

ジヒドロピリジン誘導体による多剤耐性の克服

神 渡 幹 夫

鹿児島大学医学部産婦人科学教室（主任：永田行博教授）

861

ジヒドロピリジン誘導体による多剤耐性の克服

神 渡 幹 夫

鹿兒島大学医学部産科婦人科学教室 (主任: 永田行博教授)

(原稿受付日 平成元年8月12日)

Overcoming drug resistance in cancer cells with dihydropyridine analogues

Mikio KAMIWATARI

Department of Obstetrics and Gynecology, (Director: Prof. Yukihiro NAGATA, M. D.)
Faculty of Medicine, Kagoshima University, Kagoshima, 890, Japan

Key Words : multidrug-resistance, P-glycoprotein, dihydropyridine analogues

Summary

Ten synthetic dihydropyridine analogues were investigated for their ability to reverse drug-resistance in a multidrug-resistant human carcinoma cell line, KB-C1. Four dihydropyridine analogues completely reversed the resistance, 3 lowered the resistance and 3 had little effect.

The radioactive photoactive dihydropyridine calcium channel blocker, [³H] azidopine, photolabels P-glycoprotein in membrane vesicles from KB-C1 cells. This photolabeling was almost completely inhibited by excess dihydropyridine analogues that reversed or lowered drug-resistance. In contrast, the labeling was not significantly inhibited by analogues that do not reverse resistance. Among other reversing agents, cepharanthine and reserpine inhibited the [³H] azidopine photolabeling, but thioridazine did not. SDB-ethylenediamine slightly inhibited the labeling at 100 μM. An anticancer agent, vinblastine also inhibited the labeling.

The correlation between the reversing of the drug-resistance and the inhibition of the [³H] azidopine photolabeling of P-glycoprotein by dihydropyridine analogues suggests a role for P-glycoprotein in multidrug-resistance and also the reversing of the resistance by dihydropyridine analogues.

はじめに

初回治療時から広範な抗癌剤に耐性な腫瘍や、抗癌剤投与によりいったん寛解したあと再発した腫瘍の中に、同じ抗癌剤やそれとは関連性のない多くの抗癌剤に対して耐性を獲得した腫瘍の出現が臨床の場でしばしば経験され、癌の化学療法を行う上で重大な障害になっている。

最近になりこのような多剤耐性 (multidrug resistance 以下 MDR と略す) についての分子生物学的解析が急速に進み、多剤耐性癌細胞では、

P-糖蛋白質が増加し (Kartner et al. 1985, Gottesman et al. 1988), P-糖蛋白質をコードしている多剤耐性遺伝子 (以下 MDR-1 と略す) の発現が亢進していることが判明した。MDR-1 遺伝子の一次構造が細菌の膜能動輸送蛋白質、特にヘモリンシン B と類似していることから P-糖蛋白質は能動排出ポンプとしての機能を持っていることが推測されている (Gottesman et al. 1988)。P-糖蛋白質は種々の抗癌剤 (Cornwell et al. 1988), および ATP と結合能があり (Gottesman et al. 1988), ATPase 活性を有していることが報告された (Hamada et al.

1988). 米国の Roninson ら (1988) は P-糖蛋白質の185番目のアミノ酸がグリシンからバリンに変化すると細胞がコルヒチンに優先的に耐性になることを示した。しかし、抗癌剤結合部位を含む抗癌剤輸送機構の詳細、および P-糖蛋白質の生理的機能については明らかでない。秋山ら (1985) はヒト癌 KB 細胞より多剤耐性変異細胞を分離し、多剤耐性の機構や耐性克服に関する研究を行い、多くの多剤耐性を克服する物質を見いだした (Fojo et al.1985, Akiyama et al. 1985, Yamaguchi et al. 1986, Nakagawa et al. 1986, Shiraiishi et al. 1986, Shiraiishi et al. 1987, Akiyama et al. 1987)。その大部分が細胞外への抗癌剤の放出を阻害することが判明した (Akiyama et al. 1988)。この実験結果から多剤耐性克服薬剤は P-糖蛋白質の能動排出ポンプとしての機能を阻害していることが推察されていた。

一方、Cornwell ら (1986) はピンブラスチンのフォトアフィニティアナログが特異的に P-糖蛋白質をラベルすることを示した。多剤耐性を克服する薬剤のほとんどが、ピンブラスチンのフォトアナログによる P-糖蛋白質のフォトラベルを阻害することが判明した (Akiyama et al. 1988)。これらの耐性克服薬剤は、ピンブラスチンと競合的に P-糖蛋白質に結合すると考えられる。

最近、Safa ら (1987) によりフォトアクティブなジヒドロピリジン誘導体であるアジドピンが P-糖蛋白質をフォトラベルする事が報告された。さらに、抗癌剤のピンブラスチンやカルシウム拮抗剤のニモジピンがアジドピンのフォトラベルを阻害した。P-糖蛋白質は、多剤耐性を克服するカルシウム拮抗剤のベラパミール・ゲルチアゼム・ジヒドロピリジン誘導体などと結合すると考えられる (Akiyama et al. 1988, Safa et al. 1987)。

本研究では、新たに合成したジヒドロピリジン誘導体につき、多剤耐性克服活性と、 $[^3\text{H}]$ アジドピンによる P-糖蛋白質のフォトラベルを阻害するか否かを調べ、ジヒドロピリジン誘導体による多剤耐性克服の機構を解析した。

方法

1. 細胞培養および細胞株

現在では HeLa 細胞由来とされているヒト鼻咽腔上皮癌 KB 細胞は Gottesman (NCI, Bethesda, MD) より譲渡をうけた。多剤耐性変異細胞 KB-C1細胞は、KB 細胞を突然変異誘発剤エチルメタンスルホネートで処理後、コルヒチンを加えた培地で培養し徐々にコルヒチンの濃度を上昇させ、最終的にコルヒチン濃度を $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ で維持し培養した (Akiyama et al. 1985)。

2. 細胞集落形成能による細胞生存率算出

細胞を60mmのディッシュに300個まき、16時間後に種々の薬剤を加えた。37°Cで10日間培養後に、0.5%メチレンブルーで細胞集落を染色し、数えた。全ての薬剤は使用する直前に dimethyl sulfoxide で溶解した。ピンクリスチン (以下 VCR と略す) に対する相対耐性度は KB 細胞が50%生存する VCR 濃度 (D_{50}) でジヒドロピリジン誘導体存在下での KB 細胞の D_{50} 値を除いた値であらわす。KB-C1細胞も同様に KB 細胞が50%生存する VCR 濃度 (D_{50} 値) でジヒドロピリジン誘導体存在下あるいは非存在下での KB-C1細胞の VCR に対する D_{50} 値を除いた値で示した。

3. カルシウム拮抗活性の測定

カルシウム拮抗活性の測定はカルシウム存在下でのモルモットの盲腸紐の収縮の阻害度により決定した。まず、Hartley 系の雄モルモット (300-400g) より盲腸紐を摘出し37°C, 95% O_2 , 5% CO_2 の条件で生理的塩溶液 ($\text{NaCl}, 135\text{mM}$; $\text{KCl}, 5\text{mM}$; $\text{CaCl}_2, 2\text{mM}$; $\text{MgCl}_2, 1\text{mM}$; $\text{D NaHCO}_3, 15\text{mM}$; $\text{glucose}, 5.5\text{mM}$) のはいた浴槽中で洗浄した。盲腸紐は初期加重を1gで牽引したのち、等張収縮をトランスデューサーで測定した。平衡になった30分後に浴槽中の溶液を Ca^{2+} を含まない高 K^+ の溶液 ($\text{KCl}, 100\text{mM}$; $\text{NaCl}, 40\text{mM}$) に変更した。30分後、盲腸紐が完全に弛緩したのを確認し、10mM の CaCl_2 を加えた。平衡状態になった30分後に、調べる薬剤を加えた。カルシウム拮抗活性は pID_{50} (10^{-4}M のパパベリンによる最大弛緩の50%をもたらすに必要なジヒドロピリジン誘導体量の負の対数) で表わした。

4. membrane vesicle の作成

membrane vesicle は KB-C1細胞より作成した。24×24cmのディッシュに細胞をまき、培養し、confluent な状態になったら、細胞を剥離し集めたのち、遠沈後、

窒素ガスで高圧をかけて細胞を破壊した。その後、蔗糖密度勾配遠心法にて membrane vesicle を分離した (Akiyama et al. 1988)。蛋白濃度は Bradford の方法により測定した (Bradford et al. 1976)。

5. フォトアフィニティラベル

96穴のマイクロプレートに membrane vesicle $48 \mu\text{l}$, $0.75 \mu\text{M}$ の $[^3\text{H}]$ アジドピン ($53 \text{Ci}/\text{nmol}$)、必要に応じて各々の濃度の薬剤を加え反応液の全量を $50 \mu\text{l}$ にしたのち15分間室温で静置した。25°Cで366nmの紫外線を20分間照射したのち、sodium dodecyl sulfate buffer で溶解した。

6. SDS 尿素ゲルによる電気泳動

Debenham ら (1982) の方法のごとく、4.5Mの尿素を含む5%のポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行い、フルオログラフィをおこなった (Bonner et al. 1974)。さらに、バンドに相当するゲルの部位を切り取り放射能活性を測定し、定量化した。蛋白はクマジーブルーで染色した。

7. 免疫沈降

$100 \mu\text{g}$ の membrane vesicle に $1.5 \mu\text{M}$ $[^3\text{H}]$ アジドピンを加えて、上記のごとくフォトラベルをおこない、2mlの buffer A (1% CHAPS を含む) を加え混和し、4°C, 30分間静置した (Hamada et al. 1988)。その後、P-糖蛋白質に対するモノクローナル抗体である C-219 を $4 \mu\text{g}$ 加え、4°Cで2時間反応させた。さらに20% protein A-Sepharose CL-4B を $200 \mu\text{l}$ を加え、攪拌しながら4°Cで30分間反応させた。沈澱を buffer A で4回洗浄し、SDS 尿素ゲルで電気泳動した。

8. 薬剤

ジヒドロピリジン誘導体は日産化学にて新しく合成された。 $[^3\text{H}]$ アジドピンはアマシャムより、ピンクリスチン・アドリアマイシン・アクチノマイシン D はシグマより購入した。SDB エチレンジアミンは日清製粉より、セファランチンは化研生薬より入手した。

結果

1. KB-C1細胞の抗癌剤に対する耐性度

KB-C1細胞は KB-3-1細胞にくらべピンクリスチン (VCR) で1200倍耐性、アクチノマイシン D (ActD) で112倍耐性、アドリアマイシン (ADR) で161倍耐性であった。(表1)。KB-C1細胞が多剤耐性であることがわかる。これらの抗癌剤の化学構造式を図1に示すが、一見して構造上の相関はみられないが、脂溶性

表1 各種の抗癌剤に対する KB-C1細胞の耐性度

細胞集落形成能を指標として各種の抗癌剤に対する感受性をしらべ、KB細胞の D_{50} 値 (50%致死濃度) を1とした時の KB-C1細胞の D_{50} 値の相対値を求め相対的耐性度とした。

細胞株	相対的耐性度		
	VCR	ActD	ADR
KB-3-1	1	1	1
KB-C1	1200	112	161

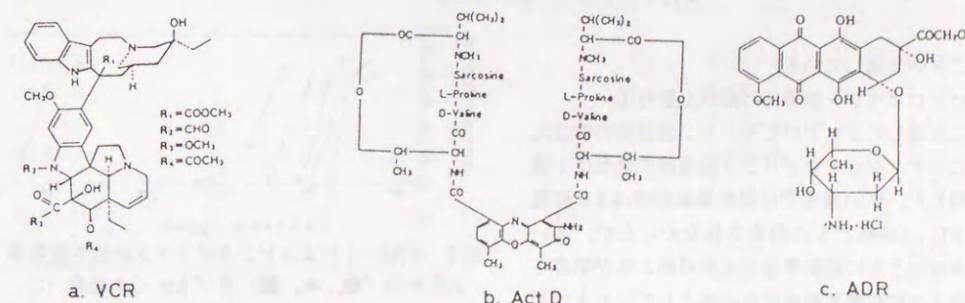


図1 抗癌剤の化学構造式

- a. ピンクリスチン (VCR)
- b. アクチノマイシン D (ActD)
- c. アドリアマイシン (ADR)

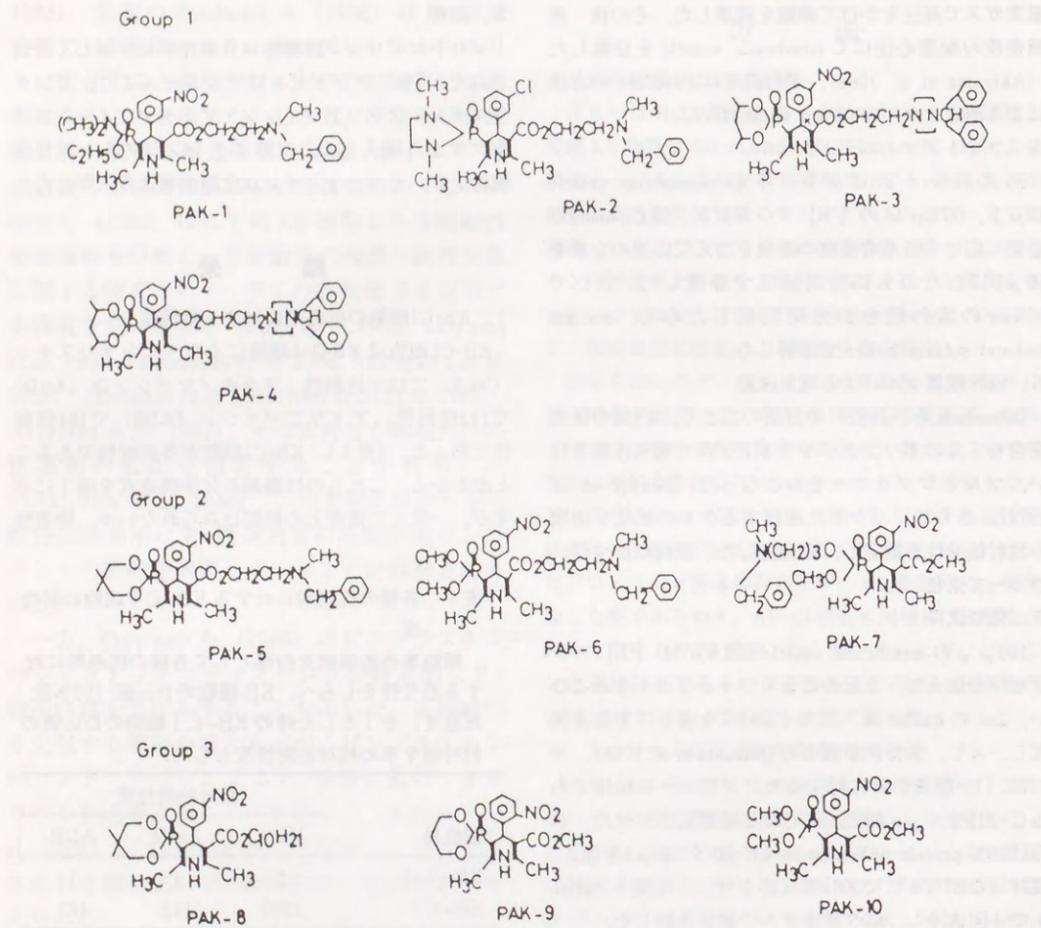


図2 ジヒドロピリジン誘導体の化学構造式
*は不斉炭素原子をあらわす。

であることが共通している。

2. ジヒドロピリジン誘導体の耐性克服作用

新たに合成したジヒドロピリジン誘導体の構造式を図2に示す。ジヒドロピリジン誘導体の濃度は2種類を使用した。低い濃度では細胞集落形成はKB細胞およびKB-C1細胞ともに阻害されなかったが、高い濃度で両細胞ともに細胞集落形成能の約5%が阻害された。図3は細胞集落形成能を指標としてジヒドロピリジン誘導体PAK-1のVCR耐性克服を見たものである。PAK-1を10 μ g/ml加えることによりKB-C1細胞のVCR耐性はほぼ完全に克服された。表2に10種類のジヒドロピリジン誘導体およびニフェジピン・ニカルジピンのビンクリスチン耐性克服

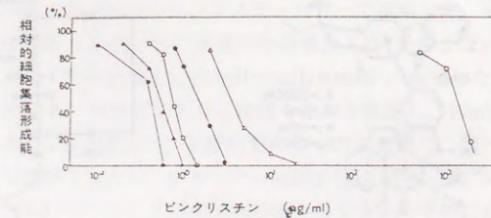


図3 PAK-1によるビンクリスチン耐性克服効果
KB細胞(●, ▲, ■)及びKB-C1細胞(○, △, □)の抗癌剤耐性に対するPAK-1の効果を見たもので細胞集落形成能で算出した。それぞれ、PAK-1を加えなかったもの(●, ○) 5 μ g/ml加えたもの(▲, △), 10 μ g/ml加えたもの(■, □)で表わした。

表2 ジヒドロピリジン誘導体によるKB-C1細胞の抗癌剤耐性の克服

細胞集落形成能を指標としてビンクリスチンに対する感受性を調べ、KB細胞のD₅₀値(50%致死濃度)を1とした時の各細胞のジヒドロピリジン誘導体存在下、非存在下でのD₅₀値の相対値を求め相対的耐性度とした。

ジヒドロピリジン誘導体 (μ g/ml)	ビンクリスチンに対する相対的耐性度	
	KB	KB-C1
Group I		
PAK-1	0	1200
PAK-2	5	0.7
PAK-3	10	0.1
PAK-4	10	0.1
Nicardipine	10	0.1
Group II		
PAK-5	10	1.0
PAK-6	5	—
PAK-7	5	2
Nifedipine	5	0.3
Group III		
PAK-8	5	0.3
PAK-9	5	0.3
PAK-10	5	0.3
Nicardipine	3	0.1
Nifedipine	3	0.5
Nifedipine	6	0.4
Group III		
PAK-8	5	0.3
PAK-9	10	0.2
PAK-10	10	0.2
Nifedipine	10	0.1
Nifedipine	10	0.1
Nifedipine	20	—
Nifedipine	20	—
Nifedipine	5	0.8
Nifedipine	10	0.8
Group III		
PAK-8	5	0.7
PAK-9	10	0.6
PAK-10	10	0.7
Nifedipine	30	0.6
Nifedipine	10	0.7
Nifedipine	30	0.6

効果を示す。PAK-1からPAK-4までの誘導体はKB-C1細胞のVCR耐性をほぼ完全に克服した。これらをグループIとした。PAK-5からPAK-7は部分的に克服した。これらをグループIIとした。PAK-8からPAK-10は耐性をほとんど克服しなかった。これらをグループIIIとした。一方、ニカルジピンは完全にKB-C1細胞の耐性を克服し、ニフェジピンは部分的に克服した。

3. ジヒドロピリジン誘導体のカルシウム拮抗作用

表3に10種類の新しく合成したジヒドロピリジン誘導体のカルシウム拮抗作用を示した。同時に、ニフェジピンやニカルジピンの作用も示した。ニカルジピンは最もカルシウム拮抗活性が強く、PAK-10が最も弱い。今回の新しく合成したジヒドロピリジン誘導体の中でPAK-5が最も強いカルシウム拮抗活性を示した。そこで、耐性克服活性とのカルシウム拮抗活性との相関を調べてみた(図4)。その結果両者には明らかな相関は認められなかった。

4. ジヒドロピリジン誘導体による³HアジドピンのP-糖蛋白質フォトラベルの阻害

フォトアクティブなジヒドロピリジン誘導体である、

表3 ジヒドロピリジン誘導体のカルシウム拮抗作用

pID₅₀はカルシウム拮抗作用の強さを示す指標でありモルモットの盲腸紐のカルシウム収縮を50%阻害する濃度の逆対数であらわす。

薬剤	pID ₅₀
Group I	
PAK-1	7.54
PAK-2	7.37
PAK-3	8.02
PAK-4	7.12
Nicardipine	9.38
Group II	
PAK-5	8.45
PAK-6	7.11
PAK-7	7.18
Nifedipine	8.55
Group III	
PAK-8	6.16
PAK-9	7.51
PAK-10	6.53

[³H] アジドピン (図5) は多剤耐性の Chinese hamster lung cell の細胞膜の P-糖蛋白質をフォトラベルすることが報告された. 多剤耐性を克服するカルシウム拮抗薬は P-糖蛋白質に結合し, P-糖蛋白質の機能を阻害することにより耐性を克服すると推測された (Safa et al. 1987). そこで, [³H] アジドピンによる P-糖蛋白質のフォトラベル実験を行い, ジヒドロピリジン誘導体のフォトラベルへの影響をみた. 図6に見られる如く, [³H] アジドピンは150から170kDaの蛋白質を特異的にフォトラベルした (レーンA). さらにこのフォトラベルされた蛋白質は P-糖蛋白質のモノクローナル抗体である C-219 で免疫沈降した (レーンB) が, コントロールのマウスの IgG では免疫沈降しなかった (レーンC). また, 親株の KB 細胞では150から170kDa のフォトラベル蛋白質を認めなかった.

次に, ジヒドロピリジン誘導体が P-糖蛋白質のフォ

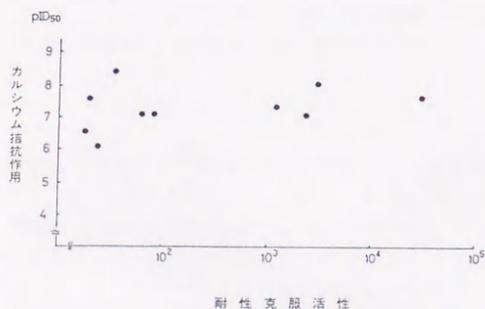


図4 ジヒドロピリジン誘導体の耐性克服活性とカルシウム拮抗作用との相関

耐性克服活性はジヒドロピリジン誘導体存在下での KB-C1 細胞のピンクリスチンに対する D₅₀ 値でジヒドロピリジン誘導体非存在下での KB-C1 細胞の D₅₀ 値を除いた値であらわした.

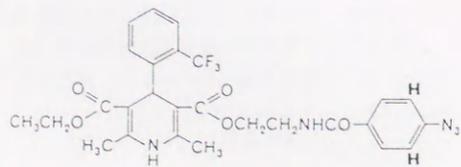


図5 [³H] アジドピンの化学構造式

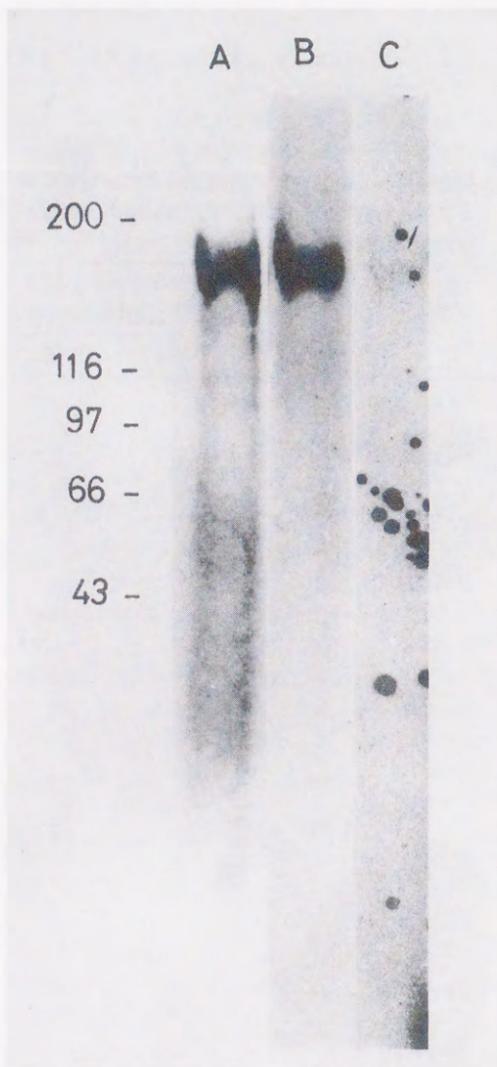


図6 [³H] アジドピンによる P-糖蛋白質のフォトラベル

KB-C1 の vesicle を [³H] アジドピンとインキュベーションし, 紫外線照射したあと, 可溶化して電気泳動し, 乾燥後フルオログラフィーを行なった. A: KB-C1 membrane vesicle をフォトラベルしたあと可溶化して SDS 尿素ポリアクリルアミドゲルで電気泳動をおこなった. B: 同様にフォトラベルしたものを CHAPS で可溶化したあと C-219 を用いて免疫沈降したものを上記ゲルで電気泳動した. C: B と同様の実験であるが, C-219 のかわりに同量のマウス IgG を用いた.

トラベルを阻害するか否かをみた. 図7~9に10種類のジヒドロピリジン誘導体のフォトラベル阻害実験の結果を示した. これらの結果を定量化した結果を図10に示した. グループIの2剤では1から10 μ Mの濃度でフォトラベルを50%阻害した (図10A). グループIの2剤とグループIIの3剤では, 10から100 μ Mの濃度でフォトラベルを50%阻害した (図10B). しかし, グループIIIの3剤は100 μ Mでもフォトラベルを殆ど阻害しなかった (図10C).

5. ピンブラスチンや他の耐性克服薬剤によるフォトラベルの阻害

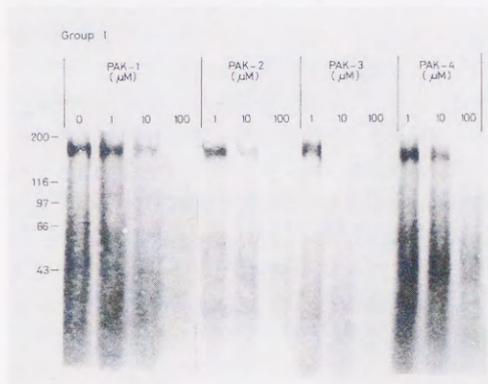


図7 ジヒドロピリジン誘導体 (グループI) による [³H] アジドピンフォトラベルの阻害

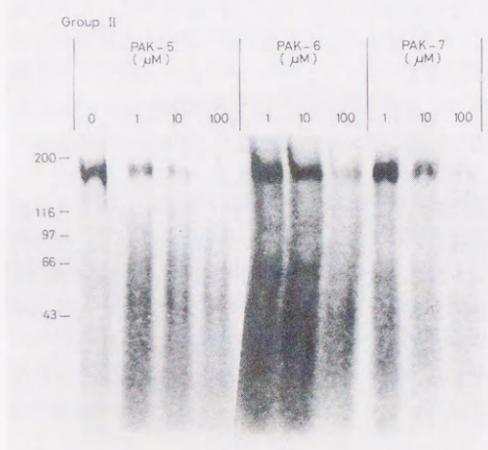


図8 ジヒドロピリジン誘導体 (グループII) による [³H] アジドピンフォトラベルの阻害

ピンブラスチンは10から100 μ Mの濃度でアジドピンのフォトラベルを50%阻害した. さらに他の多剤耐性克服薬剤についても調べてみたところ, セフェランチンとレセルピンは10から100 μ Mの濃度で [³H] アジドピンのフォトラベルを50%阻害した. 一方, 合成

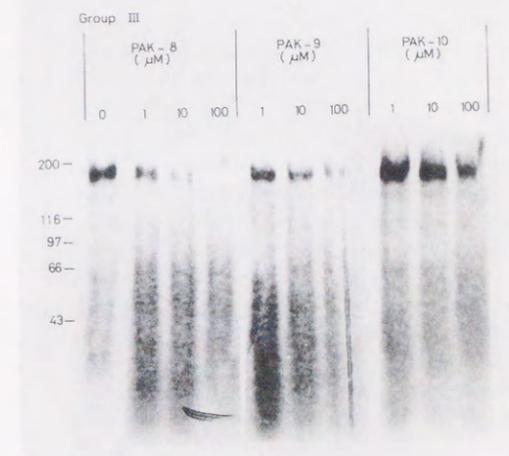


図9 ジヒドロピリジン誘導体 (グループIII) による [³H] アジドピンフォトラベルの阻害

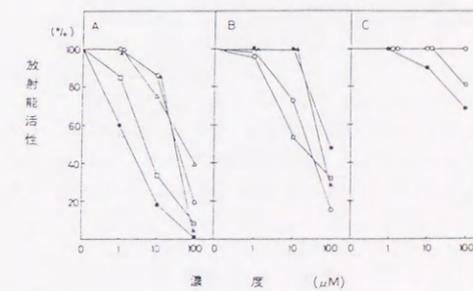


図10 [³H] アジドピンフォトラベルの阻害度の定量

- A: グループIに属するもの
PAK-1 (△), PAK-2 (□),
PAK-3 (●), PAK-4 (○),
Nicardipine (▲)
- B: グループIIに属するもの
PAK-5 (■), PAK-6 (▲),
PAK-7 (○), Nifedipine (□)
- C: グループIIIに属するもの
PAK-8 (●), PAK-9 (○),
PAK-10 (□)

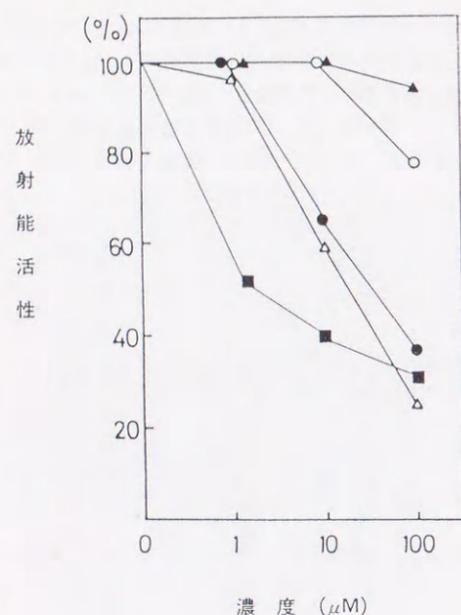


図11 抗癌剤、耐性克服薬剤によるフォトラベルの阻害

- ▲, チオリダジン;
- , SDB エチレンジアミン;
- , セファランチン; △, レセルピン;
- , ビンブラスチン

イソプレノイド SDB エチレンジアミンとフェノチアジン系カルモジュリン阻害剤チオリダジンは100 μM でも殆どフォトラベルを阻害しなかった (図11)。

考 察

本研究では、まず新しく合成したジヒドロピリジン誘導体の多剤耐性克服の活性についてヒト癌 KB 細胞を用いてスクリーニングし、カルシウム拮抗作用との関連性を調べた。その結果、PAK-1 は PAK-5 やニフェジピンに比べてカルシウム拮抗作用は弱い、完全に耐性を克服することが判明した。それに対して、PAK-5 とニフェジピンはカルシウム拮抗作用は PAK-1 より強いが耐性を部分的にしか克服しなかった。PAK-9 は PAK-6 や PAK-7 よりもカルシウム拮抗作用は強いが、耐性克服作用は弱い。これらのことより、ジヒドロピリジン誘導体の多剤耐性克服効果

とカルシウム拮抗活性とは必ずしも相関しないことがわかった。

秋山らはこれまで、合成イソプレノイドである SDB エチレンジアミンはカルシウム拮抗作用はないが、KB 細胞の多剤耐性を完全に克服することを報告してきた (Nakagawa et al. 1986, Yamaguchi et al. 1986)。カルシウム拮抗作用は耐性克服薬剤が耐性を克服するためには必ずしも必要ではないと考えられる。今回実験に用いた耐性克服活性を有するジヒドロピリジン誘導体には、その構造式の中に陽性に荷電した窒素原子が含まれる。耐性克服活性がない誘導体はそれを含まない。しかし、今回は10種類のジヒドロピリジン誘導体についての結果であるため、多剤耐性克服活性と構造式との相関については、より多数のジヒドロピリジン誘導体を検討する必要がある。

最近、Safa ら (1987) や Yang ら (1988) が [³H] アジドピンは P-糖蛋白質をフォトラベルし、このフォトラベルは抗癌剤のビンブラスチンや数種のカルシウム拮抗剤により阻害されることを報告した。我々も、多剤耐性細胞より抽出した membrane vesicle の P-糖蛋白質への [³H] アジドピンフォトラベルがジヒドロピリジン誘導体で阻害されることを証明した。耐性克服活性をもつジヒドロピリジン誘導体 (グループ I および II) は [³H] アジドピンのフォトラベルを阻害した。一方、耐性克服活性のみられないグループ III の誘導体はわずかにフォトラベルを阻害するのみであった。これらの結果から多剤耐性を克服するジヒドロピリジン誘導体が P-糖蛋白質の機能に影響を与えていると推測される。また、P-糖蛋白質が殆ど発現していない親株の KB 細胞でも、数種のジヒドロピリジン誘導体を加えることにより VCR に対してより感受性が増加していた。これらの誘導体は P-糖蛋白質と異なるある種の細胞構成成分に作用して KB 細胞の VCR 感受性を変えていると推測される。

P-糖蛋白質への [³H] アジドピンの結合は他の耐性克服薬剤のセファランチン (Shiraishi et al. 1987) やレセルピン (Inaba et al. 1981) により阻害されたが、チオリダジンでは阻害されなかった。また SDB エチレンジアミンは部分的にしか阻害しなかった。 [³H] アジドピンが P-糖蛋白質に結合する部位はセファランチン、レセルピンおよびジヒドロピリジン誘導体の P-糖蛋白質への結合部位と同じか、一部重なっていることが示唆された。

秋山らは (1988)、最近 SDB エチレンジアミンを

文 献

¹²⁵I でラベルしたフォト誘導体を合成し、SDB エチレンジアミンが P-糖蛋白質に結合すること、その SDB エチレンジアミンのフォト誘導体の結合はビンブラスチンによって阻害されることを証明した。また、SDB エチレンジアミンは ¹²⁵I-NASV による P-糖蛋白質のフォトラベルを阻害した (Akiyama et al. 1988)。

以上のことより、SDB エチレンジアミンの P-糖蛋白質へ結合部位はビンブラスチンと同じかあるいは重なっているが、 [³H] アジドピンとは結合部位が同一ではないことも推測される。一方、ビンブラスチンが [³H] アジドピンのフォトラベルも阻害することを考慮すれば、SDB エチレンジアミンとアジドピンの結合部位は非常に近接しているか、一部重なっていると推測される。

他の可能性として、1) P-糖蛋白質へのこれらの薬剤の結合部位は同じであるが結合力が薬剤により異なる、2) これらの薬剤が P-糖蛋白質に結合することで蛋白質自体が構造変化をきたし、他の薬剤との結合力が変化することなどが推測される。最近、秋山らは SDB エチレンジアミンのフォト誘導体の Kd 値がアジドピンの Kd 値よりも大きいことを見いだした (未発表)。今後の研究により、抗癌剤や耐性克服薬剤の P-糖蛋白質への結合部位を解明し、結合部位の詳細な構造を明らかにする必要がある。

以上の結果は、市販されている [³H] アジドピンを使用し、P-糖蛋白質へのフォトラベルの阻害度を指標とすることにより、多剤耐性克服活性を有する薬剤のスクリーニングを簡便にできることを示唆している。しかしながら、いくつかの誘導体は P-糖蛋白質の機能を阻害するためには、あらかじめ細胞内で代謝を受ける必要があるかもしれない。今回の実験系では、そのような誘導体はクスリーニング不可能と思われる。

おわりに、御指導、御校閲をいただいた永田行博教授、ならびに終始直接御指導いただいた腫瘍研究施設秋山伸一教授に深謝いたします。

なお、本論文の一部は第47回日本癌学会 (1988年)、第41回日本産科婦人科学会学術講演会 (1989年) において発表した。

- 1) Akiyama, S., Fojo, A., Hanover, J. A., Pastan, I., and Gottesman, M. M. (1985) : Isolation and genetic characterization of human KB cell lines resistant to multiple drugs. *Somat. Cell Mol. Genet.* 11:117-126
- 2) Akiyama, S., Shiraishi, N., Kuratomi, Y., Nakagawa, M., and Kuwano, M. (1986) : Circumvention of multiple-drug resistance in human cancer cells by thioridazine, trifluoperazine, and chlorpromazine. *J. Natl. Cancer Inst.* 76:839-844
- 3) Akiyama, S., Shiraishi, N., Yoshimura, A., Nakagawa, M., Yamaguchi, T., Shimada, T., and Kuwano, M. (1987) : Enhancement by a synthetic isoprenoid of the toxicity of conjugates of epidermal growth factor with pseudomonas exotoxin. *Biochem. Pharmacol.* 36:861-868.
- 4) Akiyama, S., Cornwell, M. M., Kuwano, M., Pastan, I., and Gottesman, M. M. (1988) : Most drugs that reverse multidrug resistance also inhibit photoaffinity labeling of P-glycoprotein by a vinblastine analog. *Mol. Pharmacol.* 33:144-147
- 5) Bonner, W. M., and Laskey, R. A. (1974) : A film detection method for tritium-labeled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels. *Eur. J. Biochem.* 46:83-88
- 6) Bradford, M. M. (1976) : A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254
- 7) Cornwell, M. M., Gottesman, M. M. and Pastan, I. (1986) : Increased vinblastine binding to membrane vesicles from multidrug-resistant KB cells. *J. Biol. Chem.* 261:7921-7928
- 8) Cornwell, M. M., Safa, A. R., Felsted, R. L., Gottesman, M. M., and Pastan, I. (1986) : Membrane vesicles from multidrug-resistant human cancer cells contain a specific 150,000-170,000 dalton protein detected by photoaffinity labeling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:3847-3850.
- 9) Debenham, P. G., Kartner, K., Siminovitch, L., Riordan, J. R., and Ling, V. (1982) : DNA mediated transfer of multiple drug resistance and plasma membrane glycoprotein expression. *Mol. Cell. Biol.* 2:881-884
- 10) Fojo, A., Akiyama, S., Gottesman, M. M., and Pastan, I. (1985) : Reduced drug accumulation in multiple drug resistant human KB carcinoma cell lines. *Cancer Res.* 45:3002-3007
- 11) Gottesman, M. M., Roninson, I. B. and Pastan, I. (1988) : In drug resistance. Edited by Kessel, D., CRC, Boca Rato, FL.

- 12) Gottesman, M. M., Pastan, I., Akiyama, S., Ueda, K.(1988) : Expression, Amplification, and transfer of DNA sequences associated with multidrug resistance. In Bristol-Myers Cancer Symposia 9; Mechanism of Drug Resistance in Neoplastic Cells. edited by Wooley III, P. V. and Tew, K. D., Academic Press.
- 13) Gottesman, M. M., and Pastan, I.(1988) : The multidrug transporter, a double-edged sword. *J. Biol. Chem.* 263:12163-12166.
- 14) Hamada, H., and Tsuruo, T.(1988) : Purification of the P-glycoprotein associated with multidrug-resistance. *J. Biol. Chem.* 263:1454-1458
- 15) Inaba, M., Fujikura, R., Tsukagoshi, S., and Sakurai, Y.(1981) : Sensitivity of Adriamycin and vincristine resistant P388 leukemia restored in vitro with reserpine. *Biochem. Pharmacol.* 90:2191-2194.
- 16) Kartner, N., Evernden-Porelle, D., Bradley, G., and Ling, V.(1985) : Detection of P-glycoprotein in multidrug-resistant cell lines by monoclonal antibodies. *Nature (London)*316:820-823
- 17) Nakagawa, M., Akiyama, S., Yamaguchi, T., Shiraishi, N., Ogata, J., and Kuwano, M. (1986) : Reversal of multidrug resistance by synthetic isoprenoids in KB human cancer cell line. *Cancer Res.* 46:4453-4457
- 18) Nakagawa, M., Akiyama, S., Yamaguchi, T., Shiraishi, N., Ogata, J., and Kuwano, M. (1986) : Reversal of multidrug resistance by synthetic isoprenoids. *J. Natl. Cancer Inst.* 76:947-953.
- 19) Safa, A. R., Glover, C. J., Swell, J., Meyers, M. B., Biedler, J. L., and Felsted, R. L. (1987) : Identification of the multidrug resistance-related membrane glycoprotein as an acceptor for calcium channel blockers. *J. Biol. Chem.* 262:7884-7888
- 20) Shiraishi, N., Akiyama, S., Kobayashi, M. and Kuwano, M. (1986) : Lysosomotropic agents reverse multiple drug resistance in human cancer cells. *Cancer Lett.* 30:251-259
- 21) Shiraishi, N., Akiyama, S., Nakagawa, M., Kobayashi, M., and Kuwano, M. (1987) : Effect of bis-benzylisoquinoline (biscoclaurine) alkaloids on multidrug-resistance in the KB human cancer cells. *Cancer Res.* 47:2413-2416.
- 22) Yamaguchi, T., Nakagawa, M., Shiraishi, N., Yoshida, T., Kiyosue, T., Arita, M., Akiyama, S., and Kuwano, M. (1986) : Overcoming drug resistance in cancer cells with synthetic isoprenoids. *J. Natl. Cancer Inst.* 76:947-953.
- 23) Yang, C. -P. H., Mellad, W., and Horwitz, S. B. (1988) : Azidopine photoaffinity labeling of multidrug resistance associated glycoproteins. *Biochem. Pharmacol.* 37:1417-1421.

