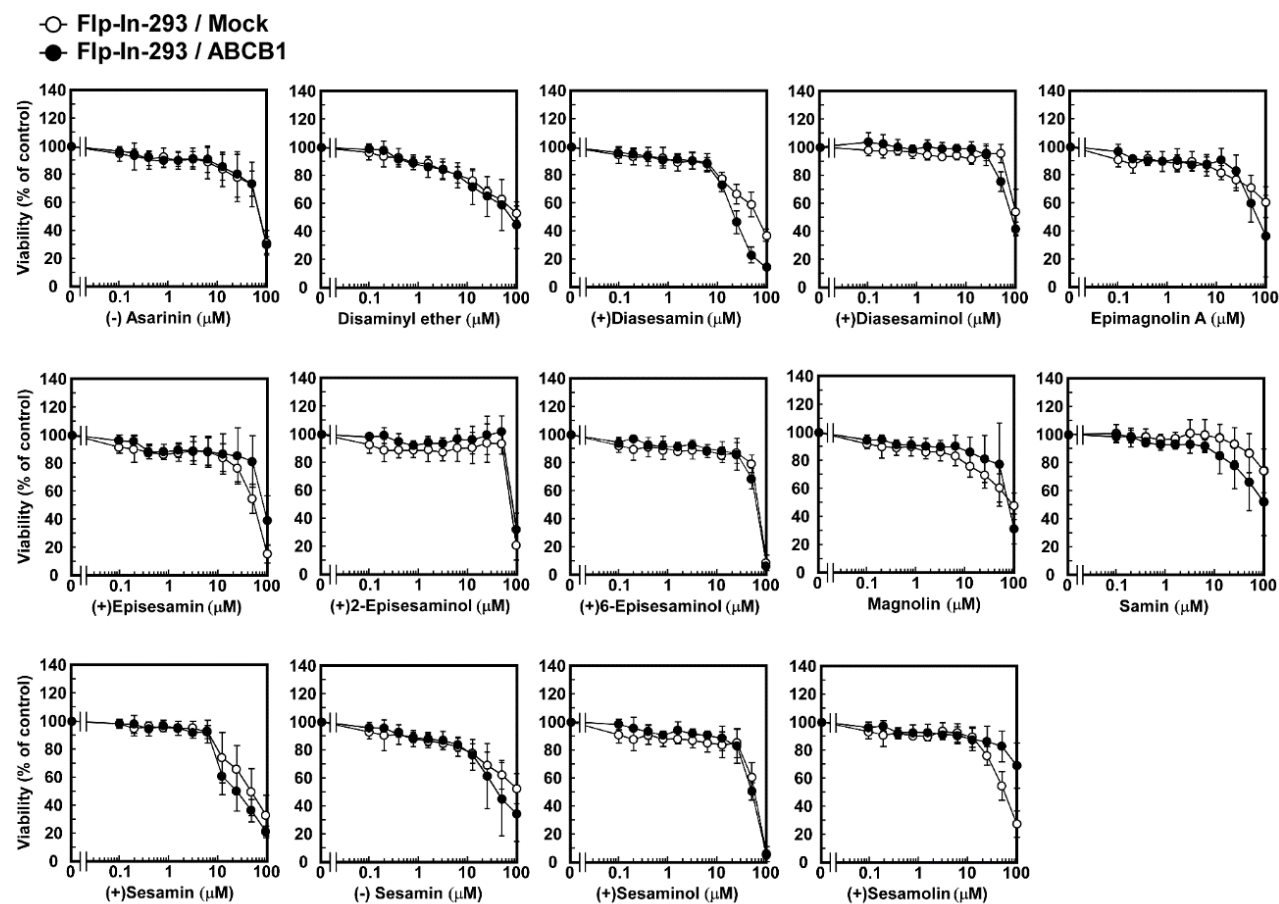


Fig. 2-4-4 MTT Assay における Sesamin および Sesamin 類縁体の Flp-In-293/Mock 細胞、Flp-In-293/ABCB1 細胞の細胞生存率

縦軸を細胞生存率として、横軸を化合物の濃度とした。また、白丸を Flp-In-293/Mock 細胞、黒丸を Flp-In-293/ABCB1 細胞の細胞生存率とした。

第5節 結言

ABC 輸送体の存在は、がんの克服を目指す人類にとって、大きな障壁の一つである。そのため、細胞に多剤耐性を与える ABC 輸送体 ABCB1 の基質認識機構と基質輸送機構は、その同定以来、精力的に研究されている。本研究では、ABCB1 が認識する化学構造に関する理解を深め、ABCB1 による基質認識に重要なアミノ酸残基を明らかにするために、ABCB1 の基質を新たに見出すことを目指した。

実際には、今日使用されている薬物のリード化合物を多数提供してきた天然物に注目して南米原産植物 *Pterogyne Nitens* (Fig. 2-2-2)に含まれるグアニジンアルカロイド (Fig. 2-2-3)を第 2 節において研究材料に選定し、Galedine、Nitensidine A、Pterogynine、Pterogynidine が ABCB1 の基質であることを新たに見出した[123,131]。また、第 3 節では、西洋薬ほど科学的に理解されていない漢方薬に注目して生薬「辛夷 (シンイ)」に含まれるリグナン (Fig. 2-3-1)を研究題材として選定し、Epimagnolin A および Fargesin、Kobusin が ABCB1 の基質であることを新たに見出した[69]。第 4 節では、Epimagnolin A および Fargesin、Kobusin の類縁体が含まれる胡麻に注目して、胡麻リグナン(Fig. 2-4-1)を研究題材として選定し、胡麻リグナンの多くが ABCB1 の基質である可能性を見出した。

第 2 章では、ABCB1 の新たな基質の構造に着目し、ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用において、「ゲラニル基の数」および「グアニジン構造におけるゲラニル基の結合部位」が重要であることを第 2 節において見出した。また、第 3 節では、ABCB1 と辛夷リグナンとの相互作用において、ベンゾジオキソール構造がトリメトキシフェニル構造に置換されることによって ABCB1 にたいする親和性が高くなる可能性を見出した。第 4 節では、furo[3,4-c]furan 構造が形成する面にたいして 2 つのベンゾジオキソール構造が同じ側にある場合には ABCB1 と相互作用し難くなり、furo[3,4-c]furan 構造とベンゾジオキソール構造が(+)-2-Episesaminol、(+)-6-Episesaminol、(+)-Sesamolin のような位置関係にある場合には、ABCB1 と相互作用しやすくなる可能性を見出した。

ABCB1 の新たな基質として第 2 節で見出したグアニジンアルカロイドのうち、Pterogynine と Pterogynidine (共に分子量 = 195)は、ABCB1 が輸送する最小化合物として報告されていた Phenytoin (分子量 = 252)よりも小さい[131]。したがって、Galedine、Nitensidine A、Pterogynine、Pterogynidine は、ABCB1 の機能を分子レベルで理解するためのツールとして有効であると考えられる。また、ABCB1 の新たな基質として第 3 節および第 4 節で見出したリグナンもまた、ABCB1 の機能を分子レベルで理解するためのツールとして有効であると考えられる。

第3章 ヒト ABCB1 の基質認識に関わるアミノ酸残基の探索

第1節 緒言

ABC 輸送体の存在は、がんの克服を目指す人類にとって、大きな障壁の一つである。そのため、細胞に多剤耐性を与える ABC 輸送体として最も注目されている ABCB1 の基質認識機構と基質輸送機構は、同定以来、精力的に研究されている。特に、ABCB1 による多剤耐性を克服することができる手段として期待された「ABCB1 阻害剤の探索」は、多くの研究者によって行われてきた[101–105]。また、「ABCB1 阻害剤の探索」と並行して行われてきた「ABCB1 の基質探索」は、ABCB1 が多様な化学構造を認識することを明らかにし、「構造活性相関(SAR)解析」および「定量的 SAR (QSAR)解析」が精力的に行われるようになった[107–121]。Onishi らは、構造の異なる 41 種の化合物を対象に ABCB1 が示す ATPase 活性を指標にして QSAR 解析を行い、脂肪族炭素、非芳香族環および直鎖炭素原子に結合したオキシ基が ABCB1 の基質として重要な部分構造であることを示してきた[107,108]。一方、ABCB1 の基質として重要な部分構造として、アントラニルアミド構造および窒素あるいは水素結合アクセプタ基なども報告されてきた[109,112,114,135–137]。

一方、ABCB1 が同定された 1976 年以来[22]、20 年以上にわたって構造が不明であった中、*Staphylococcus aureus* が発現している Sav1866 (PDB code: 2HYD) (Fig. 3-1-1)[138] や *Escherichia coli* が発現している MsbA (PDB code: 3B5W) (Fig. 3-1-1)[139] の X 線結晶構造を参考に ABCB1 の構造が推測され、*in silico* でも ABCB1 の機能解析が行われてきた。ただし、Sav1866 および MsbA と ABCB1 とのアミノ酸同一性は、それぞれ 34% および 37% であり、信頼に値する結果が返されたかどうかは定かではなく、*in silico* での ABCB1 の機能解析は、ABCB1 研究の中では未開拓の領域であると言える。このような中、2003 年にマウス Abcb1a の X 線結晶構造 (PDB code : 3G60) が明らかにされた (Fig. 3-1-2)[140]。マウス Abcb1a とヒト ABCB1 とのアミノ酸同一性は 76% である。つまり、マウス Abcb1a の X 線結晶構造を参考にして ABCB1 の構造を推測すれば、従来に比して格段に高精度の *in silico* 解析を行うことが出来る。本研究では、マウス Abcb1a の X 線結晶構造に基づいて構築した ABCB1 の構造 (Fig. 3-1-2) を用いて、抗がん剤耐性を制御するヒト ABCB1 上のアミノ酸残基を探索することにする。また、他の研究との差別化を図るために、第 2 章で ABCB1 の基質であることを見出した Nitensidine A および Epimagnolin A を含むグアニジンアルカロイドとリグナンを研究題材として選定する。

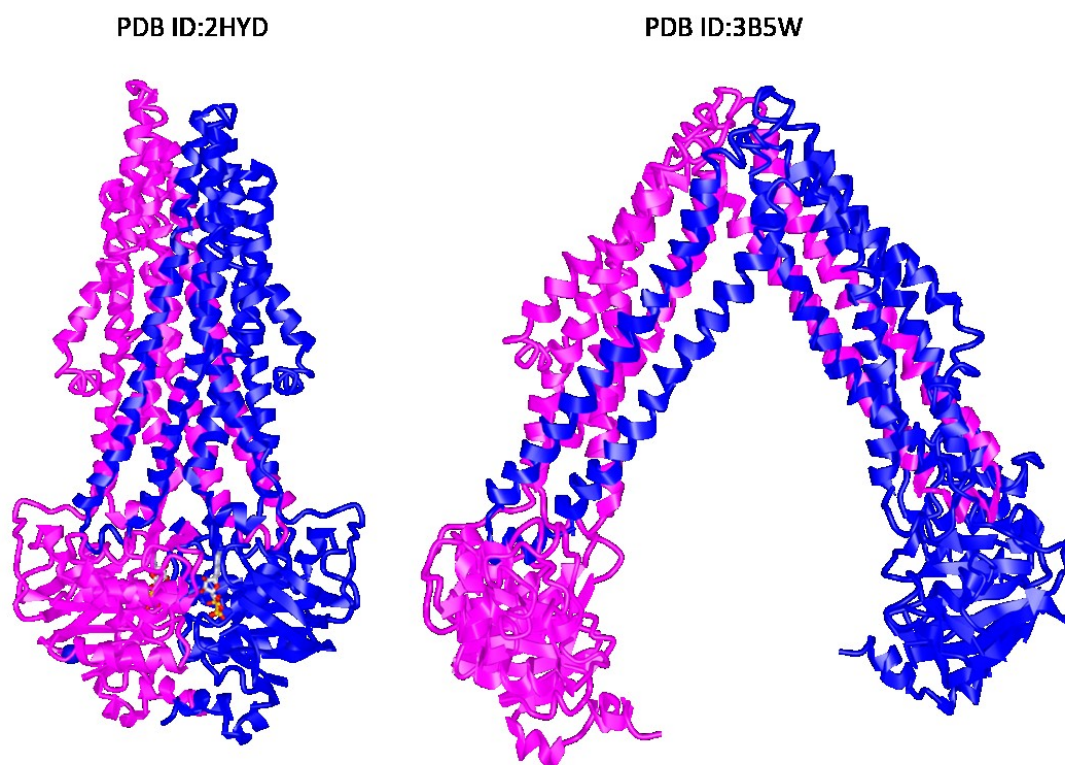


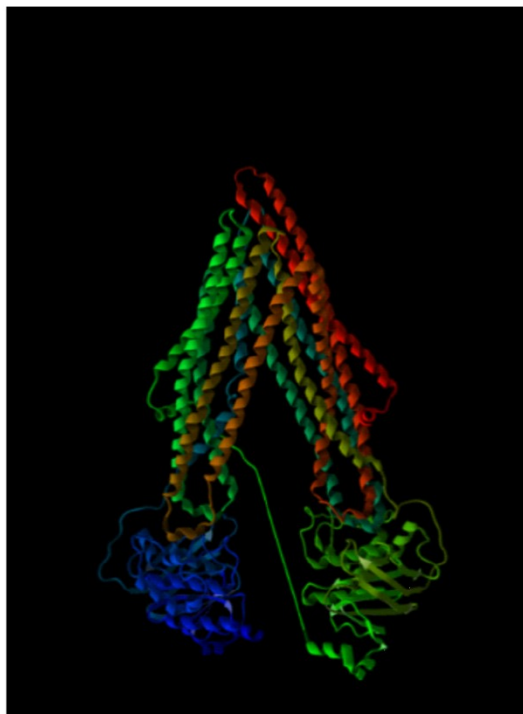
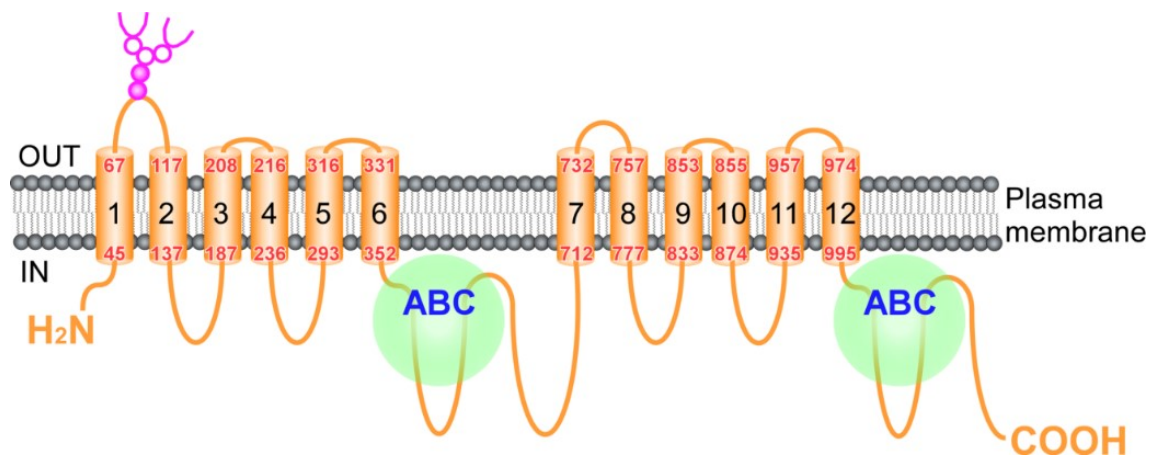
Fig. 3-1-1 Sav1866 (PDB code : 2HYD)および MsbA (PDB code : 3B5W)の立体構造

左: Sav1866 (PDB code : 2HYD)

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/icn3d/full.html?&mmdbid=41167&bu=1>

右: MsbA (PDB code : 3B5W)

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/icn3d/full.html?&mmdbid=61092&bu=1>



Abcb1a (3G60)



ABCB1 (Created)

Fig. 3-1-2 ヒト ABCB1 の構造

ABCB1 は 12 回の膜貫通領域と 2 つの ATP 結合領域を持ち、91 番目、94 番目、99 番目のアスパラギンに *N*結合型糖鎖が付加される[141–144]。

第 2 節 Docking study による ABCB1 の基質認識に関わるアミノ酸残基の推定

[背景と目的]

ABC 輸送体を介した薬剤耐性機構を理解することは、「がん」の克服に不可欠である。本研究の題材である ABCB1 は、「がん」に薬剤耐性を付与する代表的な ABC 輸送体であり、抗がん剤を中心として、これまでに多くの薬物が ABCB1 の基質として報告されてきた。そして、本研究では、第 2 章において、*Pterogyne Nitens* に含まれるグアニジンアルカロイドと辛夷および胡麻に含まれるリグナンが ABCB1 の基質であることを見出した[69,123]。

化合物を用いて ABCB1 の機能を評価する方法として、①構造が異なる化合物を対象にして ABCB1 との親和性を試験し、ABCB1 との親和性に影響を及ぼす部分構造および化学的特性を理解する方法、と②ABCB1 の基質として報告されている化合物と類似の構造を有する化合物を対象にして ABCB1 との親和性を試験し、ABCB1 との親和性が高い部分構造および化学的特性を理解する方法、がある。そこで、第 2 節では、2003 年に明らかにされたマウス Abcb1a の X 線結晶構造 (PDB code : 3G60) [140]を活用し、ABCB1 の機能を分子レベルで理解することを目指した。実際には、第 2 章で得られた知見に基づいて「Docking Simulation」を実施し、ABCB1 の基質認識に重要なアミノ酸残基を探索した。

1. ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用解析

[材料および方法]

ソフトウェア

Molegro Virtual Docker 6.0 (MVD) (Molegro Vioinformatics Solutions)

CS ChemDraw Ultra 6.0 software (CambridgeSoft Corp., MA, USA)

Chem Bio office 15 (Chem Draw ultra, Chem 3D pro) (PerkinElmer ChemBio)

ヒト ABCB1 の構造データ

ヒト ABCB1 の構造データは、マインツ大学の Prof. Thomas Efferth から提供された。なお、このヒト ABCB1 の構造データは、マウス Abcb1a の X 線結晶構造データ (PDB code: 3G60) を基にして、ホモロジーモデリングによって導き出されたものである。実際には、欧州分子生物学研究所 (EMBL) がインターネット上で公開している EMBOSS Needle (http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/) を用いてヒトおよびマウス ABCB1 の一次構造を整列させ、MODELLER 9.11[140,145] と Swiss-MODEL Alignment Mode[146,147] を用いてホモロジーモデルを完成させた。

試験化合物の三次元構造の描画と最適化

試験化合物の三次元構造は、CS ChemDraw Ultra 6.0 software (CambridgeSoft Corp., MA, USA) を用いて構造式を描画し、描画した構造式データを CS Chem3D Pro 5.0 software (CambridgeSoft Corp., MA, USA) で三次元表示させた。三次元表示させた試験化合物は、分子力学法あるいは半経験的分子軌道法に基づいて最適化した。なお、分子力学法に基づく最適化では分子力場として MM2 を採用し、半経験的分子軌道法に基づく最適化ではモデルハミルトニアンとして AM1 を採用した。

Docking Study

ソフトウェア Molegro Virtual Docker 6.0 (Molegro Bioinformatics Solutions) を使用し、ABCB1 とグアニジンアルカロイドとの相互作用を解析した。実際には、シミュレーションを行う範囲として、ABCB1 の代表的な基質である Verapamil が相互作用すると考えられているアミノ酸 (Gly64、Leu65、Met69、Ser222、Leu304、Ile306、Tyr307、Phe336、Leu339、Ile340、Ala342、Phe343、Gln725、Phe728、Phe732、Leu762、Thr837、Ile868、Gly872、Phe942、Thr945、Tyr953、Leu975、Phe978、Ser979、Val982、Gly984、Ala985、Met986、Gly989、Gln990、Ser993) [148] が含まれる直径 50 Å の球空間を設定した (球空間の中心座標 : X = 0, Y = 80, Z = 45)。また、アルゴリズムとして MolDock SE を採用し、population size : 50, energy threshold : 100, grid resolution : 0.3 Å, maximum interaction : 1500 の条件の下、Rigid body mode で試験化合物につき 1000 回のシミュレーションを実行した。また、シミュレーション後に水素結合の最適化が行われるように設定した。

解析結果は、返された Total Energy が小さい順に上位 10 回分の結果を採用した。この 10 回分の結果については、それぞれの回で返されたエネルギー値をアミノ酸番号ごとに合算し、エネルギー値の合算値が小さい順に 10 アミノ酸を抽出した。そして、10 回分の結果のすべてのアミノ酸残基にたいして返されたエネルギー値の合計値を 100%とし、抽出した 10 アミノ酸のそれぞれにたいして返されたエネルギー値の合算値を百分率として算出した。なお、本研究では、この百分率を「相互作用への寄与率」と定義した。

[結果]

ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用解析

マウス Abcb1a の X 線結晶構造データ (PDB code : 3G60)から構築したヒト ABCB1 の立体構造モデルを用いてヒト ABCB1 と Verapamil、Nitensidine A、Pterogynine、Pterogynidine、Galegine の相互作用を解析した。その結果、解析した 4 種のグアニジンアルカロイドの中では、Nitensidine A が最も小さい Total Energy 値を示した (Fig. 3-2-1)。また、試験化合物の Total Energy は、Verapamil = Nitensidine A < Pterogynine = Pterogynidine < Galegine の順であった (Fig. 3-2-1)。Nitensidine A と Verapamil については、相互作用に強く寄与すると返された ABCB1 上のアミノ酸残基の複数 (Ser222、Pro223、Gly226、Phe303、Tyr307、Tyr310、Leu339、Ala342、Phe343)に一致が認められた (Fig. 3-2-2, 3-2-3)。一方、Pterogynine、Pterogynidine、Galegine については、相互作用に強く寄与すると返された ABCB1 上のアミノ酸残基の複数 (Ser831、Gln990、Ser993、Phe994、Ala995、Pro996、Asp997)に一致が認められたが、Nitensidine A や Verapamil との相互作用する場合とは異なるアミノ酸であった (Fig. 3-2-2, 3-2-3)。

[考察]

ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用解析

ヒト ABCB1 と Verapamil、Nitensidine A、Pterogynine、Pterogynidine、Galegine の相互作用を解析した結果、相互作用における ABCB1 上のアミノ酸の寄与率 (Fig. 3-2-3)と ATPase 活性 (Fig. 2-2-7)との間に相関が認められた。具体的には、高い ATPase 活性が認められた Verapamil および Nitensidine A との相互作用には、Ser222、Pro223、Gly226、Phe303、Tyr307、Tyr310、Leu339、Ala342、Phe343 が寄与し、低い ATPase 活性が認められた Pterogynine および Pterogynidine、Galegine との相互作用には、Ser831、Gln990、Ser993、Phe994、Ala995、Pro996、Asp997 が寄与していることが返された。これらのアミノ酸残基のうち、Ser222、Tyr307、Leu339、Ala342、Phe343 および Gln990、Ser993 は、Verapamil との相互作用に寄与することが報告されているアミノ酸残基である [148]。したがって、Ser222、Tyr307、Leu339、Ala342、Phe343 と相互作用しやすい化合物の方が Gln990、Ser993 と相互作用しやすい化合物と比して ABCB1 に基質として認識されやすいことが考えられる。つまり、Ser222、Tyr307、Leu339、Ala342、Phe343 のいずれか

もしくは全てが ABCB1 による基質認識に重要であると考えられる。

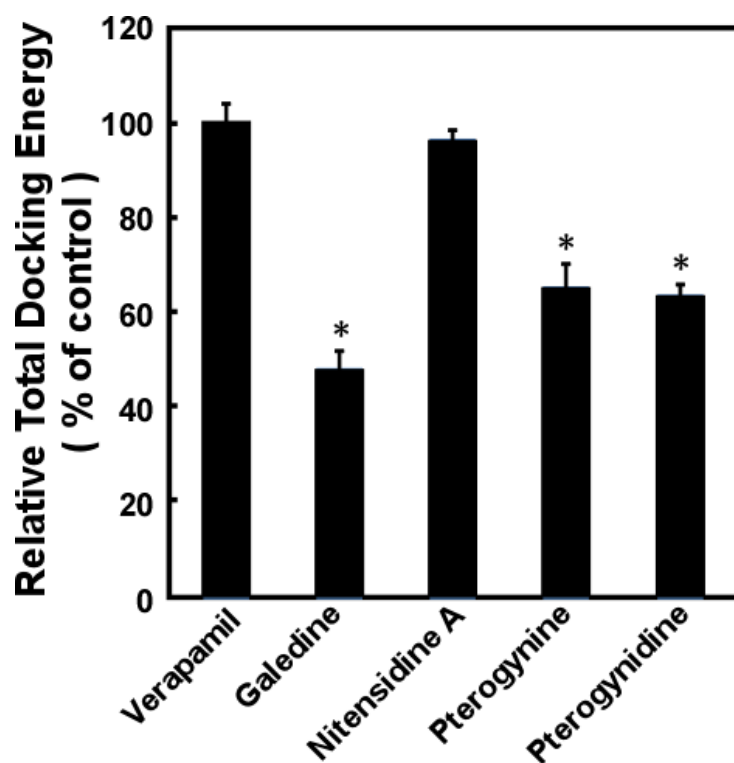


Fig.3-2-1 Docking Study による ABCB1 とグアニジンアルカロイドとの相互作用の評価
縦軸に Verapamil (Positive control)を 100 とした場合のそれぞれの化合物における合計エネルギー値を示す。有意性の統計解析は、One-way ANOVA および Tukey Kramer 法を用いて行った(*、Mock 群と比較して $P < 0.05$)。

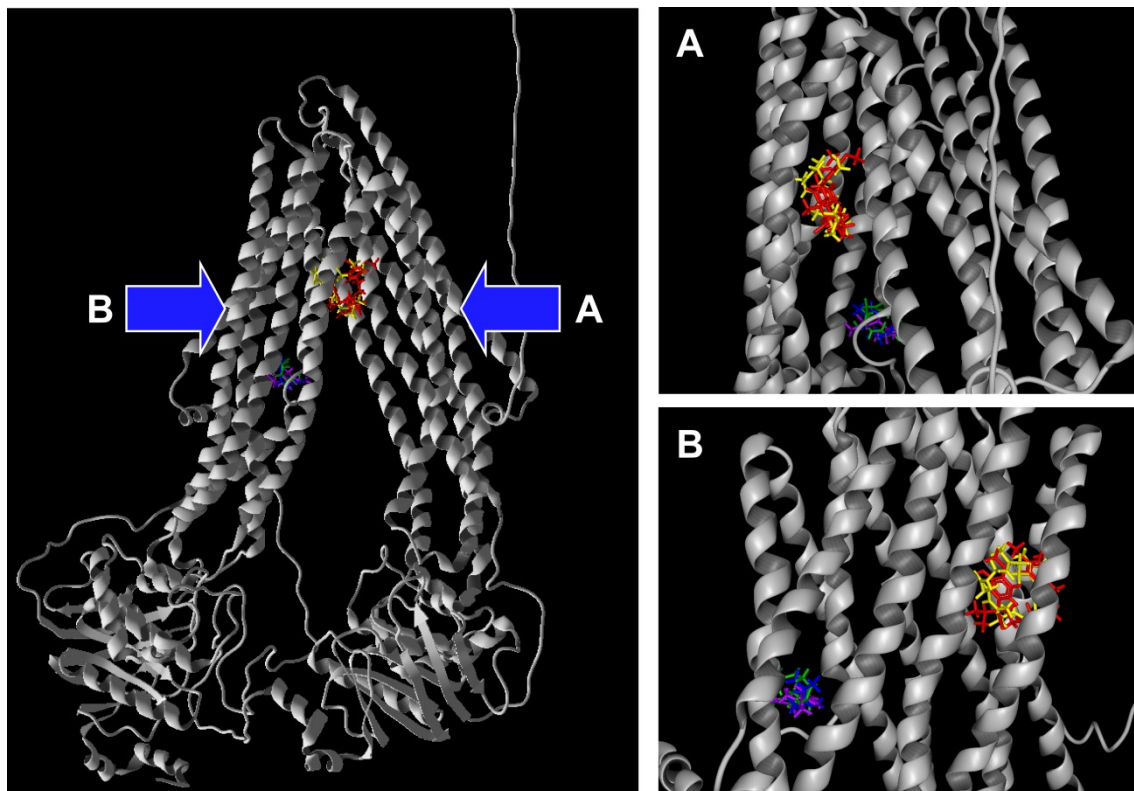


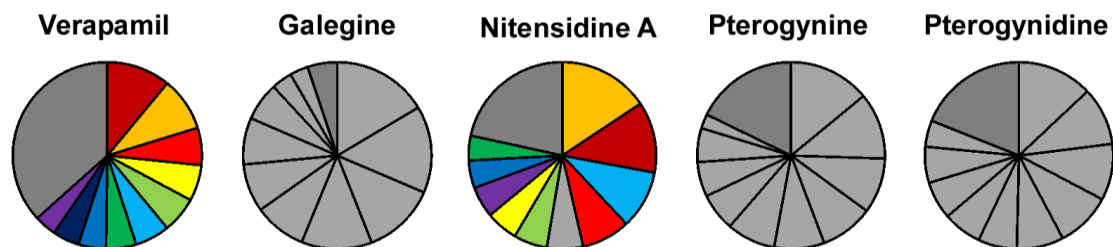
Fig.3-2-2 Molegro Virtual Docker 6.0 を用いた ABCB1 にたいするグアニジンアルカロイドの結合部位の予測

赤は Verapamil の構造、青は Galegine の構造、黄は Nitensidine A の構造、緑は Pterogynine の構造、紫は Pterogynidine の構造を示す。

A. 青色の矢印 A 方向から見た場合の結合状態を示す。

B. 青色の矢印 B 方向から見た場合の結合状態を示す。

A



B

Rank	Amino acid residues	Contribution ratio (%)	Rank	Amino acid residues	Contribution ratio (%)	Rank	Amino acid residues	Contribution ratio (%)	Rank	Amino acid residues	Contribution ratio (%)	Rank	Amino acid residues	Contribution ratio (%)
1	Phe 303	10.9	1	Phe 994	16.4	1	Phe 343	15.6	1	Asp 997	12.9	1	Asp 997	14.0
2	Phe 343	9.3	2	Ala 995	15.0	2	Phe 303	12.3	2	Phe 994	10.1	2	Ala 995	11.5
3	Ala 342	6.5	3	Asp 997	12.6	3	Tyr 307	10.1	3	Ala 995	9.7	3	Ser 831	9.6
4	Leu 339	6.2	4	Ser 993	12.1	4	Ala 342	8.4	4	Val 991	9.5	4	Phe 994	9.2
5	Gly 226	6.2	5	Val 991	9.0	5	Ile 306	6.2	5	Ser 831	8.1	5	Val 991	8.7
6	Tyr 307	6.0	6	Pro 996	8.3	6	Gly 226	5.8	6	Pro 996	6.7	6	Tyr 998	8.4
7	Ser 222	5.2	7	Ser 831	8.1	7	Leu 339	5.5	7	Tyr 998	6.7	7	Ser 993	6.5
8	Pro 223	4.7	8	Gln 990	6.6	8	Tyr 310	5.4	8	Gln 990	6.6	8	Pro 996	6.0
9	Lys 234	4.6	9	Ser 992	3.6	9	Pro 223	4.8	9	Ser 993	6.2	9	Gln 990	5.9
10	Tyr 310	3.8	10	Ala 834	3.1	10	Ser 222	4.3	10	Ala 834	4.6	10	Val 835	17.8
	Other	36.7		Other	5.1		Other	21.6		Other	18.9		Other	5.1

Fig.3-2-3 ABCB1 構造データにたいする Nitensidine A および類縁体の Total Energy の平均値にたいするアミノ酸残基の寄与率

A, 合計エネルギー値を 100%とした時にそれぞれのアミノ酸残基が寄与するエネルギー値の割合を示す。

B, A のグラフより上位 10 個のアミノ酸残基を抜粋した。

2. ABCB1 とリグナンの相互作用解析

[材料および方法]

ソフトウェア

「第3章 第2節 1. ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用解析 ソフトウェア」と同一のソフトウェアを使用した。

ヒト ABCB1 の構造データ

「第3章 第2節 1. ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用解析 ヒト ABCB1 の構造データ」と同一の方法で行った。

試験化合物の三次元構造の描画と最適化

「第3章 第2節 1. ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用解析 試験化合物の三次元構造の描画と最適化」と同一の方法で行った。

Docking Study

「第3章 第2節 1. ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用解析 Docking Study」と同一の方法で行った。

[結果]

ABCB1 とリグナンの相互作用解析

マウス Abcb1a の X 線結晶構造データ (PDB code : 3G60) から構築したヒト ABCB1 の立体構造モデルを用いてヒト ABCB1 と辛夷リグナンおよび胡麻リグナンの相互作用を解析した。その結果、Diasaminyl ether と Samin を除き、試験化合物の Total Enargy に差は認められなかった (Tab. 3-2-4)。また、相互作用に強く寄与すると返された ABCB1 上のアミノ酸残基の複数 (Phe303、Tyr307、Leu339、Phe343) に一致が認められた (Fig. 3-2-5, 3-2-6, 3-2-7, 3-2-8) (Tab. 3-2-1)。

[考察]

ABCB1 とリグナンの相互作用解析

ヒト ABCB1 と辛夷リグナンおよび胡麻リグナンの相互作用を解析した結果、相互作用における ABCB1 上のアミノ酸の寄与率 (Fig. 3-2-5, 3-2-6, 3-2-7, 3-2-8) (Tab. 3-2-1)) と ATPase 活性 (Fig. 2-4-3) との間に相関は認められなかった。この原因の一つは、化合物量の都合上、胡麻リグナン濃度依存的な ATP 分解量を評価することが出来なかったために試験化合物間で最大反応速度および ABCB1 との複合体形成について比較を行えなかったことが挙げられる。したがって、相互作用に強く寄与すると返された ABCB1 上のアミノ酸残基 Phe303、Tyr307、Leu339、Phe343 については、胡麻リグナン濃度依存的な ATP 分解

量を評価することによって再評価する必要があると言える。一方、試験した全てのリグナンが ABCB1 による ATP の加水分解を誘導したことから、相互作用に強く寄与すると返された ABCB1 上のアミノ酸残基 Phe303、Tyr307、Leu339、Phe343 のいずれかもしくは全てが ABCB1 による基質認識に重要であることが考えられる。Verapamil との相互作用に寄与することが報告されている ABCB1 上のアミノ酸残基として Tyr307、Leu339、Phe343 が挙げられていることは[148]、この可能性を支持する。

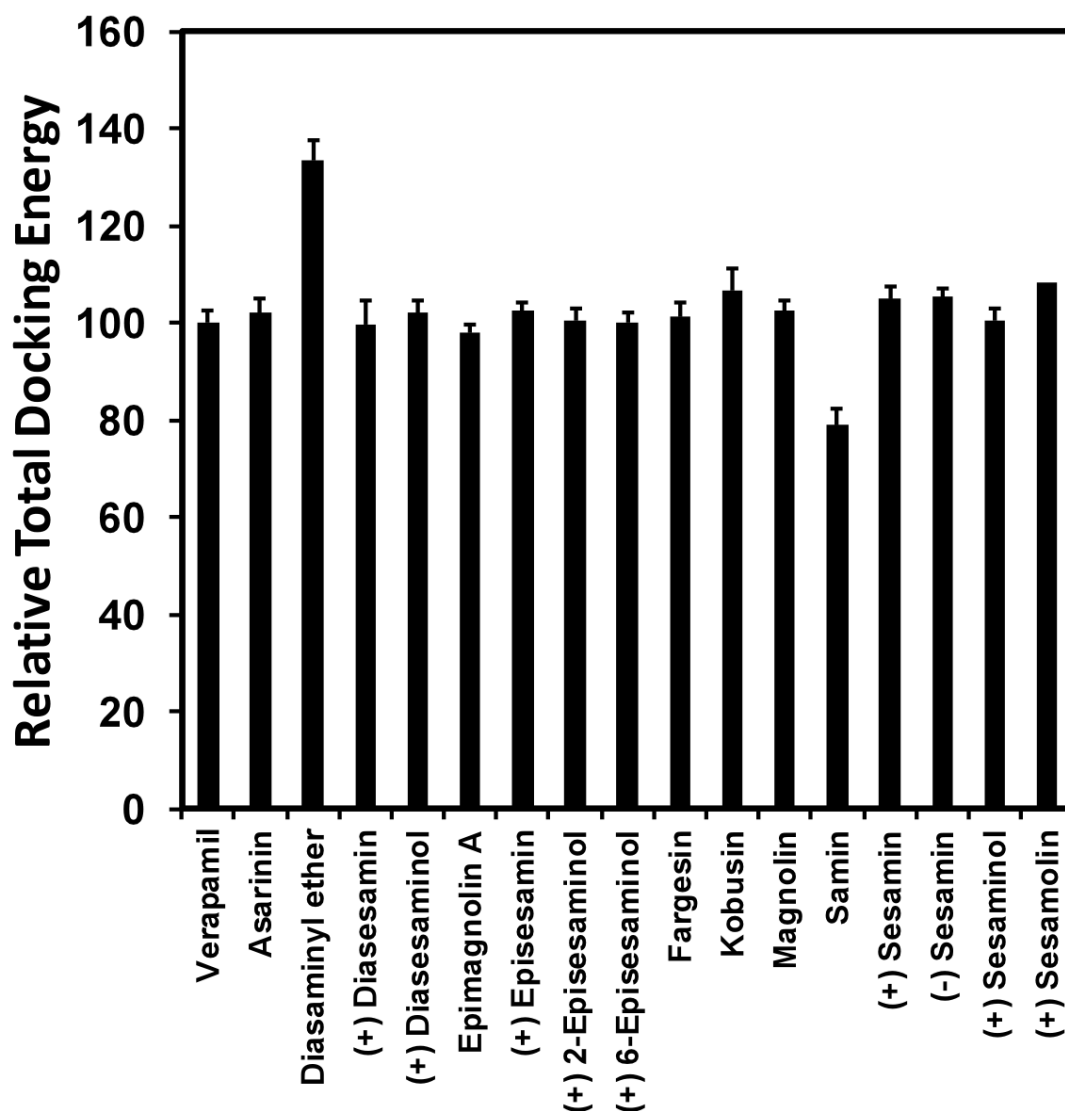


Fig.3-2-4 Docking Study によって算出された合計エネルギー値

縦軸は Verapamil の構造から予測された ABCB1 にたいする合計エネルギー値(Control)を 100 とした時にそれぞれのリグナンから予測された合計エネルギー値を比較した。有意性の統計解析は、One-way ANOVA および Tukey Kramer 法を用いて行った(*、Mock 群と比較して $P < 0.05$)。

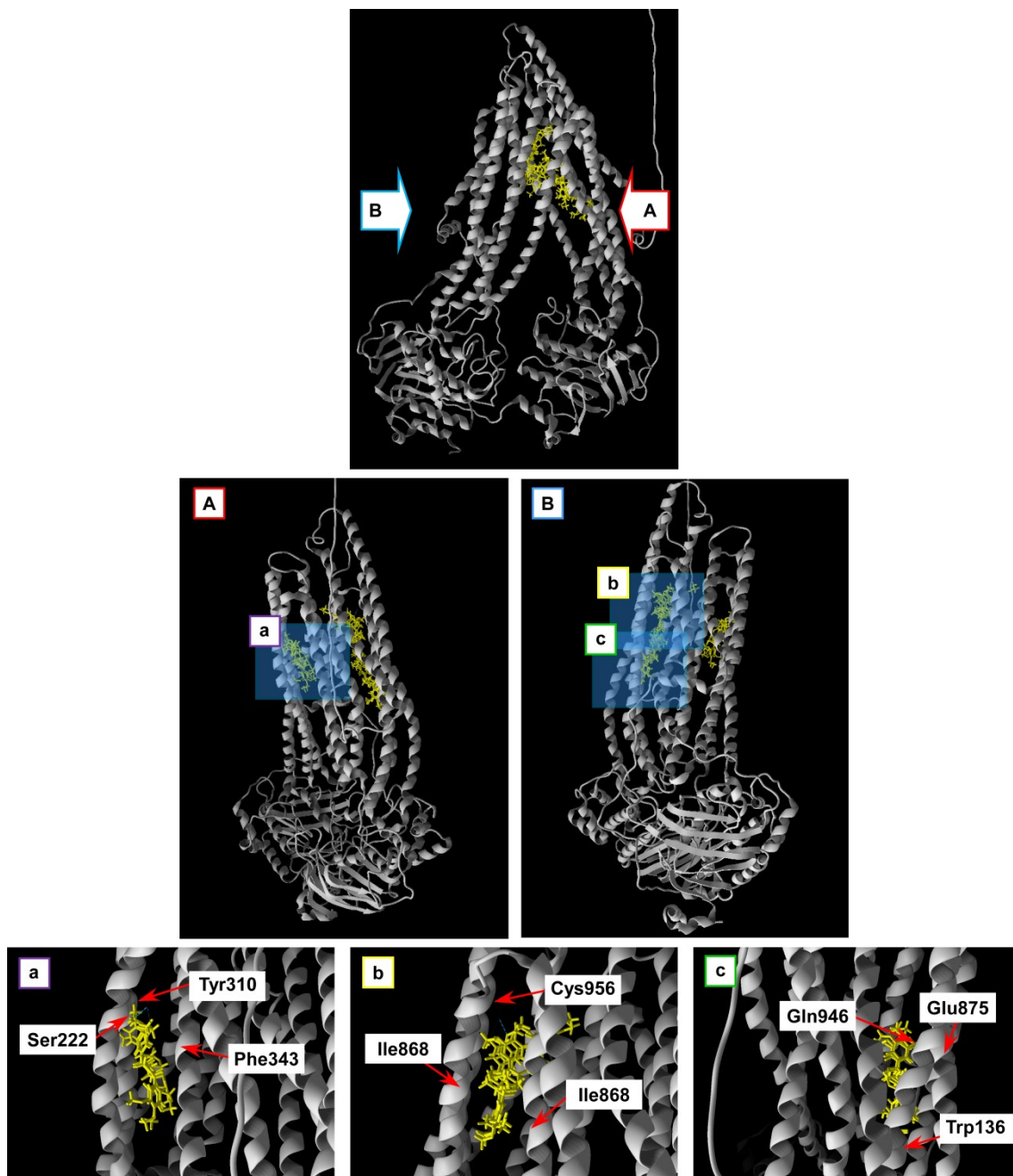


Fig. 3-2-5 Docking Study における ABCB1 立体構造にたいする Epimagnolin A の予測される結合部位

上段を正面から見た時の ABCB1 立体構造モデルである。A は上段の構造モデルを右から見た物、B は左から見たものとする。a、b、c は中段の図の a、b、c を拡大したものとする。

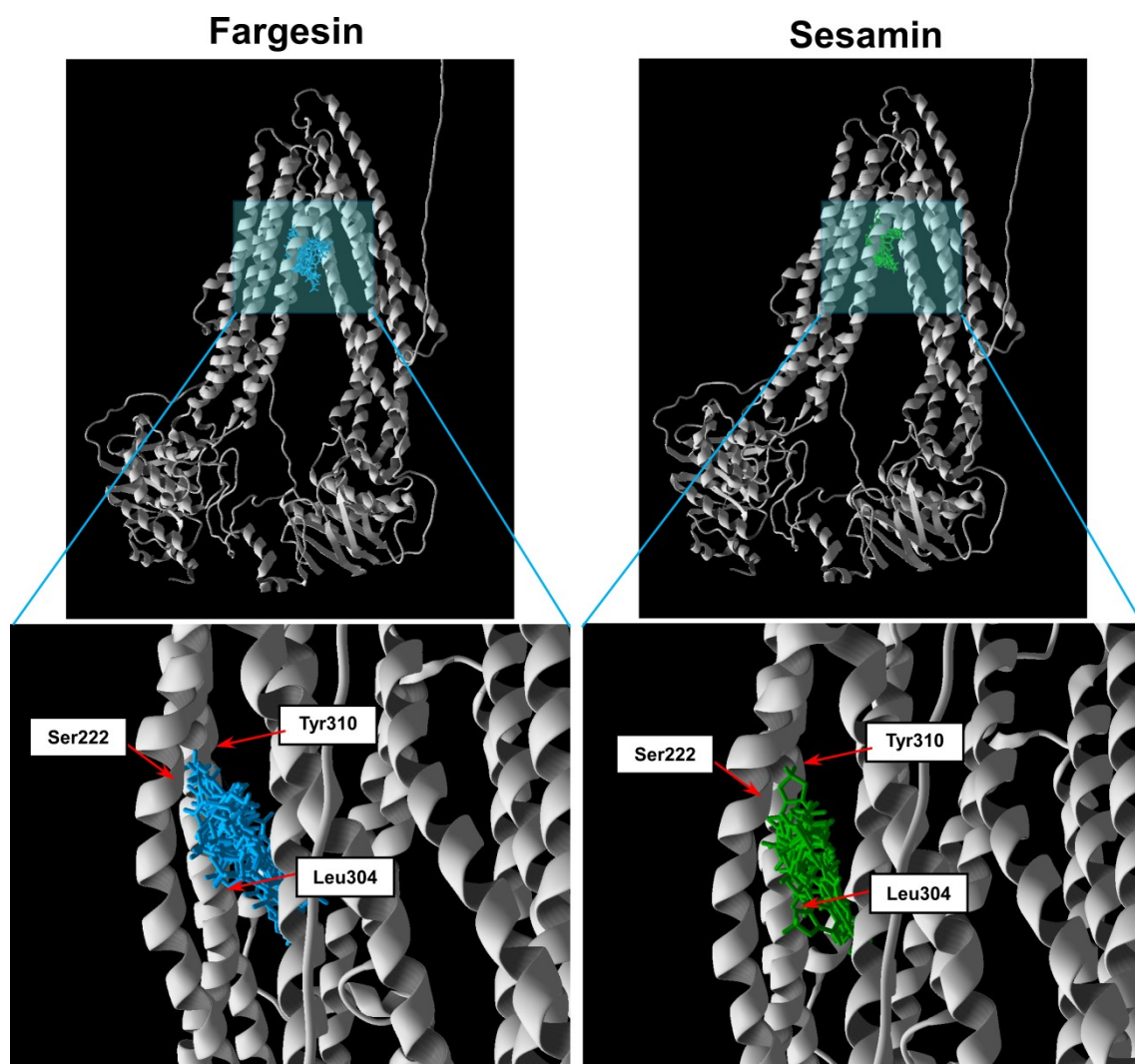


Fig. 2-3-6 Docking StudyにおけるABCB1立体構造にたいするFargesinおよびSesaminの予測される結合部位

上段はそれぞれの化合物の結合部位予測結果である。

下段は上段の図中に存在する青色フィルター部分を拡大したものとする。

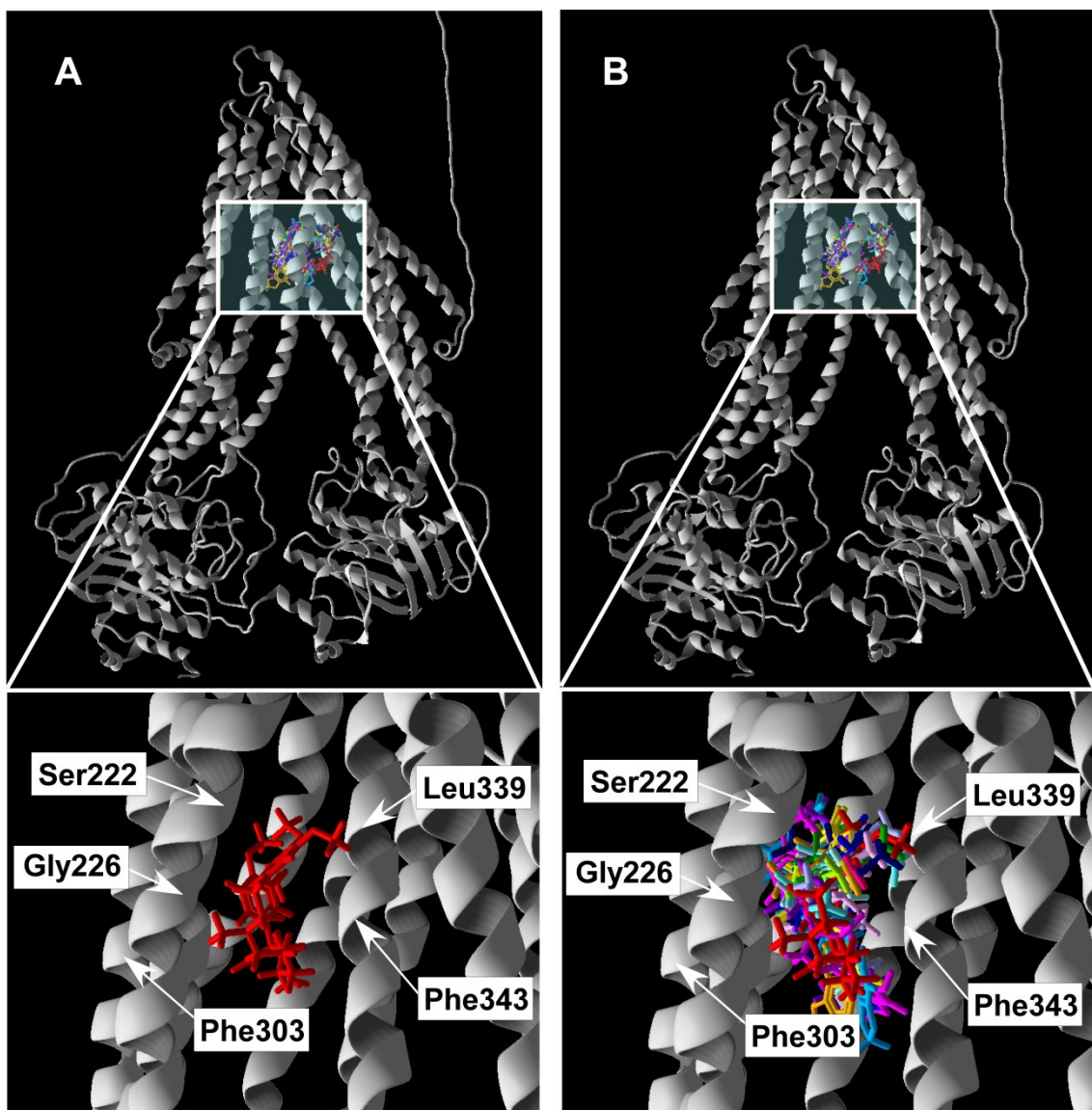


Fig. 3-2-7 Docking Studyにおける ABCB1 立体構造にたいする Sesamin および Sesamin 類縁体の予測される結合部位

上段はそれぞれの化合物の結合部位予測結果である。

下段は上段の図中に存在する青色フィルター部分を拡大したものとする。

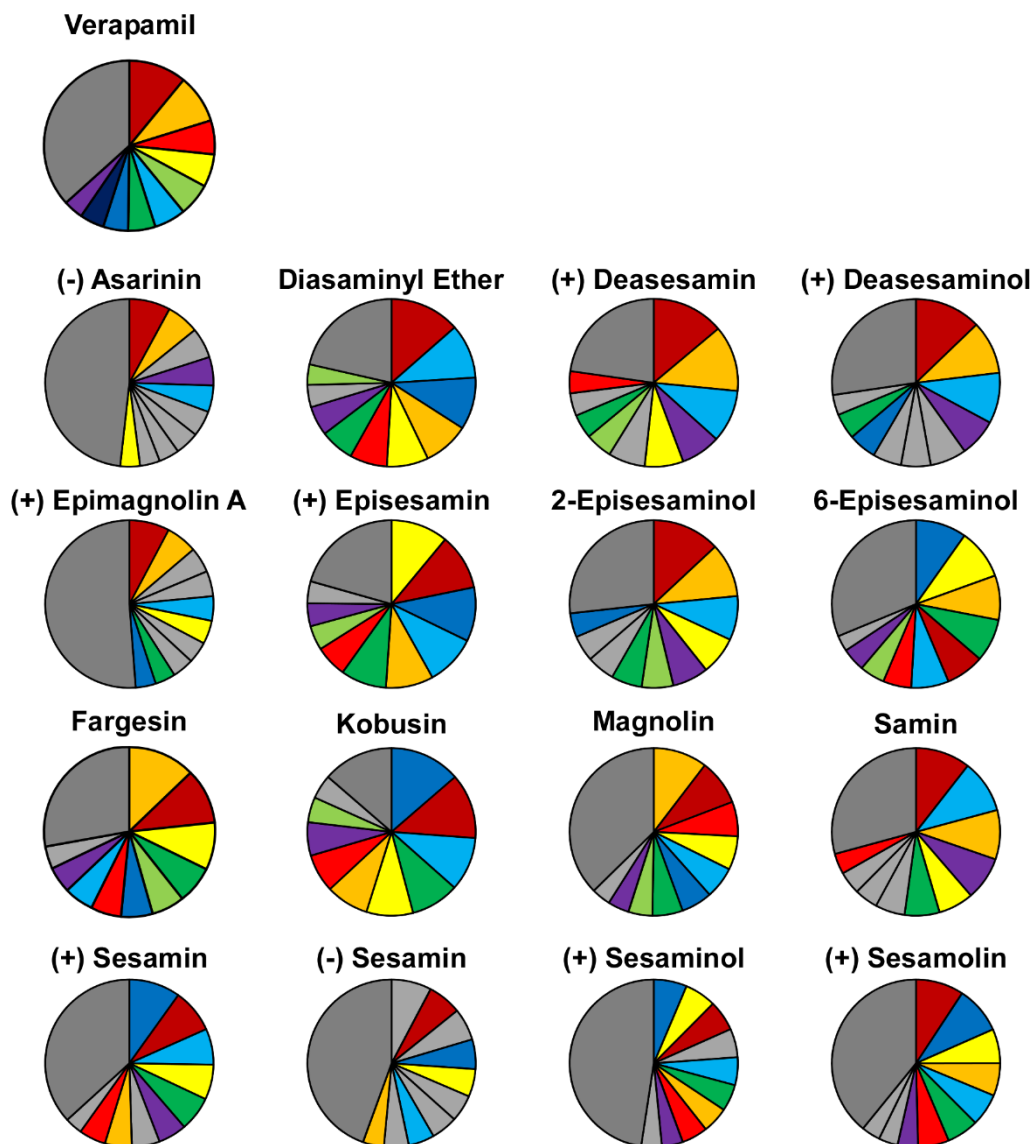


Fig. 3-2-8 Docking Study における上位 10 回までの合計エネルギー値にたいするアミノ酸残基の寄与率

合計エネルギー値を 100%とした時にそれぞれのアミノ酸残基が寄与するエネルギー値の割合を示す。

Tab. 3-2-1 Docking Study における上位 10 回までの合計エネルギー値にたいするアミノ酸残基の寄与率

Verapmil			(-) Asarinin		Diasaminyl ether		(+) Deasesamin		(+) Diasesaminol		Epimagnolin A		(+) Episesamin		2-Episesaminol	
Rank	Amino acid residues	Contribution ratio (%)	Amino acid residues	Contribution ratio (%)	Amino acid residues	Contribution ratio (%)	Amino acid residues	Contribution ratio (%)	Amino acid residues	Contribution ratio (%)	Amino acid residues	Contribution ratio (%)	Amino acid residues	Contribution ratio (%)	Amino acid residues	Contribution ratio (%)
1	Phe 303	10.9	Phe 303	7.9	Phe 303	13.5	Phe 303	13.9	Phe 303	12.8	Phe 303	7.7	Leu 339	11.0	Phe 303	13.0
2	Phe 343	9.3	Phe 343	6.2	Tyr 307	10.5	Phe 343	12.7	Phe 343	10.3	Phe 343	6.0	Phe 303	10.8	Phe 343	10.5
3	Ala 342	6.5	Tyr 953	5.9	Pro 223	10.1	Tyr 307	10.1	Tyr 307	9.8	Tyr 953	4.9	Pro 223	10.4	Tyr 307	8.5
4	Leu 339	6.2	Tyr 310	5.5	Phe 343	8.8	Tyr 310	7.6	Leu 339	7.3	Val 981	4.9	Tyr 307	9.7	Leu 339	7.4
5	Gly 226	6.2	Tyr 307	5.1	Leu 339	8.0	Leu 339	7.4	Tyr 310	7.0	Tyr 307	4.7	Phe 343	9.1	Tyr 310	6.9
6	Tyr 307	6.0	Val 981	5.0	Ala 342	7.2	Ile 306	7.1	Trp 136	5.7	Leu 339	4.5	Ser 222	8.8	Gly 226	6.1
7	Ser 222	5.2	Ile 868	4.6	Ser 222	6.5	Gly 226	5.2	Ile 306	5.5	Ser 952	4.1	Ala 342	6.1	Ser 222	5.9
8	Pro 223	4.7	Val 865	3.9	Tyr 310	5.7	Ser 222	4.7	Pro 223	5.4	Ile 868	4.1	Gly 226	4.7	Ile 306	5.4
9	Lys 234	4.6	Ser 952	3.8	Val 338	4.3	Leu 225	4.4	Ser 222	5.0	Ser 222	3.9	Tyr 310	4.4	Leu 225	5.0
10	Tyr 310	3.8	Leu 339	3.8	Gly 226	3.9	Ala 342	4.2	Leu 225	3.9	Pro 223	3.9	Val 338	4.2	Pro 223	4.6
	Other	36.7	Other	48.3	Other	21.5	Other	22.8	Other	27.3	Other	51.2	Other	20.6	Other	26.8

6-Episesaminol			Kobusin		Magnolin		Samin		(+) Sesamin		(-) Sesamin		(+) Sesaminol		(+) Sesamolol	
Rank	Amino acid residues	Contribution ratio (%)	Amino acid residues	Contribution ratio (%)	Amino acid residues	Contribution ratio (%)	Amino acid residues	Contribution ratio (%)	Amino acid residues	Contribution ratio (%)	Amino acid residues	Contribution ratio (%)	Amino acid residues	Contribution ratio (%)	Amino acid residues	Contribution ratio (%)
1	Pro 223	9.8	Pro 223	13.6	Phe 343	10.4	Phe 303	10.5	Pro 223	9.9	Tyr 953	7.7	Pro 223	6.4	Phe 303	9.2
2	Leu 339	9.7	Phe 303	12.6	Phe 303	8.8	Tyr 307	10.3	Phe 303	8.5	Phe 303	6.5	Leu 339	6.1	Pro 223	9.1
3	Phe 343	8.6	Tyr 307	10.4	Ala 342	6.7	Phe 343	9.5	Tyr 307	7.0	Val 981	6.2	Phe 303	5.9	Leu 339	6.6
4	Ser 222	8.3	Ser 222	9.3	Leu 339	6.5	Tyr 310	8.4	Leu 339	6.8	Pro 223	5.7	Trp 136	5.5	Phe 343	6.3
5	Phe 303	7.4	Leu 339	9.0	Tyr 307	6.1	Leu 339	6.8	Ser 222	6.7	Leu 339	5.3	Tyr 307	5.4	Tyr 307	6.3
6	Tyr 307	7.2	Phe 343	8.2	Pro 223	6.0	Ser 222	6.7	Tyr 310	5.5	Ser 952	5.2	Ser 222	5.2	Ser 222	6.1
7	Ala 342	5.4	Ala 342	7.4	Ser 222	5.8	Ile 306	5.7	Tyr 953	5.4	Val 865	5.1	Phe 343	5.0	Ala 342	6.0
8	Gly 226	4.8	Tyr 310	6.4	Gly 226	4.6	Leu 225	4.5	Phe 343	5.2	Tyr 307	5.0	Ala 342	5.0	Tyr 310	3.9
9	Tyr 310	4.5	Gly 226	4.9	Tyr 310	4.1	Phe 72	4.4	Ala 342	5.1	Ile 868	4.8	Tyr 310	4.0	Tyr 953	3.7
10	Val 338	3.1	Val 338	4.7	Leu 225	3.7	Ala 342	4.0	Val 865	3.4	Phe 343	4.1	Phe 938	4.0	Ile 306	3.6
	Other	31.3	Other	13.6	Other	37.4	Other	29.2	Other	36.8	Other	44.5	Other	47.6	Other	39.2

第 3 節 ABCB1 の基質認識に関わるアミノ酸残基の同定

[背景と目的]

ABC 輸送体を介した薬剤耐性機構を理解することは、「がん」の克服に不可欠である。本研究の題材である ABCB1 は、「がん」に薬剤耐性を付与する代表的な ABC 輸送体であり、抗がん剤を中心として、これまでに多くの薬物が ABCB1 の基質として報告されてきた。そして、本研究では、第 2 章において、*Pterogyne Nitens* に含まれるグアニジンアルカロイドと辛夷および胡麻に含まれるリグナンが ABCB1 の基質であることを見出した[69,123]。

化合物を用いて ABCB1 の機能を評価する方法として、①構造が異なる化合物を対象にして ABCB1 との親和性を試験し、ABCB1 との親和性に影響を及ぼす部分構造および化学的特性を理解する方法、と②ABCB1 の基質として報告されている化合物と類似の構造を有する化合物を対象にして ABCB1 との親和性を試験し、ABCB1 との親和性が高い部分構造および化学的特性を理解する方法、がある。そこで、第 2 節では、2009 年に明らかにされたマウス Abcb1a の X 線結晶構造 (PDB code : 3G60) [140]を活用し、第 2 章で得られた知見に基づいて「Docking Simulation」を実施した。そして、基質認識に重要である ABCB1 上のアミノ酸残基として、Ser222、Phe303、Tyr307、Leu339、Ala342、Phe343 を見出した。そこで、第 3 節では、基質認識に重要なアミノ酸残基として推定した箇所に一塩基変異を導入した変異型 ABCB1 を作出し、基質認識における当該アミノ酸残基の重要性を評価することを目指した。実際には、変異型 ABCB1 をそれぞれ安定発現する細胞を樹立し、「MTT assay」を実施した。

1. 変異型 ABCB1 を安定発現する細胞の樹立

[材料および方法]

試薬

スキムミルク (MORINAGA MILK INDUSTRY CO., LTD.)

(±)-Dithiothreitol (DTT) (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)

0.5 M EDTA (pH8.0) (NIPPON GENE CO., LTD.)

30(w/v)%-Acrylamide/Bis Mixed Solution (37.5:1) (30% Acrylamide) (NACALAI TESQUE, INC.)

50 mM Tris-HCl (NACALAI TESQUE, INC.)

Ammonium PeroxodiSulfate (APS) (NACALAI TESQUE, INC.)

Ampicillin Sodium Salt (NACALAI TESQUE, INC.)

Dpn I (TOYOBO)

EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid)(NACALAI TESQUE, INC.)

Ethanol (NACALAI TESQUE, INC.)

Glycin, Nuclease and Protease tested (NACALAI TESQUE, INC.)

HCl (NACALAI TESQUE, INC.)

Hi-Di™ Formamide (Applied Biosystems)

LB 寒天培地, Lennox (NACALAI TESQUE, INC.)

Lipofectamin™ 2000 Reagent (1 mg/ml) (Invitrogen)

Methanol (Nuclease and Protease tested) (バイオテクノロジーグレード) (NACALAI TESQUE, INC.)

NaCl (NACALAI TESQUE, INC.)

NaCl (NACALAI TESQUE, INC.)

Opti-MEM (Invitrogen)

Phosphatase inhibitor (NACALAI TESQUE, INC.)

PNGase F (NEW ENGLAND Bio Labs® Inc.)

Polyoxyethylene Sorbitan Monolaurate (Tween 20) (NACALAI TESQUE, INC.)

Ponceau S, practical grade (Sigma-Aldrich Co. LLC.)

Prime STAR® MAX DNA Polymerase Mix (Takara)

Protease inhibitor (NACALAI TESQUE, INC.)

Protein Assay CBB Solution (5×) CBB (NACALAI TESQUE, INC.)

Sample Buffer Solution with Reducing Reagent (6×) for SDS-PAGE (NACALAI TESQUE, INC.)

SDS PAGE 10' Running Buffer (NIPPON GENE CO., LTD.)

Separating Gel Buffer Solution (4×) for SDS-PAGE (NACALAI TESQUE, INC.)

Stacking Gel Buffer Solution (4×) for SDS-PAGE (NACALAI TESQUE, INC.)

Tris(hydroxymethyl)aminomethane, Nuclease and Protease tested (NACALAI TESQUE, INC.)

Triton X-100

WESTERN LIGHTNING™ Chemiluminescence Reagent Plus (Perkin Elmer®)

抗体

Anti-P-glycoprotein Mouse mAb (C219) (CALBOCHEM)

Anti-GAPDH-Clone 6C5 mouse monoclonal, igG2b (GAPDH Specific antibody) (American Research Products)

Anti-mouse igG, HRP-linked Antibody (Cell Signaling)

細胞

本研究では、Flp-In-293 細胞 (Invitrogen)を使用した[124,125]。なお、Flp-In-293 細胞は、invitrogen 社が HEK293 細胞から作製した細胞であり、12 番染色体短腕の一ヶ所に Flp リコンビナーゼ標的サイトが導入されている[97]。したがって、Flp-In-293 細胞の基本的な特性は、HEK293 細胞と同様である[126]。また、調製したプラスミドの保存と複製には、DH5α™ (invitrogen)を用いた。

80% Ethanol の調製

Ethanol (NACALAI TESQUE, INC.) (40 ml)と超純水(10 ml)を混合し-30℃にて保管したものを 80% Ethanol とした。

125 mM EDTA の調製

超純水 (75 ml)で 0.5 M EDTA (pH8.0) (25 ml)を希釈して、125 mM に調製した。

1 M DTT の調製

(±)-Dithiothreitol (DTT) (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) (1.542 g)と超純水(10 ml)を混合した物を 1 M DTT とした。

10%(w/v) APS の調製

Ammonium PeroxodiSulfate (APS) (NACALAI TESQUE, INC.) (1 g)を超純水(10 ml)で溶解した物を10%(w/v) APSとした。

10%(w/v) Tween 20の調製

Polyoxyethylene Sorbitan Monolaurate (Tween 20) (NACALAI TESQUE, INC.) (5 g) と超純水 (40 ml) を混合した後、メスシリンダーに全量に移した。そして、超純水を用いて 50 ml にメスアップして調製した物を 10%(w/v) Tween 20 とした。

10× TBS の調製

Tris(hydroxymethyl)aminomethane, Nuclease and Protease tested (NACALAI TESQUE, INC.) と 150 mM NaCl (NACALAI TESQUE, INC.) (87.75 g) を超純水 (950 ml) で溶解した後、メスシリンダーに全量に移した。その後、超純水を用いて 1 L にメスアップした物をオートクレーブ滅菌 (121℃、15 分、2 気圧) して、10× TBS とした。

TBS-T の調製

10× TBS (100 ml) と超純水 (900 ml) を混合し、10%(w/v) Tween 20 (5 ml) を添加して混合した物を TBS-T とした。

5%(w/v) スキムミルク/TBS-T の調製

スキムミルク (MORINAGA MILK INDUSTRY CO., LTD.) (1 g) を TBS-T (20 ml) で溶解した物を 5%(w/v) スキムミルク/TBS-T とした。

Lysis Buffer B(+) の調製

50 mM Tris-HCl (pH7.6)、5 mM EDTA (pH8.0)、120 mM NaCl、1% Triton X-100、Protease inhibitor (NACALAI TESQUE, INC.)、Phosphatase inhibitor (NACALAI TESQUE, INC.)、1mM DTT を超純水に溶解した物を Lysis Buffer B(+) とし、還元型サンプル用の調製に用いた。

Lysis Buffer B(-) の調製

50 mM Tris-HCl (pH7.6)、5 mM EDTA (pH8.0)、120 mM NaCl、1% Triton X-100、Protease inhibitor (NACALAI TESQUE, INC.)、Phosphatase inhibitor (NACALAI TESQUE, INC.)、20 mM NEM を超純水に溶解した物を Lysis Buffer B(-) とし、非還元型サンプルの調製に用いた。

Running Buffer の調製

SDS PAGE 10× Running Buffer (NIPPON GENE CO., LTD.) (100 ml) を超純水 (900 ml) で 10 倍に希釈した物を Running Buffer とした。

2× Running gel buffer の調製

Separating Gel Buffer Solution (4×) for SDS-PAGE (NACALAI TESQUE, INC.) (25 ml)を超純水 (25 ml)で 2 倍に希釈した物を 2× Running gel buffer とした。

2× Stacking gel bufferの調製

Stacking Gel Buffer Solution (4×) for SDS-PAGE (NACALAI TESQUE, INC.) (25 ml)と超純水 (25 ml)で 2 倍に希釈した物を 2× Stacking gel buffer とした。

2× Sample Bufferの調製

Sample Buffer Solution with Reducing Reagent (6×) for SDS-PAGE (NACALAI TESQUE, INC.)を超純水で 3 倍に希釈した物を 2× Sample Buffer とした。

Sample Buffer の調製

Sample Buffer Solution with Reducing Reagent (6×) for SDS-PAGE (NACALAI TESQUE, INC.)を超純水で 6 倍に希釈した物を Sample Buffer とした。

10× Transfer bufferの調製

Glycin, Nuclease and Protease tested (NACALAI TESQUE, INC.) (89.15 g)と Tris(hydroxymethyl)aminomethane, Nuclease and Protease tested (NACALAI TESQUE, INC.) (18.93 g)を超純水 (400 ml)を用いて溶解した物を10× Transfer bufferとした。

Transfer Bufferの調製

10× Transfer buffer (100 ml)とMethanol (200 ml)と超純水 (700 ml)を混合した物を Transfer Bufferとした。

Ponceau S 溶液の調製

Ponceau S, practical grade (Sigma-Aldrich Co. LLC.) (0.5 g)を酢酸 (2.5 ml)を用いて溶解した後、超純水 (47.5 ml)と混合した物をPonceau S溶液とした。

LB/Amp 寒天培地の調製

LB 寒天培地, Lennox (NACALAI TESQUE, INC.) (35 g)を 1 L の超純水に溶解・懸濁させ、オートクレーブ滅菌 (121℃、15 分間、2 気圧)を行った。その後、手で触ることができる温度になったことを確かめた後、50 mg/ml Ampicillin (1 ml) (f.c. = 50 µg/ml)を添加した。そして、φ 90 × 15 mm アズノール滅菌シャーレに注ぎ、冷却して固めた物を LB/Amp 寒天培地とした。

LB/Amp 液体培地の調製

LB 培地, Lennox (NACALAI TESQUE, INC.) (15 g) を 1 L の超純水に溶解・懸濁させ、オートクレーブ滅菌 (121°C、15 分間、2 気圧)を行った。その後、手で触ることができる温度になったことを確かめた後に 50 mg/ml Ampicillin (1 ml) (f.c. = 50 µg/ml)を添加した者を LB/Amp 液体培地とした。

1 M EDTA 水溶液の調製

「第 2 章 第 2 節 1. Calcein assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 1M EDTA 水溶液の調製」と同様に調製した。

0.25%(w/v)Trypsin-1 mM EDTA 溶液の調製

「第 2 章 第 2 節 1. Calcein assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 0.25%(w/v)Trypsin-1 mM EDTA 溶液の調製」と同様に調製した。

変異型 *ABCB1* 遺伝子の作成

当研究室において過去に作製された pcDNA5/FRT/*ABCB1* ベクター (25 ng)と PrimeSTAR MAX DNA Polymerase Mix (Takara) (12.5 µl)、10 µM Primer (0.5 µl) (Tab. 3-3-1) を PCR tube 中で混合し、超純水を添加して 25 µl に調製した。そして、iCycler (BioRAD)を用いて PCR [98°C, 10 秒; (98°C, 10 秒、55°C, 5 秒、72°C, 10 分)×16 サイクル]を行った。その後、電気泳動にて増幅を確認し、テンプレートとして用いた pcDNA5/FRT/*ABCB1* ベクターを分解する為に、メチル化されたプラスミドを分解する制限酵素 Dpn I (TOYOBO) (0.5 µl)を PCR 後の PCR tube に添加し、37°C で 1 時間反応させた (Fig. 3-3-1)。

形質転換

大腸菌 DH5α (Invitrogen)と pcDNA5/FRT/*ABCB1* ベクター、pOG44 ベクター、Dpn I 処理を行った PCR 産物各種をそれぞれ氷冷した 14 ml 遠沈管内で混合し、氷上に 2 分間静置した。そして、42°C のウォーターバスに浸して 45 秒間ヒートショックを行った。ヒートショック後は直ちに氷上に戻し、2 分間静置した。その後、37°C で温めていた SOC 培地 (250 µl)を添加して 250 rpm、37°C の条件で 60 分間培養し、このうちの 30 µl を LB/Amp 寒天培地に塗布して、37°C のインキュベーターで一晩培養を行った。

プラスミド精製

形質転換を行った大腸菌を LB/Amp 寒天培地に塗布した翌日、LB/Amp 寒天培地上に形成されたコロニーを回収し、LB/Amp 液体培地 (5 ml)に懸濁させ、160 rpm、37°C の条件で振盪培養した。この翌日、LB/Amp 液体培地を 10,000 rpm、1 分間、4°C の条件で遠心分

離し、上清を除去した後、ペレットとして残存した大腸菌を QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) に付属する P1 buffer (250 μ l) を用いてほぐし、1.5 ml tube 中に回収した。次いで、回収したペレットに P2 buffer (250 μ l) を加えて転倒混和し、続けて N3 buffer (350 μ l) を加えて転倒混和した。そして、この結果得られた懸濁液を 15,000 rpm、4℃、15 分間の条件で遠心分離して上清を回収した。回収した上清は、QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) に付属するスピнкаラムに充填して 14,500 rpm、室温で 1 分間遠心した。スピнкаラムから溶出された液体を廃棄した後、スピнкаラムに PB Buffer (500 μ l) を添加して 14,500 rpm、室温で 1 分間遠心した。溶出液を再度廃棄した後、スピнкаラムに PE buffer (750 μ l) を添加して 14,500 rpm、室温で 1 分間遠心分離し、溶出液を廃棄した。この後、カラムに残存している液体を除去するために再度 14,500 rpm、室温で 1 分間遠心分離し、スピнкаラムを未使用の 1.5 ml tube に設置して、スピнкаラムに超純水 (50 μ l) を添加した。このスピнкаラムを室温で 1 分間静置した後、14,500 rpm、室温で 1 分間遠心してプラスミドを溶出し、1.5 ml tube にプラスミドを回収した。なお、本研究では、pcDNA5/FRT/ABCB1 (S222G) ベクター、pcDNA5/FRT/ABCB1 (F303G) ベクター、pcDNA5/FRT/ABCB1 (L339G) ベクター、pcDNA5/FRT/ABCB1 (F343G) ベクターおよび pOG44 ベクターの精製を行った。

シーケンス解析

精製したプラスミド [pcDNA5/FRT/ABCB1 (S222G)]、[pcDNA5/FRT/ABCB1 (F303G)]、[pcDNA5/FRT/ABCB1 (L339G)]、[pcDNA5/FRT/ABCB1 (F343G)] をそれぞれテンプレートにして、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いてシーケンス解析を行った。実際には、テンプレート (100 ng) にたいして BigDye 5 $\times$ Buffer (1 μ l)、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit Reaction Mix (2 μ l)、0.8 μ M primer (2 μ l) (Tab. 3-3-2) を PCR tube 中で混合し、総容量が 10 μ l になるように超純水を加えた。そして、これを iCycler (BioRAD) にセットして反応させ (96℃、1 分間)、サイクルシーケンス反応 [(96℃、10 秒、50℃、5 秒、60℃、4 分) $\times$ 25 サイクル] を行った。その後、サイクルシーケンス反応後の PCR tube に 125 mM EDTA (5 μ l) と Ethanol (NACALAI TESQUE, INC.) (60 μ l) を加えて混合し、室温で 1 分間静置した後、遠心した (15,000 rpm、4℃、20 分)。その後、この Tube に 80% Ethanol (60 μ l) を加えて遠心 (15,000 rpm、4℃、10 分) し、上清を廃棄した後に暗所で乾燥させた (室温、10 分)。そして、20 μ l の Hi-DiTM Formamide (Applied Biosystems) でペレットを溶解してヒートショックを行い (95℃、2 分)、5 分間氷冷した。その後、サンプルを Micro AmpTM Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems) に移し、Applied Biosystems 3130 ジェネティックアナライザを用いて塩基配列を解析した。

PBS(-)の調製

「第2章 第2節 1. Calcein assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 PBS(-)の調製」と同様の操作で調製した。

200 mM L-Glutamine の調製

「第2章 第2節 1. Calcein assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 200 mM L-Glutamine の調製」と同様の操作で調製した。

細胞培養用 DMEM の調製

「第2章 第2節 1. Calcein assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 細胞培養用 DMEM の調製」と同様の操作で調製した。

血清の非働化

「第2章 第2節 1. Calcein assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 血清の非働化」と同様の操作で調製した。

Flp-In-293 細胞の培養および継代

Flp-In-293 細胞の培養および継代は、「第2章 第2節 1. Calcein assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 細胞の培養および継代」と同様の操作で行った。ただし、DMEM には、Hygromycin B 溶液ではなくを添加した。

変異型 ABCB1 を安定発現する細胞の樹立

変異型 ABCB1 の機能を野生型 ABCB1 の機能と比較するために、染色体上の同一箇所に1つだけ目的遺伝子を導入することを可能にする Flp-In system™ (Invitrogen) (Fig. 3-3-2) を利用した。具体的には、抗生物質を含まない DMEM 培地を含む 35-mm dish に Flp-In-293 細胞 (Invitrogen) を播種し (1×10^6 cells/dish)、100 ng の pcDNA5/FRT/ABCB1 (S222G) あるいは pcDNA5/FRT/ABCB1 (F303G)、pcDNA5/FRT/ABCB1 (L339G)、pcDNA5/FRT/ABCB1 (F343G) と pOG44 (900 ng) をこの Flp-In-293 細胞に移入した。実際には、ベクター [pcDNA5/FRT/ABCB1 (100 ng)、pOG44 (900 ng)] と Lipofectamin™ 2000 Reagent (1 mg/ml) (Invitrogen) (10 μ l) をそれぞれ Opti-MEM (250 μ l) に懸濁させ、5 分間室温に静置した後、これらを混合した。そして、この混合溶液を 20 分間室温に静置した後、細胞培養液に滴下して培養した。この約 24 時間後、培地を吸引除去し、抗生物質を含む新鮮な DMEM を添加して培養を継続した。この 2 日後、全ての細胞を 100 mm dish に移し、100 μ g/ml Hygromycin 存在下で培養して、遺伝子導入に成功した細胞を選別した。なお、培養は、週に 1 度培地交換を行いながら 1 ヶ月間行った。Hygromycin 耐性を示す細胞がコロニーを形成した場合には、継代を繰り返し、それぞれの細胞を Flp-In-293/ABCB1 (S222G) 細胞および Flp-In-293/ABCB1 (F303G) 細胞、Flp-In-293/ABCB1 (L339G) 細胞、

Flp-In-293/ABCB1 (F343G)細胞として実験に使用した。

樹立した細胞の培養および継代

樹立した細胞 [Flp-In-293/ABCB1 (S222G)細胞、Flp-In-293/ABCB1 (F303G)細胞、Flp-In-293/ABCB1 (L339G)細胞、Flp-In-293/ABCB1 (F343G)細胞]の培養および継代は、「第2章 第2節 1. Calcein assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価細胞の培養および継代」と同様の操作で行った。

Cell lysate の調製

Flp-In-293/Mock 細胞および Flp-In-293/ABCB1 (S222G)細胞、Flp-In-293/ABCB1 (F303G)細胞、Flp-In-293/ABCB1 (L339G)細胞、Flp-In-293/ABCB1 (F343G)細胞をそれぞれ 35 mm dish に播種した (1×10^6 cells/dish)。3 日間培養した後、培地を除去して PBS(-) (1 ml)を添加し、ピペッティングを繰り返しながら細胞を剥離して 1.5 ml tube 中に回収した。次いで、この 1.5 ml tube を遠心し($300 \times g$ 、 4°C 、5 分)、上清を廃棄した。そして、ペレットが残る 1.5 ml tube に Lysis Buffer B(+) (100 μl)あるいは Lysis Buffer B(-) (100 μl)を添加して細胞を溶解した。実際には、この細胞溶解液を 27 G Needle(Terumo)に 10 回通過させて均質化した。細胞溶解液を均質化した後は、この溶解液を遠心し (3000 rpm、 4°C 、10 分)、得られた上清を Cell lysate として用いた。

Cell lysate のタンパク質濃度の定量

Cell lysate のタンパク質濃度は、Protein Assay CBB Solution (5 $\times$) CBB (NACALAI TESQUE, INC.)を用いて定量した。実際には、1.5 ml tube 中に超純水 (200 μl)と Protein Assay CBB Solution (5 $\times$) CBB (NACALAI TESQUE, INC.) (700 μl)を添加した後、超純水 (98 μl)と Cell lysate (2 μl)を順に添加して合計 1000 μl とし、転倒混和を行った。なお、検量線作成用の試料として、超純水 (200 μl)と Protein Assay CBB Solution (5 $\times$) CBB (NACALAI TESQUE, INC.) (700 μl)を混合した 1.5 ml tube に 98.75、97.5、95、92.5 あるいは 90 μl の超純水と 1.25、2.5、5、7.5 あるいは 10 μl の 2 mg/ml BSA をそれぞれ順に添加した試料も調製した。これらの溶液を調製した後は、室温で 20 分間静置し、吸光度 (570 nm)を測定して検量線から cell lysate のタンパク質濃度を算出した。

N結合型糖鎖の除去

Lysis Buffer B(+)を用いて還元条件下で調製した cell lysate については、PNGase F (NEW ENGLAND Bio Labs® Inc.)を用いて N結合型糖鎖の除去を行った。実際には、50 μg のタンパク質を含む cell lysate に 0.3 μl の PNGase F を添加し、 37°C のウォーターバスにて 10 分間処理した。

SDS-PAGE 用サンプルの調製

調製した cell lysate および PNGase F 処理後の cell lysate を Sample Buffer Solution with Reducing Reagent (6×) for SDS-PAGE (NACALAI TESQUE, INC.) と 5 : 1 の割合で混合し、室温に約 20 分間静置したものを SDS-PAGE 用サンプルとした。

7.5%(w/v)ポリアクリルアミドゲルの作製

2× Running gel buffer (4 ml)、超純水 (2 ml)、30(w/v)%-Acrylamide/Bis Mixed Solution (37.5:1) (30% Acrylamide) (NACALAI TESQUE, INC.)、10%(w/v) APS (100 µl) を 15 ml 遠沈管の中で混合し、TEMED (12 µl) を添加して混合した後、直ちに事前に組み合わせたゲル板の間に注ぎ込んだ(Running gelの調製)。なお、Running gel を注いだ後には、イソプロパノールを重層し、室温にて静置した。Running gelが固まったことを確認した後は、Running gel に重層したイソプロパノールを除去した。また、2× Stacking gel buffer (1.5 ml)、超純水 (1.2 ml)、30(w/v)%-Acrylamide/Bis Mixed Solution (37.5:1) (30% Acrylamide) (NACALAI TESQUE, INC.) (300 µl)、10%(w/v) APS (50 µl) を 15 ml 遠沈管の中で混合し、TEMED (6 µl) を添加して混合した後、直ちにRunning gelの上層に重層させた (Stacking gelの調製)。なお、Stacking gelを注いだ後は、12レーン用のコームをゲル板の間に挿入し、室温にて静置した。

SDS-PAGE

作製した7.5%(w/v)ポリアクリルアミドゲルを泳動層にセットして、Running Bufferを泳動層に注いだ。そして、SDS-PAGE用サンプルを各レーンに充填した (10 µg/レーン)。その後、空いているレーンにSample Bufferを充填して、電気泳動を行った。なお、試料がStacking gel中に存在する間は60 V、3 A、300 Wの条件で泳動を行い、Running gelに試料が移動した後は、150 V、3 A、300 Wの条件で電気泳動を行った。

Western blotting

SDS PAGE 終了後、ゲル板からゲルを回収し、ゲル中のタンパク質をニトロセルロース膜に転写した。具体的には、CHROMATOGRAPHY PAPER (GE Healthcare Life Sciences, Inc.)、ニトロセルロースメンブレン (GE Healthcare Life Sciences, Inc.) に Trasfer buffer を染みこませ、泳動後のゲルと共に TRANS-BLOT® SD SEMI-DRY TRANSFER CELL (Bio-Rad Laboratories, Inc.)の電極板上で重ね合わせた。実際には、Trasfer buffer を染みこませた CHROMATOGRAPHY PAPER を 3 枚重ねで TRANS-BLOT® SD SEMI-DRY TRANSFER CELL の電極上に敷き、この上にニトロセルロースメンブレン (GE Healthcare Life Sciences, Inc.)を重ね、次いで、泳動後のゲルを重ねた。そして、この上に CHROMATOGRAPHY PAPER を 3 枚重ね、TRANS-BLOT® SD SEMI-DRY TRANSFER CELL の蓋を被せた。一連の操作後は、15 V、3 A、300 W の条件でゲル中の

タンパク質をニトロセルロースメンブレンに転写した。なお、転写の成否は、転写後のニトロセルロースメンブレンを Ponceau S 溶液で染色して評価した。転写に成功していた場合には、スキムミルクを用いて、ニトロセルロースメンブレン上で泳動試料が存在しない部分をブロッキングした。実際には、転写後のニトロセルロースメンブレンを 5%(w/v)スキムミルク/TBS-T に浸し、往復振盪処理を施し（室温、1 時間）、抗体処理を行うまで 4℃に静置した。

抗体処理には、一次抗体として Anti-P-glycoprotein Mouse mAb (C219) (CALBOCHEM) または Anti-GAPDH-Clone 6C5 mouse monoclonal, igG2b (GAPDH Specific antibody) (American Research Products)、二次抗体として Anti-mouse igG, HRP-linked Antibody (Cell Signaling)を用いた。実際には、ブロッキング後のニトロセルロースメンブレンを TBS-T (5 ml)で 2 回洗浄した後、5%(w/v)スキムミルク/TBS-T で 1000 倍希釈した一次抗体溶液にニトロセルロースメンブレンを浸し、この溶液を往復振盪させて抗原抗体反応を促した（1 時間、室温）。抗体処理後は、抗体溶液を回収し、TBS-T (5 ml)を加えて往復振盪させ、非特異的に結合している抗体を除去した。なお、TBS-T は、10 分に一度交換し、計 6 回 TBS-T で一次抗体処理後のニトロセルロースメンブレンを洗浄した。この後、5%(w/v)スキムミルク/TBS-T で 1000 倍希釈した二次抗体溶液にニトロセルロースメンブレンを浸し、この溶液を往復振盪させて抗原抗体反応を促した（1 時間、室温）。抗体処理後は、抗体溶液を回収し、TBS-T (5 ml)を加えて往復振盪させ、非特異的に結合している抗体を除去した。なお、TBS-T は、10 分に一度交換し、計 6 回 TBS-T で二次抗体処理後のニトロセルロースメンブレンを洗浄した。一連の操作後、WESTERN LIGHTNING™ Chemiluminescence Reagent Plus (Perkin Elmer®)をニトロセルロースメンブレンに滴下し、二次抗体に結合している HRP による化学発光を促した。そして、WSE-6100LuminoGraph I (ATTO)を用いて化学発光を検出した。

[結果]

変異型 ABCB1 を安定発現する細胞の樹立

Flp-In-293 細胞に pOG44 および pcDNA5/FRT/*ABCB1* (*S222G*)あるいは、pcDNA5/FRT/*ABCB1* (*F303G*)、pcDNA5/FRT/*ABCB1* (*L339G*)、pcDNA5/FRT/*ABCB1* (*F343G*)を移入した結果、Hygromycin B 耐性の細胞を得ることができた。これらの細胞から cell lysate を調製して western blotting を行った結果、樹立した全ての細胞において Anti-P-glycoprotein Mouse mAb (C219) (CALBOCHEM)に結合した二次抗体由来のシグナルが検出された(Fig. 3-3-3)。また、PNGase F 処理した試料を泳動したレーンにおいては、PNGase F 未処理の試料を泳動したレーンと比して低分子量側に、このシグナルが検出された(Fig. 3-3-3)。

[考察]

変異型 ABCB1 を安定発現する細胞の樹立

Flp-In-293 細胞に pOG44 および pcDNA5/FRT/*ABCB1* (*S222G*)あるいは、pcDNA5/FRT/*ABCB1* (*F303G*)、pcDNA5/FRT/*ABCB1* (*L339G*)、pcDNA5/FRT/*ABCB1* (*F343G*)を移入して得られた Hygromycin B 耐性細胞から cell lysate を調製して western blotting を行った結果、Anti-P-glycoprotein Mouse mAb (C219) (CALBOCHEM)に結合した二次抗体由来のシグナルが検出された。したがって、樹立した細胞に ABCB1 が発現していることが示唆された。また、Anti-P-glycoprotein Mouse mAb (C219) (CALBOCHEM)に結合した二次抗体に由来するシグナルが PNGase F 処理した試料において低分子量側にシフトしたことから、Anti-P-glycoprotein Mouse mAb (C219) (CALBOCHEM)が結合したタンパク質に N 結合型糖鎖が付加していることが示唆された。Anti-P-glycoprotein Mouse mAb (C219) (CALBOCHEM)に結合した二次抗体由来のシグナルが検出された位置が 140 kDa 付近であったことから、Flp-In-293/*ABCB1* (*S222G*)細胞、Flp-In-293/*ABCB1* (*F303G*)細胞、Flp-In-293/*ABCB1* (*L339G*)細胞、Flp-In-293/*ABCB1* (*F343G*)細胞の樹立に成功したと結論付けた。

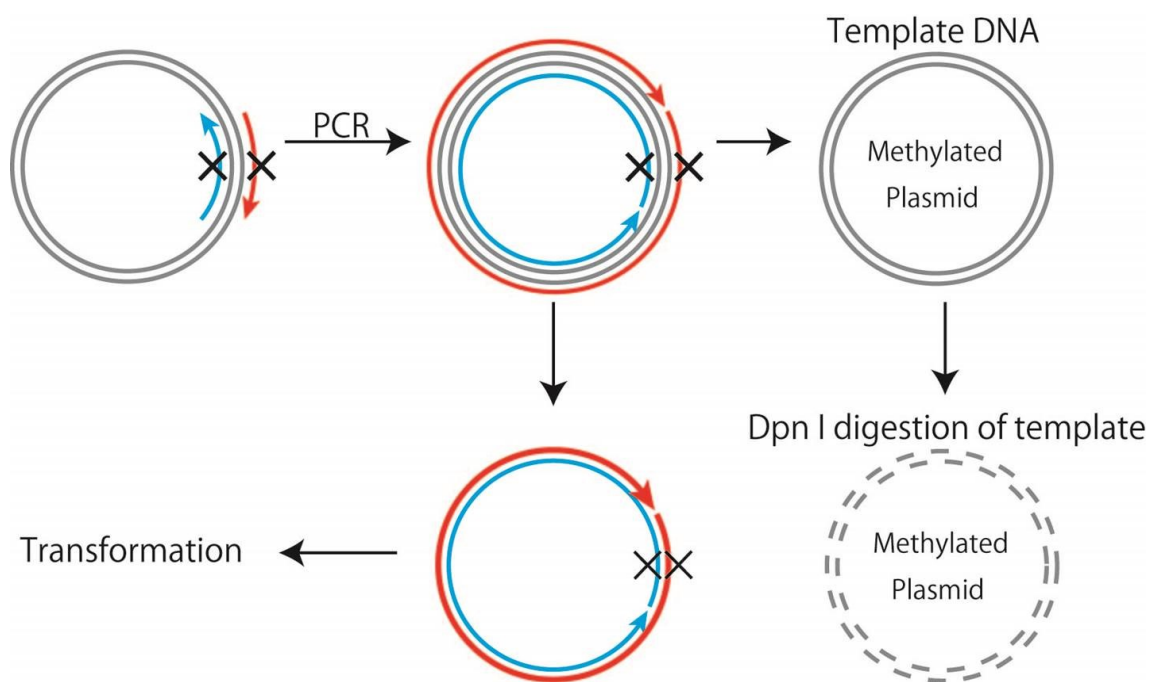


Fig. 3-3-1 site-direct mutagenesis

目的の変異を持つプライマーを用いて PCR を行い、メチル化されたテンプレートを切断する制限酵素 Dpn I を用いることによって、目的ベクターを大腸菌に生産させることができる。

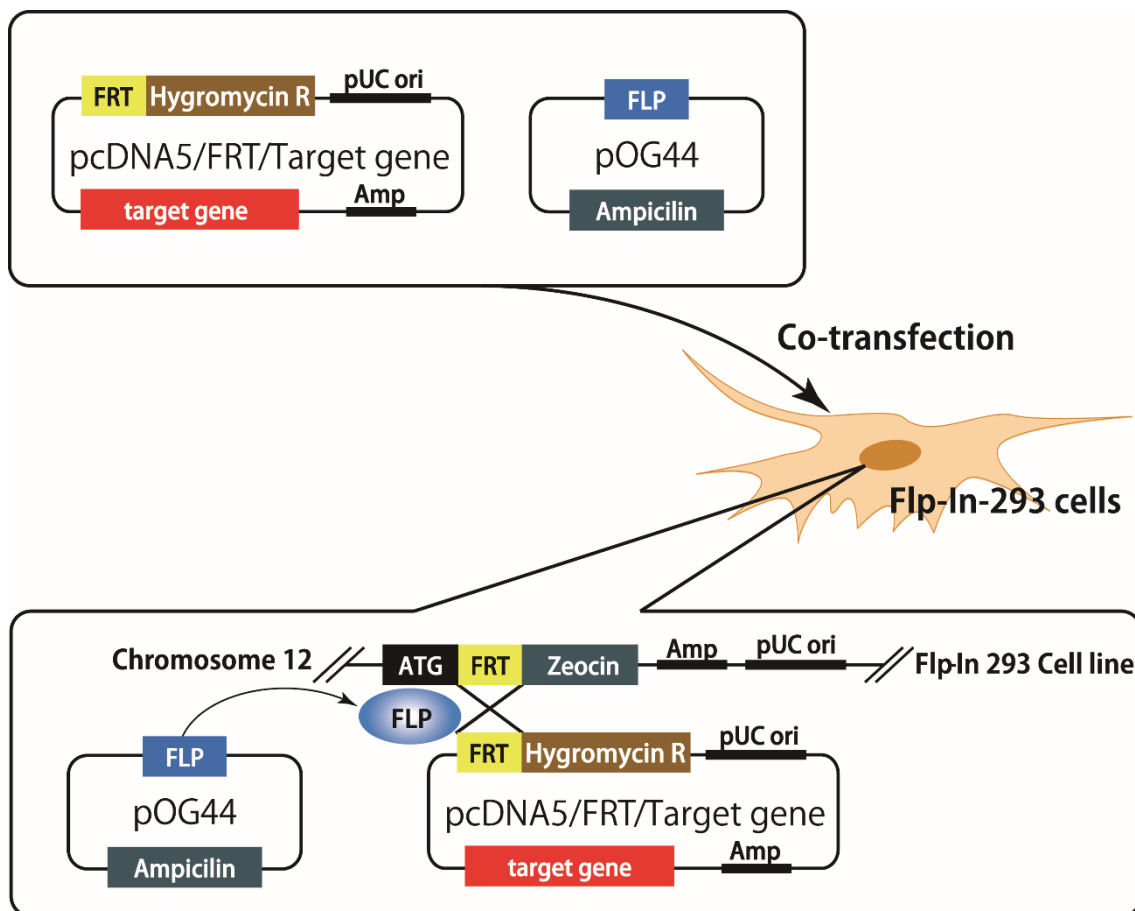


Fig. 3-3-2 Flp-In system の原理

pcDNA5/FRT/ABCB1 と SNP バリエントを組み込んだベクターと pOG44 を同時に導入すると pOG44 より発現したリコンビナーゼによって FRT 部位特異的に目的遺伝子を導入する事ができる。

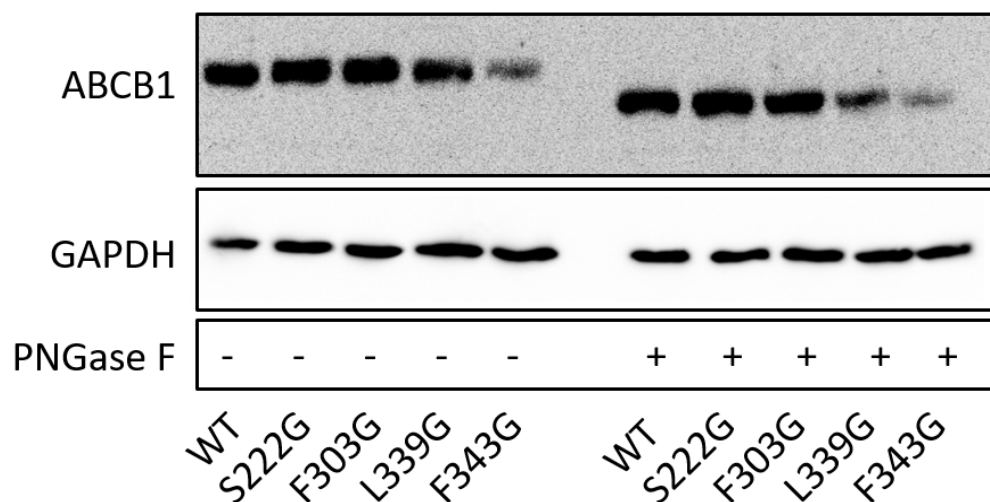


Fig. 3-3-3 Western Blotting を用いた変異型 ABCB1 の検出

Flp-In-293/ABCB1 細胞 および Flp-In-293/ABCB1(S222G) 細胞、Flp-In-293/ABCB1(F303G)細胞、Flp-In-293/ABCB1(L339G)細胞、Flp-In-293/ABCB1(F343G)細胞からそれぞれ調製した細胞溶解液を用いた。また、それぞれのサンプルは糖鎖を除去する酵素である PNGase F を用いて処理したものと処理していないものを利用した。なお、コントロールとしてハウスキーピングタンパク質である GAPDH を検出した。

Tab. 3-3-1 変異導入用プライマー

Mutation	Type	Primer sequence
S222G	Fwd	5- GTGATTTTGGCCATCGGTCCTGTTCTTGA-3
	Rev	5- TCCAAGAACAGGACCGATGGCCAAAATCAC-3
G226L	Fwd	5- CCATCAGTCCTGTTCTTTTACTGTCAGCTGCTGTC-3
	Rev	5-GACAGCAGCTGACAGTAAAAGAACAGGACTGATGG-3
F303G	Fwd	5- TTCTATAGGTGCTGCTGGCCTGCTGATCTATGCA-3
	Rev	5- TGCATAGATCAGCAGGCCAGCAGCACCTATAGAA-3
L339G	Fwd	5-CTGTATTCTTTTCTGTAGGAATTGGGGCTTTTAGTGTTGG-3
	Rev	5- CCAACACTAAAAGCCCCAATTCCTACAGAAAAGAATACAG-3
F343G	Fwd	5- CTGTATTAATTGGGGCTGGTAGTGTTGGACAGGCATC-3
	Rev	5- GATGCCTGTCCAACACTACCAGCCCCAATTAATACAG-3

Tab. 3-3-2 Sequence 解析用プライマー

Primer name	Primer sequence
B1-seq1	5-AGCTTAACACCCGACTT-3
B1-seq2	5-AGGCATCTCCAAGCATT-3
B1-seq3	5-CTGTCAAGGAAGCCAAT-3
B1-seq4	5-AGTACCAAAGAGGCTCT-3
B1-seq5	5-TTGCTGTAATTACCCAGA-3
B1-seq6	5-ATATCAGCAGCCCACAT-3

2. 細胞の薬剤感受性にたいする変異型 ABCB1 の影響の評価

[材料および方法]

試薬

Daunorubicin

Taxol

細胞

「第2章 第2節 1. Calcein assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 細胞」で用いた Flp-In-293/Mock 細胞と Flp-In-293/ABCB1 細胞および「第3章 第3節 1. 変異型 ABCB1 を安定発現する細胞の樹立」で樹立した Flp-In-293/ABCB1 (S222G)細胞と Flp-In-293/ABCB1 (F303G)細胞、Flp-In-293/ABCB1 (L339G)細胞、Flp-In-293/ABCB1 (F343G)細胞を用いた。

PBS(-)の調製

「第2章 第2節 1. Calcein assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 PBS(-)の調製」と同様の操作で調製した。

200 mM L-Glutamine の調製

「第2章 第2節 1. Calcein assayを用いたABCB1とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 200 mM L-Glutamineの調製」と同様の操作で調製した。

細胞培養用 DMEM の調製

「第2章 第2節 1. Calcein assayを用いたABCB1とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 細胞培養用DMEMの調製」と同様の操作で調製した。

血清の非働化

「第2章 第2節 1. Calcein assayを用いたABCB1とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 血清の非働化」と同様の操作で調製した。

1 M EDTA 水溶液の調製

「第2章 第2節 1. Calcein assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 1M EDTA 水溶液の調製」と同様に調製した。

0.25%(w/v)Trypsin-1 mM EDTA 溶液の調製

「第2章 第2節 1. Calcein assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 0.25%(w/v)Trypsin-1 mM EDTA 溶液の調製」と同様に調製した。

変異型 ABCB1 を安定発現する細胞の培養および継代

樹立した Flp-In-293/ABCB1 (S222G)細胞および Flp-In-293/ABCB1 (F303G)細胞、Flp-In-293/ABCB1 (L339G)細胞、Flp-In-293/ABCB1 (F343G)細胞の培養および継代は、「第 2 章 第 2 節 1. Calcein assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価細胞の培養および継代」と同様の操作で行った。

MTT Assay

「第 2 章 第 2 節 3. MTTase assay を用いた ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用評価 MTT assay」と同様の操作で実施した。なお、試験化合物には Daunorubicin および Taxol を選定した。

[結果]

細胞の薬剤感受性にたいする変異型 ABCB1 の影響の評価

「第 2 章 1. 変異型 ABCB1 を安定発現する細胞の樹立」において樹立に成功した Flp-In-293/ABCB1 (S222G)細胞、Flp-In-/ABCB1 (F303G)細胞、Flp-In-293/ABCB1 (L339G)細胞、Flp-In-293/ABCB1 (F343G)細胞を用いて Daunorubicin 感受性および Taxol 感受性を「MTT assay」にて評価した(Tab. 3-3-3)(Fig. 3-3-4)。IC₅₀ 値を比較した結果、Flp-In-293/ABCB1 (S222G)細胞の Daunorubicin 感受性は、Flp-In-293/ABCB1 (WT)細胞に比して約 3 倍高かった。また、Flp-In-293/ABCB1 (F303G)細胞と Flp-In-293/ABCB1 (L339G)細胞の Daunorubicin 感受性は、Flp-In-293/ABCB1 (WT)細胞に比して約 2 倍高かった。Flp-In-293/ABCB1 (F343G)細胞の Daunorubicin 感受性は、Flp-In-293/ABCB1 (WT)細胞に比して約 10 倍の感受性を示し、Flp-In-293/Mock 細胞と同程度であった(Tab. 7)。一方、Flp-In-293/ABCB1 (S222G)細胞の Taxol 感受性は、Flp-In-293/ABCB1 (WT)細胞と同程度であった。また、Flp-In-293/ABCB1 (F303G)細胞と Flp-In-293/ABCB1 (L339G)細胞の Taxol 感受性は、Flp-In-293/ABCB1 (WT)細胞に比して約 2 倍高かった。Flp-In-293/ABCB1 (F343G)細胞の Taxol 感受性は、Flp-In-293/ABCB1 (WT)細胞に比して約 3 倍高かった。

[考察]

細胞の薬剤感受性にたいする変異型 ABCB1 の影響の評価

樹立に成功した Flp-In-293/ABCB1 (S222G)細胞、Flp-In-/ABCB1 (F303G)細胞、Flp-In-293/ABCB1 (L339G)細胞、Flp-In-293/ABCB1 (F343G)細胞を用いて Daunorubicin 感受性および Taxol 感受性を「MTT assay」にて評価した結果、それぞれの ABCB1 が異なる抗がん剤感受性を細胞に与えることを見出した。Flp-In-293/ABCB1 (S222G)細胞および Flp-In-/ABCB1 (F303G)細胞における ABCB1 の細胞内存在量が Flp-In-293/ABCB1 (WT)細胞と同程度であったことから、Flp-In-293/ABCB1 (S222G)細胞および Flp-In-/ABCB1

(F303G)細胞において Daunorubicin 感受性が Flp-In-293/ABCB1 (WT)細胞と異なった理由は、ABCB1 を構成するアミノ酸の一つをグリシンに置換したことにあると考えられる。これまでの研究において、アミノ酸置換が ABC 輸送体の細胞内安定性や細胞内分布、基質特異性に影響を及ぼすことが明らかにされている[149,150]。したがって、Ser222 と Phe303 は、ABCB1 の細胞内分布もしくは基質特異性にとって重要である可能性が示唆される。一方、Flp-In-293/ABCB1 (WT)細胞と比して ABCB1 の細胞内存在量が低下していた Flp-In-293/ABCB1 (L339G)細胞および Flp-In-293/ABCB1 (F343G)細胞については、Leu339 と Phe343 が ABCB1 の細胞内安定性にとって重要である可能性が考えられる。

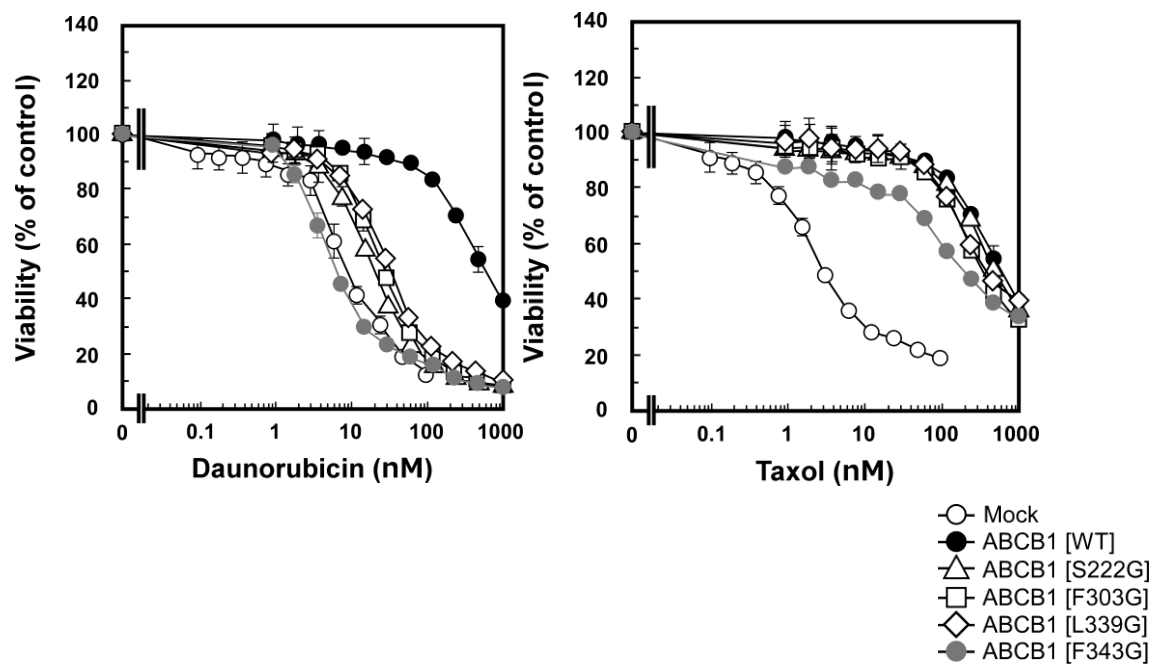


Fig. 3-3-4 MTT Assay を用いた変異型 ABCB1 の基質抗がん剤にたいする細胞生存率
縦軸を細胞生存率として、横軸を化合物の濃度とした。また、白丸を Mock 細胞、黒丸を ABCB1/WT、白三角を ABCB1/S222G、白四角を ABCB1/F303G、白菱形を ABCB1/L339G、灰丸を ABCB1/F343G の細胞生存率とした。

Tab. 3-3-3 MTT Assay を用いた変異型 ABCB1 を発現する細胞の基質抗がん剤にたいする半数阻害値

Cell type	IC ₅₀					
	Doxorubicin			Taxol		
Flp-In-293/Mock	8.86	±	2.35	3.53	±	1.23
Flp-In-293/ABCB1	76.68	±	8.71*	624.12	±	118.67*
Flp-In-293/ABCB1 (S222G)	25.28	±	6.68**	655.21	±	125.8*
Flp-In-293/ABCB1 (F303G)	37.04	±	15.69**	350.43	±	25.15* **
Flp-In-293/ABCB1 (L339G)	42.00	±	12.12* **	431.09	±	64.57*
Flp-In-293/ABCB1 (F343G)	7.87	±	2.11**	210.37	±	18.75**

*=P<0.01 (vs Mock), **=P<0.01 (vs ABCB1 WT)

第4節 結言

ABC 輸送体の存在は、がんの克服を目指す人類にとって、大きな障壁の一つである。そのため、細胞に多剤耐性を与える ABC 輸送体 ABCB1 の基質認識機構と基質輸送機構は、その同定以来、精力的に研究されている。本研究では、ABCB1 が認識する化学構造に関する理解を深め、ABCB1 による基質認識に重要なアミノ酸残基を明らかにすることを目指した。

実際には、ABCB1 の基質を新たに見出すことを目指し、第 2 章において南米原産植物 *Pterogyne Nitens* (Fig. 2-2-2)に含まれるグアニジンアルカロイド Galedine、Nitensidine A、Pterogynine、Pterogynidine (Fig. 2-2-3) [123,131]、生薬「辛夷 (シンイ)」に含まれるリグナン Epimagnolin A および Fargesin、Kobusin (Fig. 2-3-1) [69]、胡麻に含まれるリグナン (Fig. 2-4-1)が ABCB1 の基質である可能性を見出した。

第 3 章では、ABCB1 の新たな基質と ABCB1 の構造モデルを用いて docking study を実施し、ABCB1 による基質認識に重要なアミノ酸残基を推定した。そして、ABCB1 による基質認識に重要であると推定されたアミノ酸残基をグリシンに置換し、ABCB1 による基質認識における当該アミノ酸残基の重要性を検証した。その結果、Ser222 と Phe303 が、ABCB1 による基質認識に重要である可能性を見出した。また、Leu339 と Phe343 が ABCB1 の細胞内安定性にとって重要である可能性を見出した。

本研究において ABCB1 の基質認識あるいは細胞内安定性に影響を及ぼす可能性を見出した 4 つのアミノ酸残基 (Ser222、Phe303、Leu339、Phe343)のうち、Phe303、Leu339、Phe343 については、基質認識に重要である可能性が報告されている[151,152]。また、本研究において ABCB1 の基質認識あるいは細胞内安定性に影響を及ぼす可能性を見出した 4 つのアミノ酸残基 (Ser222、Phe303、Leu339、Phe343)は、のうち、Ser222、Leu339、Phe343 については、ABCB1 の基質である Verapamil との相互作用に関係することが報告されている[148]。ABCB1 は、多くの酵素とは異なり、構造が異なる多数の化合物を基質として認識する。したがって、基質認識において中心的な役割を担うアミノ酸残基と基質特異的に関与するアミノ酸残基が存在する可能性が考えられる。

第4章 総括

我が国では社会の高齢化が世界に例をみない速度で進行しており、2065年には、現役世代1.3人で高齢者1人を支える必要があると推計されている[96]。したがって、高齢者を支える現役世代の確保・維持は、我が国が社会の高齢化と健全に向き合い続けるために不可欠である。厚生労働省が発表した2016年度人口動態統計によると、1981年以来、「がん」は、我が国における死因別死亡数の第1位であり、日本人の2人に1人が罹患し、3人に1人の死因になる。したがって、「がん」の克服は、焦眉の急である。

がんの治療法には、外科的な手法を用いた「手術療法」、放射線を用いた「放射線療法」、抗がん剤をはじめとする薬物を用いた「化学療法」が存在する。本研究では、8割以上のがん患者が受けている「化学療法」に注目し、特に、がん治療の現場で大きな問題になっている「がん細胞の薬剤耐性」に注目した。実際には、1976年に存在が明らかにされ、「がん」に薬剤耐性を与える因子として注目を集めているABCB1(P糖タンパク質, P-gp, MDR1)を研究題材に採用した。「がんの化学療法」を成功に導くためには、薬物を輸送するABCB1の機能を理解・制御することは不可欠である。そこで、本研究では、ABCB1が認識する化学構造に関する理解を深め、ABCB1による基質認識に重要なアミノ酸残基を明らかにすることを目指した。

第2章では、今日使用されている薬物のリード化合物を多数提供してきた天然物に注目して南米原産植物 *Pterogyne Nitens* (Fig. 2-2-2)に含まれるグアニジンアルカロイド Galedine、Nitensidine A、Pterogynine、Pterogynidine が ABCB1 の基質であることを新たに見出した[123,131]。また、漢方薬に注目して生薬「辛夷(シンイ)」に含まれるリグナン Epimagnolin A および Fargesin、Kobusin が ABCB1 の基質であることを新たに見出した[69]。そして、Epimagnolin A および Fargesin、Kobusin の類縁体が含まれる胡麻に注目して、胡麻リグナンの多くが ABCB1 の基質である可能性を見出した。さらに、これらの化合物の構造に着目し、ABCB1 との相互作用に重要は基質側の部分構造も明らかにした。具体的には、ABCB1 とグアニジンアルカロイドの相互作用において、「ゲラニル基の数」および「グアニジン構造におけるゲラニル基の結合部位」が重要であることを見出した。また、ABCB1 と辛夷リグナンとの相互作用において、ベンゾジオキソール構造がトリメトキシフェニル構造に置換されることによって ABCB1 にたいする親和性が高くなる可能性を見出した。さらに、furo[3,4-c]furan 構造が形成する面にたいして2つのベンゾジオキソール構造が同じ側にある場合には ABCB1 と相互作用し難くなり、furo[3,4-c]furan 構造とベンゾジオキソール構造が(+)-2-Episesaminol、(+)-6-Episesaminol、(+)-Sesaminol のような位置関係にある場合には、ABCB1 と相互作用しやすくなる可能性を見出した。

第3章では、2009年に明らかにされたマウス Abcb1a のX線結晶構造(PDB code: 3G60)を活用し、第2章で得られた知見に基づいて「Docking Simulation」を実施した。そして、基質認識に重要である ABCB1 上のアミノ酸残基として、Ser222、Phe303、Tyr307、Leu339、

Ala342、Phe343 を見出した。そこで、第 3 節において、基質認識に重要なアミノ酸残基として推定した箇所に一塩基変異を導入した変異型 ABCB1 を作出し、基質認識における当該アミノ酸残基の重要性を評価することを目指した。実際には、変異型 ABCB1 をそれぞれ安定発現する細胞を樹立し、抗がん剤感受性に及ぼす影響を評価した。そして、Ser222 および Phe303 が ABCB1 による薬剤耐性に重要な役割を果たしている可能性を見出し、Leu339 および Phe343 が ABCB1 の細胞内安定性に影響を及ぼす可能性を見出した。

我々が経口摂取した薬物および食品中の成分は、一般に小腸から吸収され、肝臓で代謝を受けた後、全身に分布する。そして、胆管や腎臓を経て体外へと排泄される。この吸収、分布、代謝、排泄のうち、代謝以外の工程を担っているのが ABCB1 を始めとする ABC 輸送体である。したがって、本研究で見出した知見は、「がん」の抗がん剤耐性機構の理解に加えて、抗がん剤および辛夷リグナン、胡麻リグナンの体内動態の理解にも繋がる点において大きな意味を有する。これらの知見に基づいて提案される新たな研究が人類を「がん」の克服に導いてくれることを期待したい。

参考文献

- 1 中川恵一 (2006) ビジュアル版 がんの教科書.
- 2 橋爪 由美子 菊池 雄三 癌の放射線治療. .
- 3 一郎北里 (2003) 化学療法の黎明期. .
- 4 白坂 哲彦 (2003) RAD-AR News. *RAD-AR News* **14**, 8.
- 5 田口鐵男 (1995) 第 I 相試験. 癌と化学療法 **22(5)**, 603–606.
- 6 仁井谷久暢 (1995) 第 II 相試験. 癌と化学療法 **22(5)**, 607–610.
- 7 古瀬清行 (1995) 第 III 相試験. 癌と化学療法 **22(5)**, 611–615.
- 8 山本信之 (2014) もっと知ってほしいがんの分子治療薬のこと.
- 9 Cho H-S, Mason K, Ramyar KX, Stanley AM, Gabelli SB, Denney DW & Leahy DJ (2003) Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature* **421**, 756–760.
- 10 McNeil C (1998) Herceptin raises its sights beyond advanced breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **90**, 882–3.
- 11 Lyseng-Williamson K & Jarvis B (2001) Imatinib. *Drugs* **61**, 1765–74–6.
- 12 Beran M, Cao X, Estrov Z, Jeha S, Jin G, O'Brien S, Talpaz M, Arlinghaus RB, Lydon NB & Kantarjian H (1998) Selective inhibition of cell proliferation and BCR-ABL phosphorylation in acute lymphoblastic leukemia cells expressing Mr 190,000 BCR-ABL protein by a tyrosine kinase inhibitor (CGP-57148). *Clin. Cancer Res.* **4**, 1661–72.
- 13 Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S, Zimmermann J & Lydon NB (1996) Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat. Med.* **2**, 561–6.
- 14 Anderson NG, Ahmad T, Chan K, Dobson R & Bundred NJ (2001) ZD1839 (Iressa), a novel epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitor, potently inhibits the growth of EGFR-positive cancer cell lines with or without erbB2 overexpression. *Int. J. cancer* **94**, 774–82.
- 15 Freeze BS, McNulty MM & Hanck DA (2006) State-Dependent Verapamil Block of the Cloned Human Cav3.1 T-Type Ca²⁺ Channel. *Mol. Pharmacol.* **70**, 718–726.
- 16 Endicott JA & Ling V (1989) The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Annu. Rev. Biochem.* **58**, 137–71.
- 17 Riordan JR, Deuchars K, Kartner N, Alon N, Trent J & Ling V Amplification of P-glycoprotein genes in multidrug-resistant mammalian cell lines. *Nature* **316**, 817–9.
- 18 Navin N, Kendall J, Troge J, Andrews P, Rodgers L, McIndoo J, Cook K, Stepansky A, Levy D, Esposito D, Muthuswamy L, Krasnitz A, McCombie WR, Hicks J & Wigler M (2011) Tumour evolution inferred by single-cell sequencing. *Nature* **472**, 90–94.

- 19 中村 成夫 (2013) 薬物代謝の化学反応. 日医大医会誌 **9**, 25–30.
- 20 Dean M, Rzhetsky A & Allikmets R (2001) The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res.* **11**, 1156–66.
- 21 Dean M, Hamon Y & Chimini G (2001) The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J. Lipid Res.* **42**, 1007–17.
- 22 Chen C jie, Chin JE, Ueda K, Clark DP, Pastan I, Gottesman MM & Roninson IB (1986) Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell* **47**, 381–389.
- 23 de Jong FA, de Jonge MJA, Verweij J & Mathijssen RHJ (2006) Role of pharmacogenetics in irinotecan therapy. *Cancer Lett.* **234**, 90–106.
- 24 Juliano RL & Ling V (1976) A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *BBA - Biomembr.* **455**, 152–162.
- 25 Ueda K, Cornwell MM, Gottesman MM, Pastan I, Roninson IB, Ling V & Riordan JR (1986) The *mdr1* gene, responsible for multidrug-resistance, codes for P-glycoprotein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **141**, 956–62.
- 26 Kimura Y, Kioka N, Kato H, Matsuo M & Ueda K (2007) Modulation of drug-stimulated ATPase activity of human MDR1/P-glycoprotein by cholesterol. *Biochem. J.* **401**, 597–605.
- 27 Austin Doyle L & Ross DD (2003) Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2). *Oncogene* **22**, 7340–7358.
- 28 Oldfield S, Lowry C, Ruddick J & Lightman S (2002) ABCG4: a novel human white family ABC-transporter expressed in the brain and eye. *Biochim. Biophys. Acta* **1591**, 175–9.
- 29 Ravna AW, Sylte I & Sager G (2009) Binding site of ABC transporter homology models confirmed by ABCB1 crystal structure. *Theor. Biol. Med. Model.* **6**, 20.
- 30 Remaley AT, Rust S, Rosier M, Knapper C, Naudin L, Broccardo C, Peterson KM, Koch C, Arnould I, Prades C, Duverger N, Funke H, Assman G, Dinger M, Dean M, Chimini G, Santamarina-Fojo S, Fredrickson DS, Deneffe P & Brewer HB (1999) Human ATP-binding cassette transporter 1 (ABC1): genomic organization and identification of the genetic defect in the original Tangier disease kindred. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 12685–90.
- 31 Macé S, Cousin E, Ricard S, Génin E, Spanakis E, Lafargue-Soubigou C, Génin B, Fournel R, Roche S, Haussy G, Massey F, Soubigou S, Bréfort G, Benoit P, Brice A, Campion D, Hollis M, Pradier L, Benavides J & Deleuze J-F (2005) ABCA2 is a strong genetic risk factor for early-onset Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.* **18**, 119–25.
- 32 Shulenin S, Noguee LM, Annilo T, Wert SE, Whitsett JA & Dean M (2004) ABCA3 gene

- mutations in newborns with fatal surfactant deficiency. *N. Engl. J. Med.* **350**, 1296–303.
- 33 Martínez-Mir A, Paloma E, Allikmets R, Ayuso C, del Rio T, Dean M, Vilageliu L, González-Duarte R & Balcells S (1998) Retinitis pigmentosa caused by a homozygous mutation in the Stargardt disease gene ABCR. *Nat. Genet.* **18**, 11–2.
- 34 Maugeri A, Klevering BJ, Rohrschneider K, Blankenagel A, Brunner HG, Deutman AF, Hoyng CB & Cremers FP (2000) Mutations in the ABCA4 (ABCR) gene are the major cause of autosomal recessive cone-rod dystrophy. *Am. J. Hum. Genet.* **67**, 960–6.
- 35 Allikmets R, Singh N, Sun H, Shroyer NF, Hutchinson A, Chidambaram A, Gerrard B, Baird L, Stauffer D, Peiffer A, Rattner A, Smallwood P, Li Y, Anderson KL, Lewis RA, Nathans J, Leppert M, Dean M & Lupski JR (1997) A photoreceptor cell-specific ATP-binding transporter gene (ABCR) is mutated in recessive Stargardt macular dystrophy. *Nat. Genet.* **15**, 236–46.
- 36 Lefèvre C, Audebert S, Jobard F, Bouadjar B, Lakhdar H, Boughdene-Stambouli O, Blanchet-Bardon C, Heilig R, Foglio M, Weissenbach J, Lathrop M, Prud'homme J-F & Fischer J (2003) Mutations in the transporter ABCA12 are associated with lamellar ichthyosis type 2. *Hum. Mol. Genet.* **12**, 2369–78.
- 37 Knight HM, Pickard BS, Maclean A, Malloy MP, Soares DC, McRae AF, Condie A, White A, Hawkins W, McGhee K, van Beck M, MacIntyre DJ, Starr JM, Deary IJ, Visscher PM, Porteous DJ, Cannon RE, St Clair D, Muir WJ & Blackwood DHR (2009) A cytogenetic abnormality and rare coding variants identify ABCA13 as a candidate gene in schizophrenia, bipolar disorder, and depression. *Am. J. Hum. Genet.* **85**, 833–46.
- 38 Croop JM, Gros P & Housman DE (1988) Genetics of multidrug resistance. *J. Clin. Invest.* **81**, 1303–1309.
- 39 Furukawa H, Murata S, Yabe T, Shimbara N, Keicho N, Kashiwase K, Watanabe K, Ishikawa Y, Akaza T, Tadokoro K, Tohma S, Inoue T, Tokunaga K, Yamamoto K, Tanaka K & Juji T (1999) Splice acceptor site mutation of the transporter associated with antigen processing-1 gene in human bare lymphocyte syndrome. *J. Clin. Invest.* **103**, 755–8.
- 40 de la Salle H, Hanau D, Fricker D, Urlacher A, Kelly A, Salamero J, Powis SH, Donato L, Bausinger H & Laforet M (1994) Homozygous human TAP peptide transporter mutation in HLA class I deficiency. *Science* **265**, 237–41.
- 41 Moins-Teisserenc HT, Gadola SD, Cella M, Dunbar PR, Exley A, Blake N, Baykal C, Lambert J, Bigliardi P, Willemsen M, Jones M, Buechner S, Colonna M, Gross WL, Cerundolo V & Baycal C (1999) Association of a syndrome resembling Wegener's

- granulomatosis with low surface expression of HLA class-I molecules. *Lancet (London, England)* **354**, 1598–603.
- 42 Deleuze JF, Jacquemin E, Dubuisson C, Cresteil D, Dumont M, Erlinger S, Bernard O & Hadchouel M (1996) Defect of multidrug-resistance 3 gene expression in a subtype of progressive familial intrahepatic cholestasis. *Hepatology* **23**, 904–8.
- 43 Rosmorduc O, Hermelin B & Poupon R (2001) MDR3 gene defect in adults with symptomatic intrahepatic and gallbladder cholesterol cholelithiasis. *Gastroenterology* **120**, 1459–67.
- 44 de Vree JM, Jacquemin E, Sturm E, Cresteil D, Bosma PJ, Aten J, Deleuze JF, Desrochers M, Burdelski M, Bernard O, Oude Elferink RP & Hadchouel M (1998) Mutations in the MDR3 gene cause progressive familial intrahepatic cholestasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 282–7.
- 45 Allikmets R, Raskind WH, Hutchinson A, Schueck ND, Dean M & Koeller DM (1999) Mutation of a putative mitochondrial iron transporter gene (ABC7) in X-linked sideroblastic anemia and ataxia (XLSA/A). *Hum. Mol. Genet.* **8**, 743–9.
- 46 Strautnieks SS, Bull LN, Knisely AS, Kocoshis SA, Dahl N, Arnell H, Sokal E, Dahan K, Childs S, Ling V, Tanner MS, Kagalwalla AF, Németh A, Pawlowska J, Baker A, Mieli-Vergani G, Freimer NB, Gardiner RM & Thompson RJ (1998) A gene encoding a liver-specific ABC transporter is mutated in progressive familial intrahepatic cholestasis. *Nat. Genet.* **20**, 233–8.
- 47 van Mil SWC, van der Woerd WL, van der Brugge G, Sturm E, Jansen PLM, Bull LN, van den Berg IET, Berger R, Houwen RHJ & Klomp LWJ (2004) Benign recurrent intrahepatic cholestasis type 2 is caused by mutations in ABCB11. *Gastroenterology* **127**, 379–84.
- 48 Zaman GJ, Flens MJ, van Leusden MR, de Haas M, Mulder HS, Lankelma J, Pinedo HM, Scheper RJ, Baas F & Broxterman HJ (1994) The human multidrug resistance-associated protein MRP is a plasma membrane drug-efflux pump. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 8822–6.
- 49 Wada M, Toh S, Taniguchi K, Nakamura T, Uchiumi T, Kohno K, Yoshida I, Kimura A, Sakisaka S, Adachi Y & Kuwano M (1998) Mutations in the canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) gene, a novel ABC transporter, in patients with hyperbilirubinemia II/Dubin-Johnson syndrome. *Hum. Mol. Genet.* **7**, 203–7.
- 50 Bergen AA, Plomp AS, Schuurman EJ, Terry S, Breuning M, Dauwerse H, Swart J, Kool M, van Soest S, Baas F, ten Brink JB & de Jong PT (2000) Mutations in ABCC6 cause pseudoxanthoma elasticum. *Nat. Genet.* **25**, 228–31.
- 51 Le Saux O, Urban Z, Tschuch C, Csiszar K, Bacchelli B, Quagliano D, Pasquali-Ronchetti

- I, Pope FM, Richards A, Terry S, Bercovitch L, de Paepe A & Boyd CD (2000) Mutations in a gene encoding an ABC transporter cause pseudoxanthoma elasticum. *Nat. Genet.* **25**, 223–7.
- 52 Ringpfeil F, Lebowitz MG, Christiano AM & Uitto J (2000) Pseudoxanthoma elasticum: mutations in the MRP6 gene encoding a transmembrane ATP-binding cassette (ABC) transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 6001–6.
- 53 Le Boulanger G, Labrèze C, Croué A, Schurgers LJ, Chassaing N, Wittkamp T, Rutsch F & Martin L (2010) An unusual severe vascular case of pseudoxanthoma elasticum presenting as generalized arterial calcification of infancy. *Am. J. Med. Genet. A* **152A**, 118–23.
- 54 Kerem BS, Buchanan JA, Durie P, Corey ML, Levison H, Rommens JM, Buchwald M & Tsui LC (1989) DNA marker haplotype association with pancreatic sufficiency in cystic fibrosis. *Am. J. Hum. Genet.* **44**, 827–34.
- 55 Thomas P, Ye Y & Lightner E (1996) Mutation of the pancreatic islet inward rectifier Kir6.2 also leads to familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Hum. Mol. Genet.* **5**, 1809–12.
- 56 Bienengraeber M, Olson TM, Selivanov VA, Kathmann EC, O’Cochlain F, Gao F, Karger AB, Ballew JD, Hodgson DM, Zingman L V, Pang Y-P, Alekseev AE & Terzic A (2004) ABCC9 mutations identified in human dilated cardiomyopathy disrupt catalytic KATP channel gating. *Nat. Genet.* **36**, 382–7.
- 57 Olson TM, Alekseev AE, Moreau C, Liu XK, Zingman L V, Miki T, Seino S, Asirvatham SJ, Jahangir A & Terzic A (2007) KATP channel mutation confers risk for vein of Marshall adrenergic atrial fibrillation. *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* **4**, 110–6.
- 58 Yoshiura K, Kinoshita A, Ishida T, Ninokata A, Ishikawa T, Kaname T, Bannai M, Tokunaga K, Sonoda S, Komaki R, Ihara M, Saenko VA, Alipov GK, Sekine I, Komatsu K, Takahashi H, Nakashima M, Sosonkina N, Mapendano CK, Ghadami M, Nomura M, Liang D-S, Miwa N, Kim D-K, Garidkhuu A, Natsume N, Ohta T, Tomita H, Kaneko A, Kikuchi M, Russomando G, Hirayama K, Ishibashi M, Takahashi A, Saitou N, Murray JC, Saito S, Nakamura Y & Niikawa N (2006) A SNP in the ABCC11 gene is the determinant of human earwax type. *Nat. Genet.* **38**, 324–30.
- 59 Cartier N, Sarde CO, Douar AM, Mosser J, Mandel JL & Aubourg P (1993) Abnormal messenger RNA expression and a missense mutation in patients with X-linked adrenoleukodystrophy. *Hum. Mol. Genet.* **2**, 1949–51.
- 60 Lombard-Platet G, Savary S, Sarde CO, Mandel JL & Chimini G (1996) A close relative of the adrenoleukodystrophy (ALD) gene codes for a peroxisomal protein with a specific expression pattern. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 1265–9.

- 61 Gärtner J, Kearns W, Rosenberg C, Pearson P, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA & Valle D (1993) Localization of the 70-kDa peroxisomal membrane protein to human 1p21-p22 and mouse 3. *Genomics* **15**, 412–4.
- 62 雄一 杉山好克 金井 (2009) 創薬研究者必見！最新トランスポーター研究..
- 63 Matsuo H, Takada T, Ichida K, Nakamura T, Nakayama A, Ikebuchi Y, Ito K, Kusanagi Y, Chiba T, Tadokoro S, Takada Y, Oikawa Y, Inoue H, Suzuki K, Okada R, Nishiyama J, Domoto H, Watanabe S, Fujita M, Morimoto Y, Naito M, Nishio K, Hishida A, Wakai K, Asai Y, Niwa K, Kamakura K, Nonoyama S, Sakurai Y, Hosoya T, Kanai Y, Suzuki H, Hamajima N & Shinomiya N (2009) Common defects of ABCG2, a high-capacity urate exporter, cause gout: a function-based genetic analysis in a Japanese population. *Sci. Transl. Med.* **1**, 5ra11.
- 64 Berge KE, Tian H, Graf GA, Yu L, Grishin N V, Schultz J, Kwiterovich P, Shan B, Barnes R & Hobbs HH (2000) Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science* **290**, 1771–5.
- 65 Buch S, Schafmayer C, Völzke H, Becker C, Franke A, von Eller-Eberstein H, Kluck C, Bässmann I, Brosch M, Lammert F, Miquel JF, Nervi F, Wittig M, Roskopf D, Timm B, Höll C, Seeger M, ElSharawy A, Lu T, Egberts J, Fändrich F, Fölsch UR, Krawczak M, Schreiber S, Nürnberg P, Tepel J & Hampe J (2007) A genome-wide association scan identifies the hepatic cholesterol transporter ABCG8 as a susceptibility factor for human gallstone disease. *Nat. Genet.* **39**, 995–9.
- 66 Kaminski WE, Piehler A, Püllmann K, Porsch-Ozcürümez M, Duong C, Bared GM, Büchler C & Schmitz G (2001) Complete coding sequence, promoter region, and genomic structure of the human ABCA2 gene and evidence for sterol-dependent regulation in macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **281**, 249–58.
- 67 Boonstra R, Timmer-Bosscha H, van Echten-Arends J, van der Kolk DM, van den Berg A, de Jong B, Tew KD, Poppema S & de Vries EGE (2004) Mitoxantrone resistance in a small cell lung cancer cell line is associated with ABCA2 upregulation. *Br. J. Cancer* **90**, 2411–2417.
- 68 Yamano G, Funahashi H, Kawanami O, Zhao LX, Ban N, Uchida Y, Morohoshi T, Ogawa J, Shioda S & Inagaki N (2001) ABCA3 is a lamellar body membrane protein in human lung alveolar type II cells. *FEBS Lett.* **508**, 221–5.
- 69 Mitani Y, Satake K, Tsukamoto M, Nakamura I, Kadioglu O, Teruya T, Yonezawa T, Cha BY, Efferth T, Woo J-T & Nakagawa H (2018) Epimagnolin A, a tetrahydrofurofuranoid lignan from *Magnolia fargesii*, reverses ABCB1-mediated drug resistance. *Phytomedicine*.
- 70 Petry F, Ritz V, Meineke C, Middel P, Kietzmann T, Schmitz-Salue C & Hirsch-Ernst KI

- (2006) Subcellular localization of rat Abca5, a rat ATP-binding-cassette transporter expressed in Leydig cells, and characterization of its splice variant apparently encoding a half-transporter. *Biochem. J.* **393**, 79–87.
- 71 Gai J, Ji M, Shi C, Li W, Chen S, Wang Y & Li H (2013) FoxO regulates expression of ABCA6, an intracellular ATP-binding-cassette transporter responsive to cholesterol. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **45**, 2651–9.
- 72 Wang N, Lan D, Gerbod-Giannone M, Linsel-Nitschke P, Jehle AW, Chen W, Martinez LO & Tall AR (2003) ATP-binding cassette transporter A7 (ABCA7) binds apolipoprotein A-I and mediates cellular phospholipid but not cholesterol efflux. *J. Biol. Chem.* **278**, 42906–12.
- 73 Tsuruoka S, Ishibashi K, Yamamoto H, Wakaumi M, Suzuki M, Schwartz GJ, Imai M & Fujimura A (2002) Functional analysis of ABCA8, a new drug transporter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **298**, 41–5.
- 74 Wenzel JJ, Kaminski WE, Piehler A, Heimerl S, Langmann T & Schmitz G (2003) ABCA10, a novel cholesterol-regulated ABCA6-like ABC transporter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **306**, 1089–98.
- 75 Zuo Y, Zhuang DZ, Han R, Isaac G, Tobin JJ, McKee M, Welte R, Brissette JL, Fitzgerald ML & Freeman MW (2008) ABCA12 maintains the epidermal lipid permeability barrier by facilitating formation of ceramide linoleic esters. *J. Biol. Chem.* **283**, 36624–35.
- 76 Xu M, Li L, Liu Z, Jiao Z, Xu P, Kong X, Huang H & Zhang Y (2013) ABCB2 (TAP1) as the downstream target of SHH signaling enhances pancreatic ductal adenocarcinoma drug resistance. *Cancer Lett.* **333**, 152–158.
- 77 Lang C, Meier Y, Stieger B, Beuers U, Lang T, Kerb R, Kullak-Ublick GA, Meier PJ & Pauli-Magnus C (2007) Mutations and polymorphisms in the bile salt export pump and the multidrug resistance protein 3 associated with drug-induced liver injury. *Pharmacogenet. Genomics* **17**, 47–60.
- 78 YANG G, JIANG O, LING D, JIANG X, YUAN P, ZENG G, ZHU J, TIAN J, WENG Y & WU D (2015) MicroRNA-522 reverses drug resistance of doxorubicin-induced HT29 colon cancer cell by targeting ABCB5. *Mol. Med. Rep.* **12**, 3930–3936.
- 79 Kelter G, Steinbach D, Konkimalla VB, Tahara T, Taketani S, Fiebig H-H & Efferth T (2007) Role of Transferrin Receptor and the ABC Transporters ABCB6 and ABCB7 for Resistance and Differentiation of Tumor Cells towards Artesunate. *PLoS One* **2**, e798.
- 80 Elliott AM & Al-Hajj MA (2009) ABCB8 Mediates Doxorubicin Resistance in Melanoma Cells by Protecting the Mitochondrial Genome. *Mol. Cancer Res.* **7**, 79–87.
- 81 Gong J-P, Yang L, Tang J-W, Sun P, Hu Q, Qin J-W, Xu X-M, Sun B-C & Tang J-H

- (2016) Overexpression of microRNA-24 increases the sensitivity to paclitaxel in drug-resistant breast carcinoma cell lines via targeting ABCB9. *Oncol. Lett.* **12**, 3905–3911.
- 82 Mao Q, Deeley RG & Cole SPC (2000) Functional Reconstitution of Substrate Transport by Purified Multidrug Resistance Protein MRP1 (ABCC1) in Phospholipid Vesicles. *J. Biol. Chem.* **275**, 34166–34172.
- 83 Kwan P, Wong V, Ng PW, Lui CHT, Sin NC, Wong KS & Baum L (2011) Gene-wide tagging study of the association between *ABCC2*, *ABCC5* and *ABCG2* genetic polymorphisms and multidrug resistance in epilepsy. *Pharmacogenomics* **12**, 319–325.
- 84 Liu X, Yao D, Liu C, Cao Y, Yang Q, Sun Z & Liu D (2016) Overexpression of ABCC3 promotes cell proliferation, drug resistance, and aerobic glycolysis and is associated with poor prognosis in urinary bladder cancer patients. *Tumor Biol.* **37**, 8367–8374.
- 85 Li J, Bauer M, Moe B, Leslie EM & Li X-F (2017) Multidrug Resistance Protein 4 (MRP4/ABCC4) Protects Cells from the Toxic Effects of Halobenzoquinones. *Chem. Res. Toxicol.* **30**, 1815–1822.
- 86 Eadie LN, Dang P, Goyne JM, Hughes TP & White DL (2018) ABCC6 plays a significant role in the transport of nilotinib and dasatinib, and contributes to TKI resistance in vitro, in both cell lines and primary patient mononuclear cells. *PLoS One* **13**, e0192180.
- 87 Coelho AC, Messier N, Ouellette M & Cotrim PC (2007) Role of the ABC Transporter PRP1 (ABCC7) in Pentamidine Resistance in Leishmania Amastigotes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 3030–3032.
- 88 Zhang H, Patel A, Wang Y-J, Zhang Y-K, Kathawala RJ, Qiu L-H, Patel BA, Huang L-H, Shukla S, Yang D-H, Ambudkar S V., Fu L-W & Chen Z-S (2017) The BTK Inhibitor Ibrutinib (PCI-32765) Overcomes Paclitaxel Resistance in ABCB1- and ABCC10-Overexpressing Cells and Tumors. *Mol. Cancer Ther.* **16**, 1021–1030.
- 89 Uemura T, Oguri T, Ozasa H, Takakuwa O, Miyazaki M, Maeno K, Sato S & Ueda R (2010) ABCC11/MRP8 confers pemetrexed resistance in lung cancer. *Cancer Sci.* **101**, 2404–2410.
- 90 Yamada T, Ohyagi Y, Shinnoh N, Kikuchi H, Osoegawa M, Ochi H, Kira J & Furuya H (2004) Therapeutic effects of normal cells on ABCD1 deficient cells in vitro and hematopoietic cell transplantation in the X-ALD mouse model. *J. Neurol. Sci.* **218**, 91–97.
- 91 Ogawa Y, Tsuda H, Hai E, Tsuji N, Yamagata S, Tokunaga S, Nakazawa K, Tamamori Y, Ogawa M, Shimizu S, Inoue T & Nishiguchi Y Clinical role of ABCF2 expression in breast cancer. *Anticancer Res.* **26**, 1809–14.
- 92 Tarling EJ (2013) Expanding roles of ABCG1 and sterol transport. *Curr. Opin. Lipidol.*

- 24, 138–146.
- 93 Suzuki M, Suzuki H, Sugimoto Y & Sugiyama Y (2003) ABCG2 Transports Sulfated Conjugates of Steroids and Xenobiotics. *J. Biol. Chem.* **278**, 22644–22649.
 - 94 Doyle LA, Yang W, Abruzzo L V, Krogmann T, Gao Y, Rishi AK & Ross DD (1998) A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 15665–70.
 - 95 Chen Z-C, Shin S-J, Kuo K-K, Lin K-D, Yu M-L & Hsiao P-J (2008) Significant association of ABCG8:D19H gene polymorphism with hypercholesterolemia and insulin resistance. *J. Hum. Genet.* **53**, 757–763.
 - 96 平成29年版高齢社会白書 (2017)
 - 97 平成26年簡易生命表の概況 (2014)
 - 98 Lin JH (2003) Drug–drug interaction mediated by inhibition and induction of P-glycoprotein. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **55**, 53–81.
 - 99 Ling V (1997) Multidrug resistance: molecular mechanisms and clinical relevance. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **40**, S3–S8.
 - 100 Gripar JJ, Ramachandra M, Hrycyna CA, Dey S & Ambudkar S V (2000) Functional characterization of glycosylation-deficient human P-glycoprotein using a vaccinia virus expression system. *J. Membr. Biol.* **173**, 203–14.
 - 101 Luurtsema G, Windhorst AD, Mooijer MPJ, Herscheid JDM, Lammertsma AA & Franssen EJJ (2002) Fully automated high yield synthesis of (R)- and (S)-[11C]verapamil for measuring P-glycoprotein function with positron emission tomography. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **45**, 1199–1207.
 - 102 Cornwell MM, Pastan I & Gottesman MM (1987) Certain calcium channel blockers bind specifically to multidrug-resistant human KB carcinoma membrane vesicles and inhibit drug binding to P-glycoprotein. *J. Biol. Chem.* **262**, 2166–70.
 - 103 Adachi T, Nakagawa H, Chung I, Hagiya Y, Hoshijima K, Noguchi N, Kuo MT & Ishikawa T (2007) Nrf2-dependent and -independent induction of ABC transporters ABCC1, ABCC2, and ABCG2 in HepG2 cells under oxidative stress. *J. Exp. Ther. Oncol.* **6**, 335–48.
 - 104 Ford JM (1996) Experimental reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by pharmacological chemosensitisers. *Eur. J. Cancer* **32A**, 991–1001.
 - 105 Tsuruo T, Iida H, Tsukagoshi S & Sakurai Y (1981) Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. *Cancer Res.* **41**, 1967–72.
 - 106 Johnson BD, Hockerman GH, Scheuer T & Catterall WA (1996) Distinct effects of mutations in transmembrane segment IVS6 on block of L-type calcium channels by

- structurally similar phenylalkylamines. *Mol. Pharmacol.* **50**, 1388–400.
- 107 Sakurai A, Onishi Y, Hirano H, Seigneuret M, Obanayama K, Kim G, Liew EL, Sakaeda T, Yoshiura K-I, Niikawa N, Sakurai M & Ishikawa T (2007) Quantitative structure-activity relationship analysis and molecular dynamics simulation to functionally validate nonsynonymous polymorphisms of human ABC transporter ABCB1 (P-glycoprotein/MDR1). *Biochemistry* **46**, 7678–93.
- 108 Onishi Y, Hirano H, Nakata K, Oosumi K, Nagakura M, Tarui S & Ishikawa T (2003) High-Speed Screening and Structure-Activity Relationship Analysis for the Substrate Specificity of P-Glycoprotein (ABCB1). *Chem-Bio Informatics J.* **3**, 175–193.
- 109 Chiba P, Ecker G, Schmid D, Drach J, Tell B, Goldenberg S & Gekeler V (1996) Structural requirements for activity of propafenone-type modulators in P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Mol. Pharmacol.* **49**, 1122–30.
- 110 Ecker G, Huber M, Schmid D & Chiba P (1999) The importance of a nitrogen atom in modulators of multidrug resistance. *Mol. Pharmacol.* **56**, 791–796.
- 111 Globisch C, Pajeva IK & Wiese M (2006) Structure-activity relationships of a series of tariquidar analogs as multidrug resistance modulators. *Bioorganic Med. Chem.* **14**, 1588–1598.
- 112 Klopman G, Shi LM & Ramu A (1997) Quantitative structure-activity relationship of multidrug resistance reversal agents. *Mol. Pharmacol.* **52**, 323–34.
- 113 Pearce HL, Safat AR, Bach NJ, Winter MA, Cirtain MC & Beck WT (1989) Essential features of the P-glycoprotein pharmacophore as defined by a series of reserpine analogs that modulate multidrug resistance. **86**, 5128–5132.
- 114 Zamora JM, Pearce HL & Beck WT (1988) Physical-chemical properties shared by compounds that modulate multidrug resistance in human leukemic cells. *Mol. Pharmacol.* **33**, 454–62.
- 115 Wang XM, Terasaki PI, Rankin GW, Chia D, Zhong HP & Hardy S (1993) A new microcellular cytotoxicity test based on calcein AM release. *Hum. Immunol.* **37**, 264–70.
- 116 Ecker GF, Csaszar E, Kopp S, Plagens B, Holzer W, Ernst W & Chiba P (2002) Identification of ligand-binding regions of P-glycoprotein by activated-pharmacophore photoaffinity labeling and matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry. *Mol. Pharmacol.* **61**, 637–48.
- 117 Zhang S, Wei Y, Li Q, Sun H, Peng H & You Q (2013) Pharmacophore-Based Drug Design and Biological Evaluation of Novel ABCB1 Inhibitors. *Chem. Biol. Drug Des.* **81**, 349–358.
- 118 Ekins S, Kim RB, Leake BF, Dantzig AH, Schuetz EG, Lan L-B, Yasuda K, Shepard

- RL, Winter MA, Schuetz JD, Wikel JH & Wrighton SA (2002) Application of three-dimensional quantitative structure-activity relationships of P-glycoprotein inhibitors and substrates. *Mol. Pharmacol.* **61**, 974–81.
- 119 Garrigues A, Loiseau N, Delaforge M, Ferte J, Garrigos M, André F & Orlowski S (2002) Characterization of two pharmacophores on the multidrug transporter P-glycoprotein. *Mol. Pharmacol.* **62**, 1288–98.
- 120 Pajeva IK & Wiese M (2002) Pharmacophore Model of Drugs Involved in P-Glycoprotein Multidrug Resistance: Explanation of Structural Variety (Hypothesis). *J. Med. Chem.* **45**, 5671–5686.
- 121 Penzotti JE, Lamb ML, Evensen E & Grootenhuis PDJ (2002) A computational ensemble pharmacophore model for identifying substrates of P-glycoprotein. *J. Med. Chem.* **45**, 1737–1740.
- 122 Regasini LO, Velloso JCR, Silva DHS, Furlan M, de Oliveira OMM, Khalil NM, Brunetti IL, Young MCM, Barreiro EJ & Bolzani VS (2008) Flavonols from *Pterogyne nitens* and their evaluation as myeloperoxidase inhibitors. *Phytochemistry* **69**, 1739–44.
- 123 Tajima Y, Nakagawa H, Tamura A, Kadioglu O, Satake K, Mitani Y, Murase H, Regasini LO, Bolzani V da S, Ishikawa T, Fricker G & Efferth T (2014) Nitensidine A, a guanidine alkaloid from *Pterogyne nitens*, is a novel substrate for human ABC transporter ABCB1. *Phytomedicine* **21**, 323–32.
- 124 Wakabayashi K, Nakagawa H, Tamura A, Koshiha S, Hoshijima K, Komada M & Ishikawa T (2007) Intramolecular disulfide bond is a critical check point determining degradative fates of ATP-binding cassette (ABC) transporter ABCG2 protein. *J. Biol. Chem.* **282**, 27841–6.
- 125 Tamura A, Wakabayashi K, Onishi Y, Nakagawa H, Tsuji M, Matsuda Y & Ishikawa T (2006) Genetic polymorphisms of human ABC transporter ABCG2: development of the standard method for functional validation of SNPs by using the Flp recombinase system. *J. Exp. Ther. Oncol.* **6**, 1–11.
- 126 Russell WC, Graham FL, Smiley J & Nairn R (1977) Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5. *J. Gen. Virol.* **36**, 59–72.
- 127 Essodaigui M, Broxterman HJ & Garnier-Suillerot A (1998) Kinetic analysis of calcein and calcein-acetoxymethylester efflux mediated by the multidrug resistance protein and P-glycoprotein. *Biochemistry* **37**, 2243–50.
- 128 Weston SA & Parish CR (1990) New fluorescent dyes for lymphocyte migration studies. Analysis by flow cytometry and fluorescence microscopy. *J. Immunol. Methods* **133**, 87–97.

- 129 Venkatachalam TK, Qazi S, Samuel P & Uckun FM (2003) Inhibition of mast cell leukotriene release by thiourea derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **13**, 485–8.
- 130 Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**, 55–63.
- 131 Satake K, Tsukamoto M, Mitani Y, Regasini LO, da Silva Bolzani V, Efferth T & Nakagawa H (2015) Human ABCB1 confers cells resistance to cytotoxic guanidine alkaloids from *Pterogyne nitens*. *Biomed. Mater. Eng.* **25**, 249–56.
- 132 Ueda K, Cardarelli C, Gottesman MM & Pastan I (1987) Expression of a full-length cDNA for the human “MDR1” gene confers resistance to colchicine, doxorubicin, and vinblastine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 3004–8.
- 133 Meyers MB, Scotto KW & Sirotinak FM (1991) P-glycoprotein content and mediation of vincristine efflux: correlation with the level of differentiation in luminal epithelium of mouse small intestine. *Cancer Commun.* **3**, 159–65.
- 134 Kartner N, Shales M, Riordan JR & Ling V (1983) Daunorubicin-resistant Chinese hamster ovary cells expressing multidrug resistance and a cell-surface P-glycoprotein. *Cancer Res.* **43**, 4413–9.
- 135 Ecker G, Huber M, Schmid D & Chiba P (1999) The importance of a nitrogen atom in modulators of multidrug resistance. *Mol. Pharmacol.* **56**, 791–6.
- 136 Globisch C, Pajeva IK & Wiese M (2006) Structure–activity relationships of a series of tariquidar analogs as multidrug resistance modulators. *Bioorg. Med. Chem.* **14**, 1588–1598.
- 137 Pearce HL, Safa AR, Bach NJ, Winter MA, Cirtain MC & Beck WT (1989) Essential features of the P-glycoprotein pharmacophore as defined by a series of reserpine analogs that modulate multidrug resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 5128–32.
- 138 Dawson RJP & Locher KP (2006) Structure of a bacterial multidrug ABC transporter. *Nature* **443**, 180–185.
- 139 Ward A, Reyes CL, Yu J, Roth CB & Chang G (2007) Flexibility in the ABC transporter MsbA: Alternating access with a twist. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 19005–19010.
- 140 Fiser A & Sali A (2003) Modeller: generation and refinement of homology-based protein structure models. *Methods Enzymol.* **374**, 461–91.
- 141 Gripar JJ, Ramachandra M, Hrycyna CA, Dey S & Ambudkar S V (2000) Functional characterization of glycosylation-deficient human P-glycoprotein using a vaccinia virus expression system. *J. Membr. Biol.* **173**, 203–14.
- 142 Greer DA & Ivey S (2007) Distinct N-glycan glycosylation of P-glycoprotein isolated from the human uterine sarcoma cell line MES-SA/Dx5. *Biochim. Biophys. Acta* **1770**,

- 1275–82.
- 143 Draheim V, Reichel A, Weitschies W & Moenning U (2010) N-glycosylation of ABC transporters is associated with functional activity in sandwich-cultured rat hepatocytes. *Eur. J. Pharm. Sci.* **41**, 201–209.
 - 144 Schinkel AH, Kemp S, Dollé M, Rudenko G & Wagenaar E (1993) N-glycosylation and deletion mutants of the human MDR1 P-glycoprotein. *J. Biol. Chem.* **268**, 7474–81.
 - 145 Venkatachalam TK, Qazi S, Samuel P & Uckun FM (2003) Inhibition of mast cell leukotriene release by thiourea derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **13**, 485–8.
 - 146 Kiefer F, Arnold K, Künzli M, Bordoli L & Schwede T (2009) The SWISS-MODEL Repository and associated resources. *Nucleic Acids Res.* **37**, D387–92.
 - 147 Noguchi K, Katayama K, Mitsuhashi J & Sugimoto Y (2009) Functions of the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in chemotherapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **61**, 26–33.
 - 148 Aller SG, Yu J, Ward A, Weng Y, Chittaboina S, Zhuo R, Harrell PM, Trinh YT, Zhang Q, Urbatsch IL & Chang G (2009) Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding. *Science* **323**, 1718–22.
 - 149 Tamura A, Watanabe M, Saito H, Nakagawa H, Kamachi T, Okura I & Ishikawa T (2006) Functional validation of the genetic polymorphisms of human ABC transporter ABCG2: Identification of alleles that are defective in porphyrin transport. *Mol. Pharmacol.* **70**, 287–96.
 - 150 Nakagawa H, Tamura A, Wakabayashi K, Hoshijima K, Komada M, Yoshida T, Kometani S, Matsubara T, Mikuriya K & Ishikawa T (2008) Ubiquitin-mediated proteasomal degradation of non-synonymous SNP variants of human ABC transporter ABCG2. *Biochem. J.* **411**, 623–631.
 - 151 Chufan EE, Kapoor K, Sim H-M, Singh S, Talele TT, Durell SR & Ambudkar S V (2013) Multiple transport-active binding sites are available for a single substrate on human P-glycoprotein (ABCB1). *PLoS One* **8**, e82463.
 - 152 Vahedi S, Chufan EE & Ambudkar S V (2017) Global alteration of the drug-binding pocket of human P-glycoprotein (ABCB1) by substitution of fifteen conserved residues reveals a negative correlation between substrate size and transport efficiency. *Biochem. Pharmacol.* **143**, 53–64.

略語表

略語	
5-FU	5-Fluorouracil
ABC	ATP-Binding Cassette
ABCP	Placenta-specific ATP-binding cassette transporter (=ABCG2)
ABCR	ATP-Binding Cassette
ADME	Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion
ADP	Adenosine diphosphate
ALDP	Adrenoleukodystrophy protein (=ABCD1)
ALDRP	Adrenoleukodystrophy-related protein (=ABCD2)
AM	acetoxymethyl
ATP	Adenosine Triphosphate
BCRP	Breast cancer resistance protein (=ABCG2)
BSA	Bovine serum albumin
BSEP	Bile Salt Export Pump (=ABCB11)
Calcein-AM	3',6'-Di(O-acetyl)-2',7'-bis[N,N-bis(carboxymethyl)aminomethyl]fluorescein Tetraacetoxymethyl Ester
CBB	Coomassie Brilliant Blue
cDNA	complementary Deoxyribonucleic acid
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (=ABCC7)
cMOAT	canalicular multispecific organic anion transporter 1 (=ABCC2)
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
D-PBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EGTA	ethlen glycol bis (b-aminoethylether)N,N,N',N'-tetraacetic acid
F.C.	final concentration
FACS	fluorescence activated cell sorting
FRT	Flp-recombinase target
GABA	g-Aminobutyric acid

GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HER	Human Epidermal growth factor Receptor
HRP	Horseradish peroxidase
IC50	half maximal (50%) inhibitory concentration
lex	最大励起波長
MDR	Multiple drug resistance
MDR1	Multiple drug resistance 1 (=ABCB1)
MES	2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid
MES	2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid
MRP1	Multidrug resistance-associated Protein 1 (=ABCC1)
MRP2	Multidrug resistance-associated Protein 2 (=ABCC2)
MRP3	Multidrug resistance-associated Protein 3 (=ABCC3)
MRP4	Multidrug resistance-associated Protein 4 (=ABCC4)
MRP5	Multidrug resistance-associated Protein 5 (=ABCC5)
MRP6	Multidrug resistance-associated Protein 6 (=ABCC6)
MRP7	Multidrug resistance-associated Protein 7 (=ABCC10)
MRP8	Multidrug resistance-associated Protein 8 (=ABCC11)
MRP9	Multidrug resistance-associated Protein 9 (=ABCC12)
MRSA	Methicillin-resistant Staphylococcus aureus
MTT	3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, yellow tetrazole
MVD	Molegro Voioinformatics Solutions
MW	molecular weight
MXR1	Mitoxantrone resistance-associated protein 1 (=ABCG2)
OABP	2'-5' oligoadenylate-binding protein (=ABCE1)
PBP2A	penicillin-binding protein 2a
PBS	Phosphate buffered saline
PC	phosphatidylcholine
PCMB	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PCR	polymerase chain reaction
PDB	Protein Date Bank
P-gp	P-glycoprotein (=ABCB1)
PMP70	70 kDa peroxisomal membrane protein (=ABCD3)
QSAR	Quantitative Structure-Activity Relationship

RNA	ribonucleic acid
SAP	Alkaline Phosphatase (Shrimp)
SAR	Structure-activity Relationships
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate - Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis
SPGP	Sister of P-glycoprotein (=ABCB11)
SUR1	Sulfonylurea receptor 1 (=ABCC8)
SUR2	Sulfonylurea receptor 2 (=ABCC9)
TAP1	Transporter associated with Antigen Processing 1 (=ABCB2)
TAP2	Transporter associated with Antigen Processing 2 (=ABCB3)
TBS-T	Tris Buffered Saline with Tween 20
TCA	trichloroacetic acid
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane
UFT	Tegafur/Uracil (製剤の名称)
VLCFA	very long chain fatty acid
WT	wild type

謝辞

本研究を進めるにあたり、終始ご懇篤なるご指導、ご鞭撻を賜りました中部大学 講師 中川 大 博士に心から篤く御礼申し上げます。

本研究にあたり、多大なるご指導、ご助言戴きました中部大学 教授 大西 素子 博士、教授 禹 済泰 博士、特任教授 横山 信治 博士に篤く感謝します。

本研究の遂行にあたり、FACS に関する手技をご指導、ご助言頂きました、明治薬科大学 池上 洋二 博士、井上 裕貴 博士に篤く感謝申し上げます。

本研究の遂行及び論文作成にあたり、ご助言、ご協力戴きました技術員 今井律子さん、中部大学中川研究室の田島靖浩さん、三谷勇二さん、村瀬隼人さん、塚本めぐみさんをはじめとする多くの人に篤く御礼申し上げます。

末筆ではありますが、研究室生活を支えてくれた家族に心より感謝申し上げます。