

平成 23 年度新潟薬科大学薬学部卒業研究Ⅱ

論文題目

薬物排出トランスポーター P-糖タンパク質に及ぼす

転写因子NF- κ B阻害天然物の影響に関する研究

Studies on effects of nuclear factor κ B (NF- κ B)-inhibiting
natural compounds on drug efflux transporter P-glycoprotein

生物薬剤学研究室 6 年

06P020 大串 祐一

(指導教員:鍋倉 智裕)

要 旨

抗がん剤使用におけるがん細胞の薬剤耐性化は広く知られており、P-糖タンパク質が ATP の加水分解エネルギーを利用して薬物を輸送することが原因の 1 つとされている。

また、転写因子 Nuclear Factor- κ B (NF- κ B) は抗アポトーシス遺伝子の発現上昇を介して抗がん剤や death receptor を介するアポトーシス抑制に関与している。近年、さまざまな天然物が NF- κ B 阻害作用を介して抗腫瘍活性を持つことが明らかになり、分子レベルでの研究が行なわれている。NF- κ B の阻害作用と抗腫瘍活性を合わせ持つ天然物の中で P-糖タンパク質による排泄機構を阻害することができる化合物を発見できれば、臨床において非常に有用なものとなると思われる。

そこで、本研究では NF- κ B 阻害作用が報告されている天然物を用いて、P-糖タンパク質の ATP の加水分解に対する影響と NF- κ B の活性化抑制の効果について検討した。その結果、Celastrol、Licochalcone A、Anacardic acid、Caffeic acid phenethyl ester (CAPE)、Xanthohumol、Magnolol、Honokiol は P-糖タンパク質の基質であると考えられ、P-糖タンパク質の排出能を上回る量の多量の NF- κ B 阻害天然物を添加、あるいは P-糖タンパク質の阻害作用を持つことが知られている Verapamil と併用することで NF- κ B の活性化が阻害された。これらのことより、いくつかの天然物が、がんによる多剤耐性を克服し、がんの治療効果を向上させることが期待できる物質として有用なものとなることが示唆された。

キーワード

- | | | |
|-------------------------|--------------------|---------------|
| 1. P-糖タンパク質 | 2. ABCB1 | 3. KB/MDR1 |
| 4. NF- κ B | 5. ABCトランスポーター | 6. ルシフェラーゼ |
| 7. NF- κ B 阻害天然物 | 8. TNF- α | 9. がん |
| 10. 薬剤耐性 | 11. 抗腫瘍活性 | 12. Celastrol |
| 13. Licochalcone A | 14. Anacardic acid | 15. CAPE |
| 16. Xanthohumol | 17. Magnolol | 18. Honokiol |
| 19. Verapamil | | |

目 次

1. はじめに	1
2. 実験方法	3
3. 結果	5
4. 考察	7
5. おわりに	8
謝 辞	8
引用文献	9

論文

1. はじめに

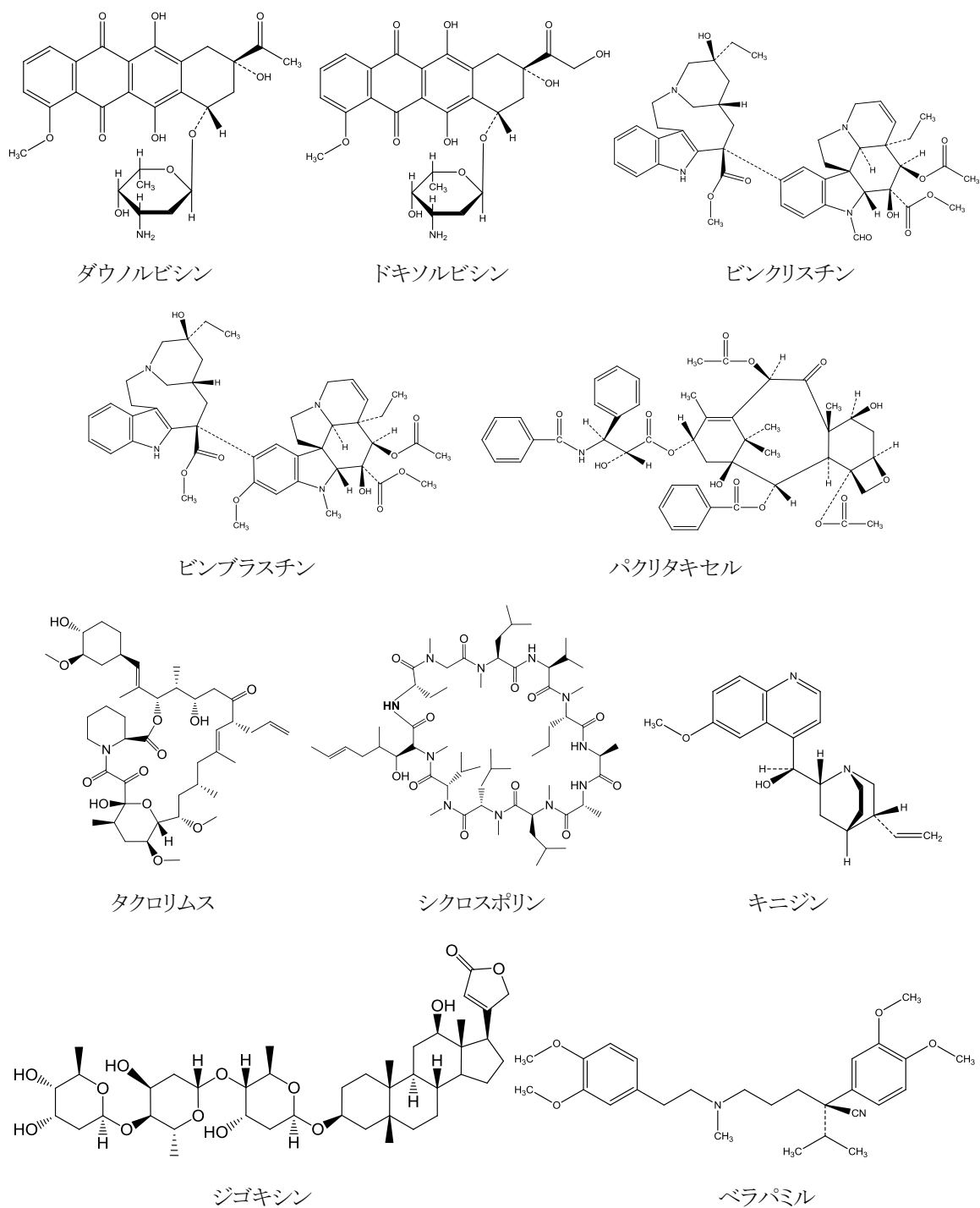
今日、抗がん剤使用におけるがん細胞の薬剤耐性化は広く知られており、構造的に類似性の無い抗がん剤でも効果が無くなる現象、多剤耐性が臨床上大きな問題となっている。がん細胞の多剤耐性の原因の1つとされているP-糖タンパク質(*ABCB1*, *MDR1*)はABC(ATP-binding cassette)トランスポーターファミリーに属し、ATPの加水分解エネルギーを利用して薬物を細胞内から細胞外へ方向選択的に輸送する膜タンパク質である^[1,2]。P-糖タンパク質は2つのATP結合部位を持っており、ダウノルビシン、ドキソルビシン、ビンクリスチン、ビンブラスチン、パクリタキセルなどの抗がん剤のほか、ベラパミル、キニジン、ジゴキシン、シクロスポリン、タクロリムスなどの薬物をATPの加水分解エネルギーを利用して輸送する(Fig.1)。このP-糖タンパク質は小腸や肝臓、腎臓、血液-脳関門、血液-胎盤関門などの正常組織などに発現して、薬物や有害物質から生体を守る役割を担っている。しかし、がん細胞膜上においては、P-糖タンパク質が過剰に発現することで、細胞内に取り込まれた抗がん剤が細胞外に排出され細胞内濃度が減少し、多剤耐性を引き起こすことが問題となっている^[3,4,5]。

また、がん細胞では転写因子 Nuclear Factor- κ B(NF- κ B)が非常に活発化されていることが分かっている。NF- κ BはRelファミリー(プロトオンコロジーであるc-rel遺伝子と相同性のある領域を有している分子からなるファミリー)に属する分子とホモあるいはヘテロ二量体を形成して存在する転写因子群の総称であり、この二量体はI κ B(inhibitor of κ B)と呼ばれるインヒビターと会合し、不活性型として細胞質に存在している。しかし、腫瘍壊死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)やIL-1などの炎症性サイトカインや放射線照射、抗がん剤などによりI κ Bキナーゼ(IKK)が活性化されると、IKKによりI κ Bが分解されて遺伝子発現レベルで細胞死抑制や免疫反応抑制、器官形成、発がんなどに関与している。特に問題とされているのはNF- κ Bの機能として抗アポトーシス遺伝子の発現上昇を介して抗がん剤やdeath receptorを介するアポトーシス抑制に関与していることである^[6,7]。

近年、さまざまな天然物がNF- κ Bを阻害し、抗腫瘍活性を持つことが明らかになり、分子レベルでの研究が行なわれている。そこでNF- κ Bの阻害作用と抗腫瘍活性を合わ

せ持つ天然物の中で P-糖タンパク質による排泄機構を阻害する化合物を発見することができれば、がんによる多剤耐性を克服し、がんの治療効果を向上させることが期待できる物質として非常に有用なものとなると思われる[8,9,10,11]。

そこで、本研究では NF- κ B 阻害天然物の薬物排出トランスポーターP-糖タンパク質阻害作用について、ヒト P-糖タンパク質遺伝子導入 KB/MDR1 細胞を用いて検討した。



(Fig.1) P-糖タンパク質の基質となる医薬品

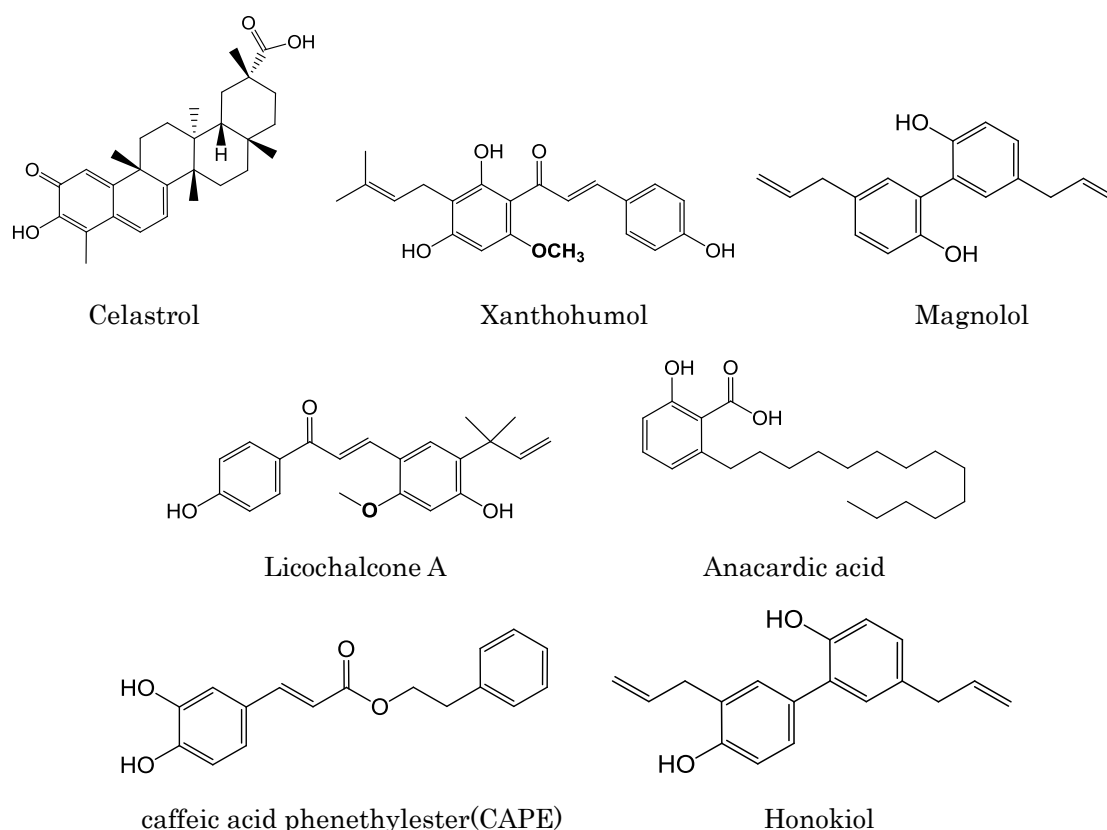
2. 実験方法

(1)細胞及び試薬

実験細胞として、KB/MDR1 細胞を用いた。この細胞は、抗がん剤感受性 KB-3-1 細胞にヒト P-糖タンパク質遺伝子を導入した細胞であり、京都大学農学研究科 植田和光教授に御提供いただいた。KB/MDR1 細胞は 5 µg/mL vinblastine 存在下、10 %ウシ胎児血清含有 Dulbecco's modified Eagle's medium(D-MEM)培地にて 37 °C、5 % CO₂ で培養を行った。

また、P-糖タンパク質の ATP 加水分解活性測定はヒト P-糖タンパク質 cDNA をバキュロウイルスにより昆虫細胞に組み込んで発現させたヒト P-糖タンパク質発現膜画分(BD, Woburn, MA, USA)を用いた。

NF-κB 阻害天然物として、Celastrol、Licochalcone A(CALBIOCHEM, La Jolla, CA, USA)、Anacardic acid(Alexis, Lausen, Switzerland)、Caffeic acid phenethyl ester(CAPE)、Xanthohumol(常磐植物化学研究所、千葉)、Magnolol、Honokiol(和光純薬工業)を用いた(Fig.2)。



(Fig.2) 使用した NF-κB 阻害天然物

(2)P-糖タンパク質の ATP 加水分解活性測定

ヒト P-糖タンパク質発現膜画分を 1.25mg/mL となるように懸濁し、5mM ATP 及び 100 μ M NF- κ B 阻害天然物を加え、37°C で 40 分間保温した。その後、ルシフェラーゼを加え、37°C で 40 分間保温後、残存している ATP から生じる発光をルミノメーター (GloMax 20/20n, Promega) で測定した。

(3)NF- κ B 活性化に及ぼす NF- κ B 阻害天然物の影響

KB/MDR1 細胞における NF- κ B 活性化に及ぼす天然物の影響を、レポーターアッセイを用いて測定した。KB/MDR1 細胞を 24well プレートに 1 \times 10⁵ cell/well となるように植え継ぎ、Fugene HD Transfection Reagent(Roche, Indianapolis, IN, USA)を用いて、ホタルルシフェラーゼ上流に応答配列として NF- κ B 応答配列を持つ pGL 4.32(Promega, Madison, WI, USA)及びウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子上流に herpes simplex virus 1-thymidine kinase (HSV-TK)を持つ pGL 4.74(Promega)を遺伝子導入し、KB/MDR1 細胞の核内で目的遺伝子が複製されるようにした。24 時間培養後、D-MEM 1mL で細胞を一度洗浄し、D-MEM 0.5 mL を加えた。添加薬物を加え 1 時間培養後、TNF- α を 20ng/ μ L となるように加えた。さらに 5 時間培養後、Reporter Lysis Buffer(Promega)を 100 μ L 加え、凍結融解して細胞を可溶化し、Dual-Glo Luciferase Reagent(Promega)を 100 μ L 加え、ルミノメーター (GloMax 20/20n, Promega) で発光強度を測定してホタルルシフェラーゼ活性を測定した。次に、Stop&Glo Reagent を 100 μ L 加え、発光強度を測定してウミシイタケルシフェラーゼ活性を測定した。

(4)統計解析

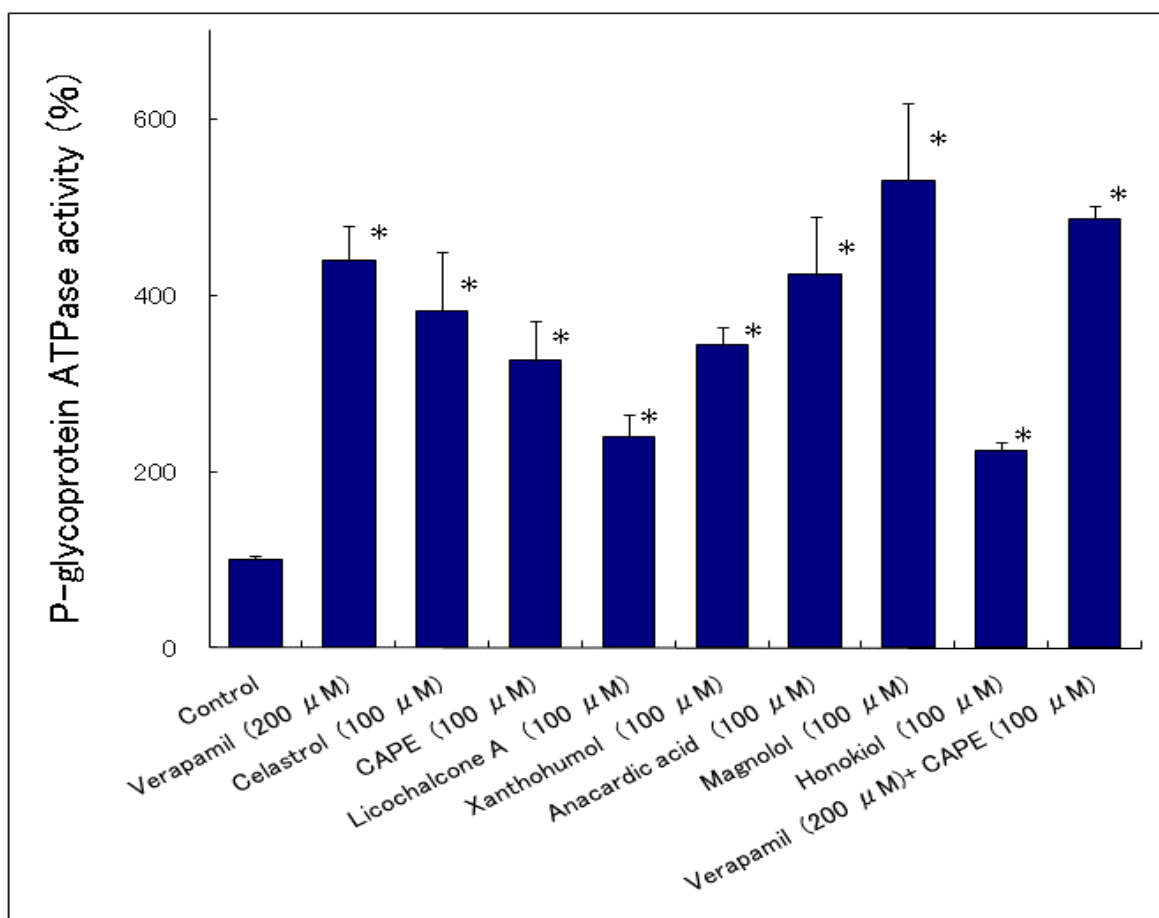
データは mean \pm standard error of the mean(S.E.)で表す。分散分析 post-hoc Dunnet 法を用いて検定を行い、 $P < 0.01$ のものを有意とした。

3. 結果

(1)P-糖タンパク質の ATP 加水分解活性測定

ヒト P-糖タンパク質発現膜画分を用いて、Verapamil、Celastrol、Licochalcone A、Anacardic acid、CAPE、Xanthohumol、Magnolol、Honokiol 存在下での P-糖タンパク質による ATP の加水分解活性を測定した。その結果、P-糖タンパク質の基質である Verapamil 存在下では P-糖タンパク質の ATP の加水分解活性が促進された。また、Celastrol、Licochalcone A、Anacardic acid、CAPE、Xanthohumol、Magnolol、Honokiol 存在下でも Verapamil 存在下と同様に P-糖タンパク質の ATP 加水分解活性が促進された(Fig. 3)。

VerapamilとCAPEを同時に加えた場合では、Verapamil または CAPE 単独時よりも P-糖タンパク質の ATP 加水分解活性がさらに促進されることが示された。

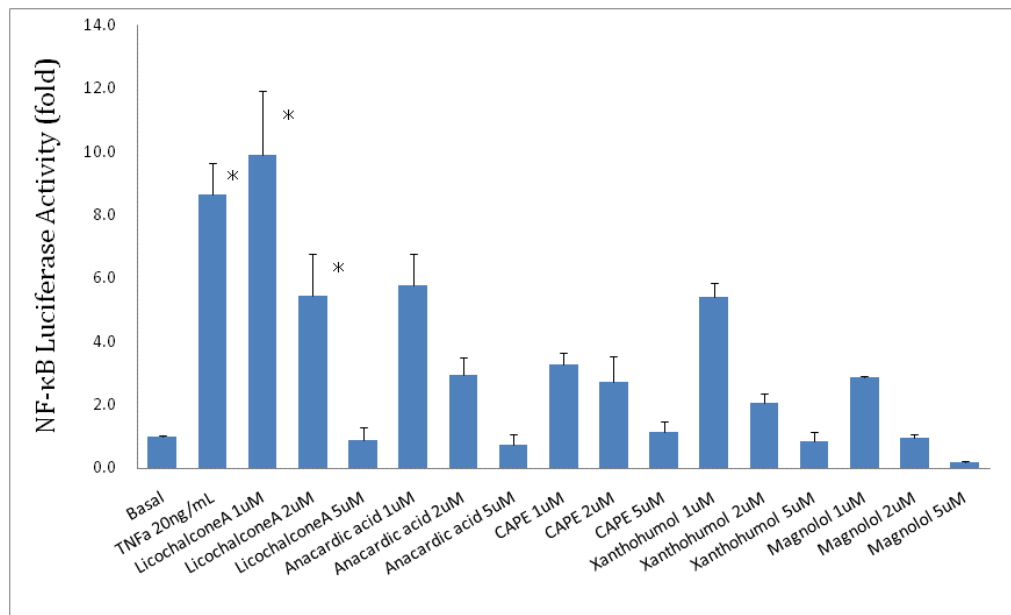


(Fig. 3) ベラパミルや NF- κ B 阻害天然物を用いたヒト P-糖タンパク質発現膜画分の ATP 加水分解活性

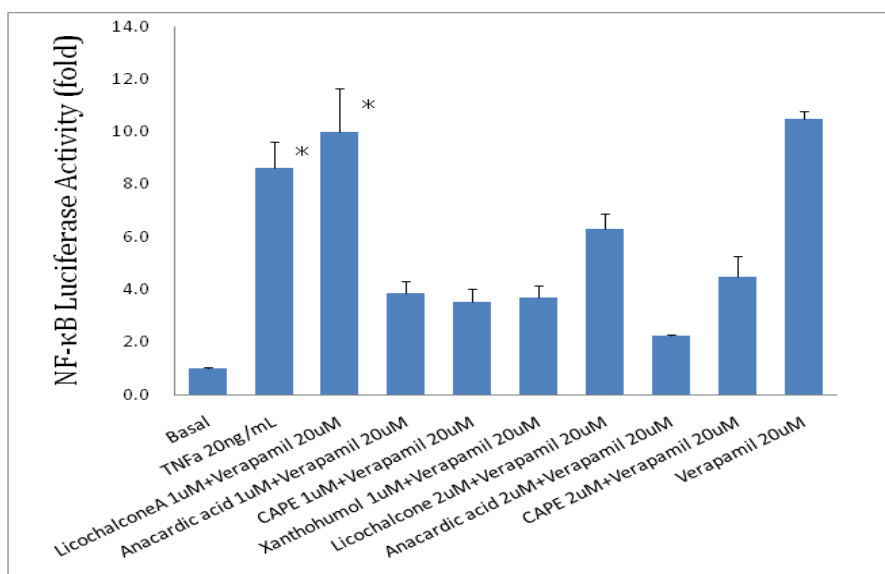
(2)NF-κB 活性化に及ぼす NF-κB 阻害天然物の影響

ホタルルシフェラーゼ上流に NF-κB 応答配列を持つ pGL 4.32(Promega)を遺伝子導入した KB/MDR1 細胞では、TNF-α によって NF-κB ルシフェラーゼ活性が 8.64 ± 1.00 倍に上昇した。しかし、1μM CAPE 存在下で 3.29 ± 0.35 倍、2μM CAPE 存在下で 2.71 ± 0.81 倍、5μM CAPE 存在下で 1.13 ± 0.32 倍と、CAPE の濃度が増加するに従って TNF-α による NF-κB 活性化が強く阻害された。

また、Licochalcone A、Xanthohumol、Anacardic acid 共存下でも同様に、濃度が増加するに従って TNF-α による NF-κB 活性化が阻害された(Fig.4, Fig.5)。



(Fig. 4) NF-κB 活性における NF-κB 阻害天然物の効果 1



(Fig. 5) NF-κB 活性における NF-κB 阻害天然物の効果 2

4. 考察

Celastrol はニシキギ科のタイワンクロヅル(*Tripterygium wilfordii*)の根に含まれ、TNF-α による IKK 活性化、IκBα リン酸化、IκBα 分解を阻害し、NF-κB 標的遺伝子の発現を抑制することが報告されている^[7,9]。CAPE はミツバチの巣から単離されたプロポリスの活性成分であり、ヒト細胞において IκBα 分解を阻害せずに NF-κB の核移行阻害を介して NF-κB 標的遺伝子発現を抑制することが報告されている^[11]。Anacardic acid はウルシ科のカシューノキ(*Anacardium occidentale*)の殻液に多く含まれ、ヒト細胞において抗酸化作用を持つ。また、IKK 活性化阻害を介して IκBα リン酸化、IκBα 分解を阻害し、NF-κB 標的遺伝子の発現を抑制することが報告されている^[10]。Xanthohumol はアサ科のホップ(*Humulus lupulus*)の毬果に多く含まれ、抗菌活性を持つことが知られている。また、ヒト細胞において NF-κB 活性化を阻害し、アポトーシスを誘導することが報告されている^[12]。Magnolol とその異性体の Honokiol はモクレン科のホオノキ(*Magnolia obovata*)の樹皮に多く含まれ、IKK 活性化阻害を介して IκBα リン酸化、IκBα 分解を阻害し、ヒト細胞において NF-κB 標的遺伝子の発現を抑制することが報告されている^[8]。

P-糖タンパク質の ATP 加水分解活性測定において、P-糖タンパク質の ATP 加水分解活性を促進した天然物である Celastrol、Licochalcone A、Anacardic acid、CAPE、Xanthohumol、Magnolol、Honokiol は P-糖タンパク質の基質であると考えられる。

また、NF- κ B 活性化に及ぼす NF- κ B 阻害天然物の影響の測定において、TNF- α による NF- κ B 活性化が濃度依存的に阻害されることが示されたことより、NF- κ B 阻害天然物の少量添加では P-糖タンパク質の基質として細胞外に排出されてしまい、NF- κ B の活性阻害作用が弱かったものと考えられる。よって、P-糖タンパク質の排出能を上回る量の NF- κ B 阻害天然物を添加することで大きな NF- κ B 阻害作用が得られると思われる。

さらに、P-糖タンパク質の阻害作用を持つことが知られている Verapamil との併用においては、Anacardic acid との併用で Anacardic acid 単独時より高い阻害作用を示したことから、P-糖タンパク質阻害剤と併用することで NF- κ B 阻害天然物の細胞内濃度が上昇し、より大きな阻害効果が得られる可能性が窺える。しかし、今回の結果からは全ての天然物において同様な結果が得られたわけではないので、さらなる検証が必要であると思われる。

5. おわりに

本研究から、NF- κ B 阻害天然物を高用量で使用すれば、P-糖タンパク質の抗がん剤などの排泄機構を競合的に阻害し、NF- κ B の活性化を抑制することで新たな P-糖タンパク質の発現を抑制し、抗がん剤による治療効果を上げることができるとと思われる。しかし、本実験はヒト P-糖タンパク質遺伝子導入 KB/MDR1 細胞を用いたものであり、実際の生体においては、天然物を経口投与するのであれば成分の含有率や吸収・分布・代謝・排泄機構などを考慮する必要があり、たとえ安定した血中濃度を保つことができたとしても、標的部位への集積性や正常細胞への影響などを考慮する必要がある為、実用化に向けては多くの障壁がある。しかし、それらをクリアすることができれば今後のがん治療において非常に有用なものとなると思われる。

謝 辞

本研究において KB/MDR1 細胞を御提供いただいた京都大学農学研究科 植田和光教授をはじめ、御指導いただいた諸先生方に感謝申し上げます。

引用文献

1. 高野幹久,細胞工学,27(8),790-795(2008).
2. 古川龍彦,秋山伸一,生化学, 78(2),110-121(2006)
3. Tomohiro Nabekura, Shizu Kamiyama, Shuji Kitagawa, *Biochemical and Biophysical Reserch Communications*, **327**(3),866-870(2005)
4. Tomohiro Nabekura, Takeshi Yamaki,Kazuyuki Ueno, Shuji Kitagawa, *Biochemical and Biophysical Reserch Communications*, **369**(2),363-368 (2008)
5. Tomohiro Nabekura, Takeshi Yamaki,Kazuyuki Ueno, Shuji Kitagawa, *Cancer Chemother Pharmacol*, **62**,867-873(2008)
6. 中野裕康,実験医学,27(8),1160-1165(2007)
7. Jeong-Hyung Lee, Tae Hyeon Koo, Hyunkyung Yoon, Haeng Sun Jung, Hui Zi Jin, Kyeong Lee, Young-Soo Hong, Jung Joon Lee, *Biochemical Pharmacology*,72,1311-1321,2006
8. Kawang Seok Ahn, Gaufam Sethi, Shishir Shishodia, Bokyung Sung, Jack L.Arbiser, Bharat B.Aggarwal, *Mol Cancer Res*,4(9),621-633,2006
9. Gautam Sethi, Kwang Seok Ahn, Manoj K. Pandey, Bharat B.Aggarwal, *Blood*, 109(7),2727-2735,2007
10. Bokyung Sung, Manoj K. Pandey, Kwang Seok Ahn,Tingfang Yi, Madan M.Chaturvedi, Mingyao Liu, Bharat B.Aggarwal, *Blood*,111(10), 4880-4891, 2008
11. K. Natarajan, Sanjaya Singh, Terrence R. Burke, Jr., Dezider Grunberger, Bharat B. Aggarwal, *Immunology* ,93,9090-9095,1996
12. Kuzhuvelil B. Harikumar, Ajaikumar B. Kunnumakkara, Kwang S. Ahn, Preetha Anand, Sunil Krishnan,Sushovan Guha, and Bharat B. Aggarwal,*BLOOD*,113(9),2003-20013,2009