

研究サブ・グループ2

コプラナーPCBsによるABCタンパク質機能阻害がxenobioticsの細胞毒性およびステロイドホルモン代謝に与える影響

藤瀬 浩 (獣医学部)

萩原 喜久美 (環境保健学部)

落合秀治 (生物科学総合研究所)

片倉 賢 (客員研究員, 群馬大学医学部)

植田和光 (客員研究員, 京都大学大学院農学研究科)

目 的

現在までにP-糖タンパク質 (PGP) 発現KB3細胞を用いて, Co-PCBsがPGPによる薬物排出を阻害する可能性を示してきた [1]。本年度は, 上皮細胞での経細胞層輸送へのPCB126の影響を検討するため, 腎尿管由来細胞 (LLC-PK1) へのPGPコードMDR1遺伝子の導入を試みる。さらに, Co-PCBsとPGPの結合解析のため, His⁶¹変異PGP発現細胞を用いる準備を行う。

方 法

Co-PCBsによるPGPの薬物輸送阻害:

野生型および変異型PGPをコードする各MDR1遺伝子を使用して [4], 既報に準じてブタ腎尿管由来細胞であるLLC-PK1に野生型PGP (LLC-His⁶¹), およびPGPの61番目のHisをPheあるいはSerに置換した変異PGP導入細胞を作出した (それぞれLLC-Phe⁶¹およびLLC-Ser⁶¹) [5]。まず, これらの細胞のvinblastineおよびcolchicineに対する耐性, および細胞内蓄積を測定した。次にフィルター底のTranswell上に単層細胞層を形成し [2, 3, 5], 上記薬物の経上皮細胞層輸送へのPCB126の影響を検討した。

結果と考察

Co-PCBsによるPGPの薬物輸送阻害:

各MDR1遺伝子導入細胞へのPGPの発現がwestern blotで確認された。各細胞のvinblastineに対する耐性はKB3による結果同様 [4], LLC-Ser⁶¹ >> LLC-His⁶¹ >> LLC-Phe⁶¹ >> LLC-PK1であり, colchicineに対する耐性はLLC-Phe⁶¹ >> LLC-Ser⁶¹ >> LLC-His⁶¹ >> LLC-PK1であった。各細胞へのvinblastine蓄積はLLC-PK1 >> LLC-Phe⁶¹ >> LLC-Ser⁶¹ >> LLC-His⁶¹であり, colchicineの蓄積はLLC-PK1 >> LLC-Ser⁶¹ >> LLC-His⁶¹ >> LLC-Phe⁶¹であった。単層細胞層では, 基底膜側から頂側膜側への正味のvinblastine輸送活性はLLC-Ser⁶¹ = LLC-His⁶¹ >> LLC-Phe⁶¹ >> LLC-PK1であった。薬物耐性増強と蓄積量減少あるいは薬物輸送促進の間には相関があり, PGP発現が薬物排泄による薬剤耐性をもたらすことが示された。また, His⁶¹のPGP変異が薬物排泄能を変化させることも示された。単層細胞層では, PCB126を頂側膜側へ添加すると正味の基底膜側から頂側膜側への薬物輸送が抑制され, 基底膜側への添加でそれが亢進した。これらの結果はPCB126が, それぞれ頂側膜および基底膜でPGPを含む薬物輸送ポンプによる薬物排出を阻害することを検出したと推察した。

文 献

- 1) 案浦 健, 笹渡繁己, 松谷はるか, 池田輝雄, 植田和光, 藤瀬 浩, 変異ヒトP糖タンパク質発現KB-3細胞の薬物排泄能の変化とtetrachlorobiphenylによる排出阻害. 獣医生化学, 38: 27-34 (2001)
- 2) Fujise, H., Annoura, T., Sasawatari, S., Ikeda, T. and Ueda, K. Transepithelial transport and cellular accumulation of steroid

- hormones and polychlorobiphenyl in porcine kidney cells expressed with human P-glycoprotein. *Chemosphere*, 46: 1505-1511 (2002)
- 3) Sasawatari, S., Fujise, H., Ikeda, T. and Ueda, K. Effect of pentachlorobiphenyl on accumulation and transepithelial transport of vinblastine in LLC-PK1 expressing human P-glycoprotein. *Organohalogen Compounds*, 53: 450-453 (2000)
 - 4) Taguchi, Y., Kino, K., Morishima, M., Komano, T., Kane, S. E. and Ueda, K. Alteration of substrate specificity by mutations at the His⁶¹ position in predicted transmembrane domain 1 of human MDR1/P-glycoprotein. *Biochemistry*, 36, 8883-8889 (1997)
 - 5) Tanigawara, Y., Okumura, N., Hirai, M., Yasuhara, M., Ueda, K., Kioka, N., Komano, T. and Hori, R. Transport of digoxin by human P-glycoprotein expressed in a porcine kidney epithelial cell line (LLC-PK1). *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 263, 840-845. (1992)

要 約

野生型および His⁶¹ を Phe もしくは Ser に置換した P-糖タンパク質 (PGP) を発現した LLC-PK1 を作出した。これらの PGP 発現細胞の vinblastine および colchicine 耐性は増強し、細胞内蓄積は減少していた。PCB-126 はフィルター上に培養した PGP 発現細胞で vinblastine の経上皮細胞層輸送を阻害した。

Research Group 2

“Effect of coplanar PCBs on cell toxicity of xenobiotics and metabolism of steroid hormone by functional inhibition of ABC protein.”

Hiroshi Fujise, Hideharu Ochiai (School of Veterinary Medicine)

Kikumi Ogihara (School of Environmental Health)

Ken Katakura (Visiting Researcher), Kazumitsu Ueda (Visiting Researcher)

Abstract: The LLC-PK1 cells expressing wild type P-glycoprotein (PGP) and mutant PGP in which His⁶¹ was substituted with Phe or Ser were prepared. In these PGP expressing cells, tolerances to vinblastine and colchicine were increased, and accumulations of these drugs were reduced. PCB-126 inhibited transepithelial transport of vinblastine in these PGP expressing cells on the bottom filtered well.