

兵庫医療大学大学院薬学研究科学位論文

Improvement on the potency of anticancer drug cisplatin.

抗がん薬シスプラチンの有用性向上に関する研究

2020年3月

安田 恵

目次

序論	1
本論	
第一章 腎障害予防のための Mg 投与による CDDP の抗腫瘍効果への影響	
1-1. 緒言	3
1-2. 実験材料および方法	4
1-2-1. 細胞培養	
1-2-2. Mg 接触条件	
1-2-3. RNA 抽出および real-time PCR	
1-2-4. SDS-PAGE および western blot 法	
1-2-5. 細胞内白金量	
1-2-6. SRB assay	
1-2-7. 統計学的処理	
1-3. 結果	6
1-3-1. Mg 接触によるトランスポーターの mRNA 発現量の変化	
1-3-2. Mg 接触によるトランスポーターのタンパク質発現量の変化	
1-3-3. 細胞内白金量および細胞内 Mg 量に対する Mg 併用の影響	
1-3-4. CDDP の細胞増殖抑制効果に対する Mg 併用の影響	
1-4. 考察	13

第二章 CDDP の抗腫瘍活性に対する Pregnane X receptor の影響

2-1. 緒言	15
2-2. 実験材料および方法	17
2-2-1. 細胞培養	
2-2-2. SRB assay	
2-2-3. Caspase-3 活性 assay	
2-2-4. 細胞内白金量	
2-2-5. RNA 抽出および real-time PCR	
2-2-6. 統計学的処理	
2-3. 結果	19
2-3-1. CDDP 接触による caspase-3 の活性化について	
2-3-2. CDDP 接触による核内受容体の発現量への影響	
2-3-3. PXR アゴニスト RFP の CDDP 抗腫瘍活性に対する影響	
2-3-4. PXR アンタゴニスト LEF の CDDP 耐性への影響	
2-4. 考察	25

第三章 PXR アンタゴニストによる CDDP の抗腫瘍効果増強機構

3-1. 緒言	27
3-2. 実験材料および方法	29
3-2-1. 細胞培養	
3-2-2. Caspase-3 活性 assay	
3-2-3. 細胞内白金量	

3-2-4.	RNA 抽出および real-time PCR	
3-2-5.	SDS-PAGE および western blot 法	
3-2-6.	統計学的処理	
3-3.	結果	31
3-3-1.	PXR アンタゴニスト併用による Caspase-3 活性への影響	
3-3-2.	PXR アンタゴニスト併用による細胞内白金量への影響	
3-3-3.	PXR アンタゴニスト併用による MRP2 mRNA 発現への影響	
3-3-4.	PXR アンタゴニスト併用による MRP2 タンパク質発現への影響	
3-4.	考察	36
	総括	38
	参考文献	40
	主論文	50

序論

シスプラチン (CDDP) は、米国において偶然に発見された低分子白金錯体である。日本においては 1984 年に承認を受けて以来、肺がん、胃がんおよび膀胱がんなどの多くの固形がんに対し適応を拡大し、現在も多くのレジメンにて使用されている。CDDP は高い抗腫瘍効果を示す一方で、腎障害、悪心嘔吐、難聴、骨髄抑制などの厳しい副作用を有する。特に、腎障害は CDDP の用量制限因子であり、治療の継続の妨げとなっている。

抗がん剤の有用性を高める方法としては、副作用の軽減や DDS、プロドラッグ化等による効果増強がある。腎障害の予防として、CDDP の添付文書では、計 2.5~5 L、10 時間以上かけて補液を CDDP の投与前・投与中・投与後に行うこととされている。患者に大量の水分を投与する水分負荷法は、尿中の CDDP 濃度を下げる、かつ、CDDP と腎尿細管の接触時間を短縮することで腎障害を軽減すると考えられている^{1,2)}。近年では、腎機能や心機能が十分に保持されており、全身状態が良好、患者自身が飲水に対し十分に理解できるような場合は、経口補液を追加するショートハイドレーション法が用いられるようになった。これにより、外来においても CDDP 治療を受けることが可能となった。また、CDDP 投与により、近位尿細管等でマグネシウム (Mg) の再吸収の低下が生じ、低 Mg 血症が生じることが知られている³⁾。動物実験では、低 Mg 血症時には、近位尿細管において CDDP の過剰な蓄積が生じ、腎障害が引き起こされることが示されている⁴⁾。CDDP 投与時の Mg の補充投与は、腎トランスポーターの発現と活性に影響を与え、CDDP の排泄促進が生じ、腎障害を予防すると考えられている⁵⁾。近年では、水分負荷法およびショートハイドレーション法のどちらにおいても、CDDP 起因性腎障害の予防のための Mg の補充投与が推奨されている^{6, 7)}。しかし、がん細胞における CDDP の蓄積と抗腫瘍効果に対する Mg の補充投与の影響については報告されていない。

抗がん剤の効果増強の手法の 1 つとして、リポソーム化⁸⁾、ミセル化⁹⁾などが行われており、CDDP においても内包ミセル製剤が開発されている¹⁰⁾。従来の白金系抗がん剤に対して交差耐性を示さない、あるいは副作用のさらに少ない白金系抗がん剤誘導体の開発も行われているが^{11,12)}、より副作用も少なく、効果的な化合物の開発には至っていない。また、フルオロウラシル系抗がん剤では、酵素変換により腫瘍内活性薬物濃度を高める方法や、薬物排出機構として知られている multidrug resistance protein 1 (MDR1) などを阻害し、抗がん剤の細胞レベルでの蓄積量の増大を目的とした研究も行われている。CDDP は中性金属錯体であるため、がん細胞の膜に容易に浸透できると考えられてきた。しかし、CDDP の細胞内取り込みにおいて能動輸送と受動輸送の両方の関与が多くの細胞株で報告されている^{13,14)}。CDDP の耐性化の要因の一つには、細胞内白金量の減少があげられ、細胞内取り込み量の低下、細胞外排出量の亢進、あるいはその両方によって生じる。CDDP の細胞内取り込み機構

にはさまざまなトランスポーターの関与が報告されている。以前の研究において、細胞内白金量の低下を示す CDDP 耐性細胞は、複数のトランスポーターの発現量の変化を伴う不均一な細胞の集団で構成されていることを報告した¹⁵⁾。したがって、CDDP の細胞内取り込みに関わる特定のトランスポーターを利用した CDDP の有用性改善は困難であると判断された。また、排出機構の亢進においては、multidrug resistance associated protein 2 (MRP2) の関与が報告されているが、MRP2 を特異的に阻害する薬剤はない。そこで、CDDP 耐性を克服する手法として、トランスポーター自体ではなくトランスポーターの発現を調節している核内受容体に焦点を当てた。リガンド依存性転写調節因子としての核内受容体は、標的遺伝子の発現を負または正に制御する。さらに、これらの受容体は、細胞分化、発生、代謝、恒常性などの重要な生物学的現象を厳密に制御することが知られている¹⁶⁾。CDDP を輸送するトランスポーターの発現を制御している核内受容体のリガンドと CDDP との併用は、CDDP の効果を高め、さらには CDDP 耐性を克服することが期待される。

本研究では、CDDP 治療中の Mg の補充投与による、がん細胞の白金蓄積量および CDDP の抗腫瘍効果への影響について検討を行った。また、CDDP の抗腫瘍効果を増強させる目的で、トランスポーターや代謝酵素の発現調節をしている核内受容体に着目した。CDDP の抗腫瘍効果における核内受容体の関与について検討を行い、さらに、核内受容体のリガンドを CDDP に併用した場合、CDDP の抗腫瘍効果への影響とその機構の解明を目的として検討を行った。

本論

第一章

腎障害予防のための Mg 投与による CDDP の抗腫瘍効果への影響

1-1. 緒言

CDDP の腎障害の軽減に対して、大量の補液やマンニトールなどの利尿薬投与が、白金代謝物を速やかに排泄し、尿細管との接触時間を低下させることで腎障害を軽減するために行われている。また、CDDP 投与時に、血清 Mg 濃度の低下が高頻度に発現し^{3,17,18)}、低 Mg 血症が腎障害を引き起こす可能性も報告されている。そのため、CDDP の腎障害への対策の 1 つとして、8~16 mEq の Mg の補充投与が推奨されている。

Mg は、人体において 4 番目に多いカチオン性金属元素である。生体内で、エネルギー生産、酸化的リン酸化、解糖のために必要であり、骨格系の発達を助ける働きもしている。また、DNA、RNA、および抗酸化物質であるグルタチオンの合成にも必要な金属元素である^{19,20)}。腎機能が正常な患者では、糸球体でろ過された Mg のうち、20%は近位尿細管、70%はヘンレの太い上行脚、5%は遠位尿細管から再吸収され、尿中に排泄されるのはわずか 5%である。CDDP 投与後にみられる血清 Mg 濃度の低下は、CDDP 投与により引き起こされる Mg 再吸収の低下によると考えられている^{17,21)}。

CDDP による腎障害には、トランスポーターの関与も報告されている。腎組織切片を CDDP 含有培地で培養すると、培地中濃度と比べて組織内濃度は約 5 倍高くなることが示された²²⁾。また、CDDP を投与されたラットの近位尿細管では、投与初期から重度の障害を認め、CDDP における腎障害は近位尿細管部位に生じることが明らかとされた²³⁾。CDDP は、近位尿細管の側底膜に発現するトランスポーターによって取り込まれ、それによって近位尿細管に強い毒性を引き起こすとされている。トランスポーターとして、organic cation transporter (OCT) が CDDP の尿細管細胞への蓄積をもたらし、multidrug and toxin extrusion (MATE) が尿細管内腔への排出を行っている²⁴⁾。血清 Mg 濃度が低下した状態では、OCT の発現量が増大、MATE の活性が減弱するため、尿細管細胞内への CDDP の過剰な蓄積が生じ、腎障害を引き起こすことが報告されている^{25,26)}。がん細胞における CDDP の細胞内取り込みおよび排出においてもさまざまなトランスポーターが関与することが報告されている。血清 Mg 濃度の変化が、がん細胞におけるトランスポーター発現にも影響を及ぼし、CDDP の抗腫瘍効果にも影響を与える可能性が考えられる。

本章では、2 種のがん細胞を用いて、Mg の併用がトランスポーター発現と CDDP の細胞増殖抑制効果および細胞内蓄積に与える影響について検討を行った。

1-2. 実験材料および方法

1-2-1. 細胞培養

ヒト肝がん株 HepG2 細胞およびヒト卵巣がん株 2008 細胞は、大日本製薬から購入した。細胞は、5% CO₂、37°Cで 10% FBS 含有 MEM 培地で *in vitro* 継代維持した細胞を用いた。

1-2-2. Mg 接触条件

細胞を維持する培地中の Mg 濃度は 0.5 mM であった。ヒト血清の通常の Mg 濃度は約 1 mM である。CDDP 腎障害の予防のために、臨床の治療においては、8 mEq の硫酸 Mg が投与されている³⁾。循環血液量を考慮すると、血清 Mg 濃度は約 1 mM 増加し、2 mM になると考えられる。したがって、Mg 接触群では、硫酸 Mg (1 mEq/mL) を培地に添加し、最終 Mg 濃度が 2 mM となるように調整した。

1-2-3. RNA 抽出および real-time PCR

HepG2 細胞または 2008 細胞を、75 cm² の組織培養フラスコに、1.0×10⁶ 個の細胞を播種し、24 時間後、2 mM Mg に接触させた。Mg に 8 時間接触後、細胞を回収し、冷 PBS で 3 回洗浄した。FastGene Premium Kit (NIPPON Genetics) を用いて total RNA を抽出し、NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific) を用いて RNA 濃度を測定した。PrimeScript II First Strand cDNA 合成キット (Takara Bio) を使用した逆転写により、total RNA から cDNA を合成した。Real-time PCR は、調製した cDNA、Table 1 の各種 primer および KAPA SYBR Fast qPCR キット (NIPPON Genetics) を用いて Rotor-Gene Q (Qiagen) を使用し、SYBER-GREEN 法にて行った。相対的 mRNA 発現量は、housekeeping gene として、GAPDH を用いた、 $\Delta\Delta$ CT 法によって解析した。

Table 1 使用した primer の塩基配列

Gene	Sense primer	Antisense primer
OCT1	5'-ACT TCA TAG CGC CTG CAC TG-3'	5'-TCC TCA TCT TAT GCC TGC TG-3'
MATE1	5'-TGTCACCTGGTGTCTCAGTGG-3'	5'-GTAAGCCTGGACACATCTGG-3'
MRP2	5'-AGG CAC TCC AGA AAT GTG CT-3'	5'-GAC TAT GGG CTG ATA TCC AGT GT-3'
GAPDH	5'-CCA TCA CCA TCT TCC AGG AG-3'	5'-CCT GCT TCA CCA CCT TCT TG-3'

1-2-4. SDS-PAGE および western blot 法

HepG2 細胞または 2008 細胞を、75 cm² の組織培養フラスコに、1.0×10⁶ 個の細胞を播種し、24 時間後、2 mM Mg に接触させた。Mg 接触 24 時間後に、細胞を回収し、冷 PBS で 3 回洗浄した。細胞の膜タンパク質画分は、plasma membrane protein extraction kit (MBL) を用

いて抽出した。タンパク質 20 $\mu\text{g}/\text{lane}$ を、ポリアクリルアミドゲルを用いて SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) によって分離し、polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜に転写した。メンブレンを Bullet Blocking One for Western Blotting (ナカライテスク) に浸し、1 時間室温で振盪させた。1 次抗体として MRP2 (24893-1-AP、Proteintech)、OCT1 (24617-1-AP、Proteintech)、MATE1 (#14550、Cell Signaling Technology)、または GAPDH (10494-1-AP、Proteintech) をそれぞれ用い、4°C で一晩反応させた。PVDF 膜を PBS-T (FUJIFILM Wako Pure Chemical) ですすぎ、その後、horseradish peroxidase (HRP) -conjugated anti-rabbit IgG (#7470、Cell Signaling Technology) を室温で 1 時間反応させた。その後、PVDF 膜を洗浄し、ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare Japan) で可視化を行った。

1-2-5. 細胞内白金量

HepG2 細胞または 2008 細胞を、75 cm^2 の組織培養フラスコに、 1.0×10^6 個の細胞を播種し、24 時間後 2 mM Mg および/または 25 μM CDDP に接触させた。CDDP に 8 時間あるいは 24 時間接触後、細胞を回収し、冷 PBS で 3 回洗浄した。各群の細胞の一部 (5%) を用い、BCA Protein Assay Kit (Pierce) にてタンパク質含量の測定を行った。残りの細胞ペレットを、過塩素酸と 30% 過酸化水素が 1 : 2 の比率の酸混合物 1.5 mL に懸濁し、65°C で一晩静置し細胞を溶解させた。サンプル中の白金量は、SPS 3100 Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometer (ICP-OES、日立ハイテクサイエンス) にて測定した。結果は、タンパク質 1 mg あたりの白金量 (ng) として表した。

1-2-6. SRB assay

細胞毒性試験は、sulforhodamine B (SRB、ナカライテスク) を使用して実施した。HepG2 細胞または 2008 細胞をそれぞれ 96 well plate に 4.0×10^3 または 1.5×10^3 個/well となるように播種し、24 時間後、2 mM Mg および/または数段階の濃度の CDDP に接触させた。96 時間の培養後、細胞を 10% トリクロロ酢酸で固定後、水で洗浄し、乾燥させた。その後、0.4% SRB 溶液を添加し、室温で 30 分間インキュベートした。プレートを再洗浄し、結合した染色液を trisma base solution (ナカライテスク) で可溶化し、マイクロプレートリーダー (Model 550、BIO-RAD) にて 570 nm の吸光度を測定した。データは Microsoft Excel を用いて評価し、相対生存細胞の割合は、コントロール群に対して各薬物接触群で計算した。すべてのデータは、5 つの well の平均値を用いた。

1-2-7. 統計学的処理

結果は平均 \pm 標準偏差 (SD) として表した。統計分析は、コントロール群との多重比較のために、Dunnett's test を使用した。p < 0.05 は有意とみなした。

1-3. 結果

1-3-1. Mg 接触によるトランスポーターの mRNA 発現量の変化

HepG2 細胞および 2008 細胞を用いて、Mg 接触後の MRP2、OCT1、および MATE1 の mRNA 発現量について検討を行った (Figure 1, 2)。2 mM Mg を 8 時間接触した HepG2 細胞では、CDDP の排出に關与する MRP2 および MATE1 の mRNA 発現量は、それぞれ 1.7 倍および 5.0 倍と有意に増加した。さらに、CDDP の取り込みに寄与する OCT1 の発現量は、0.6 倍と有意な減少を示した。2 mM Mg を 8 時間接触した 2008 細胞では、いずれのトランスポーターの発現量にも変化は認められず、Mg 接触は細胞株によって異なる変化をもたらす可能性が示唆された。

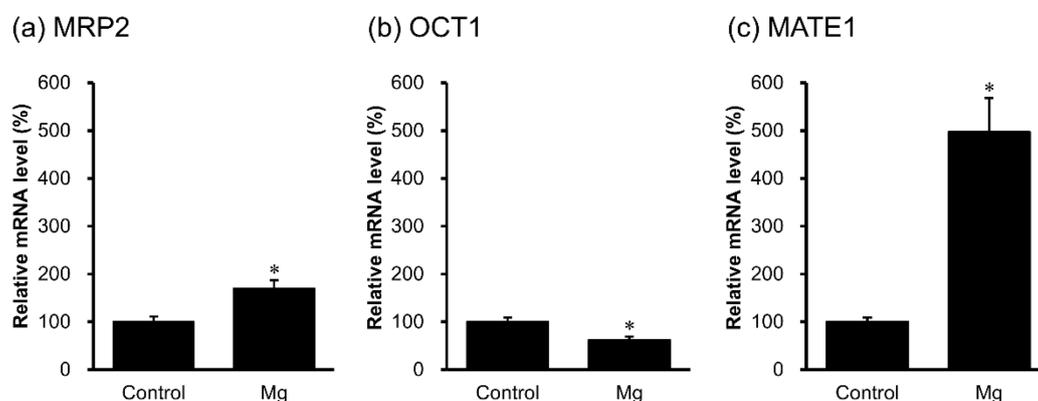


Figure 1. Relative mRNA expression levels of transporters in HepG2 cells exposed to 2 mM of Mg for 8 h. mRNA levels of MRP2 (a), OCT1 (b), and MATE1 (c) were normalized to that of GAPDH. The relative mRNA level of each transporter is expressed as a fold increase with respect to the control group. The control group is in culture but not in contact with the drugs. Data are presented as mean \pm SD of three independent experiments. * $p < 0.05$ vs. control.

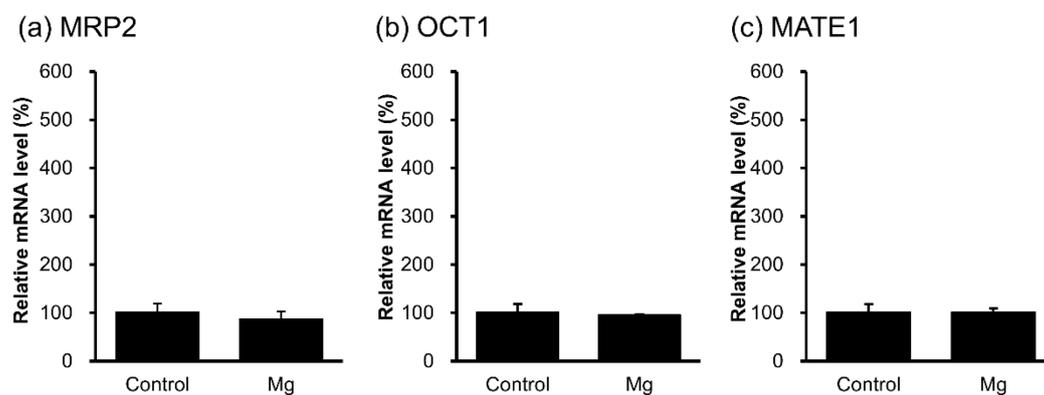


Figure 2. Relative mRNA expression levels of transporters in 2008 cells exposed to 2 mM of Mg for 8 h. mRNA levels of MRP2 (a), OCT1 (b), and MATE1 (c) were normalized to that of GAPDH. The relative mRNA level of each transporter is expressed as a fold increase with respect to the control group. The control group is in culture but not in contact with the drugs. Data are presented as mean \pm SD of three independent experiments.

1-3-2. Mg 接触によるトランスポーターのタンパク質発現量の変化

HepG2 細胞および 2008 細胞を用いて、Mg 接触 24 時間後の細胞膜分画における MRP2、OCT1、および MATE1 のタンパク質発現量について検討を行った (Figure 3, 4)。HepG2 細胞では、Mg によるトランスポーターの発現量への影響は認められず、トランスポーターの発現量に対する Mg 接触の影響は mRNA とタンパク質間で異なる結果となった。2008 細胞では、MATE1 のタンパク質は Mg を接触しても検出されず、MRP2 および OCT1 の発現量は 1.3 倍と有意な増加を認めた。CDDP の輸送に対し、取り込み機構と排出機構に参与する 2 つのトランスポーターは、わずかではあるが同等の発現量変化を示した。

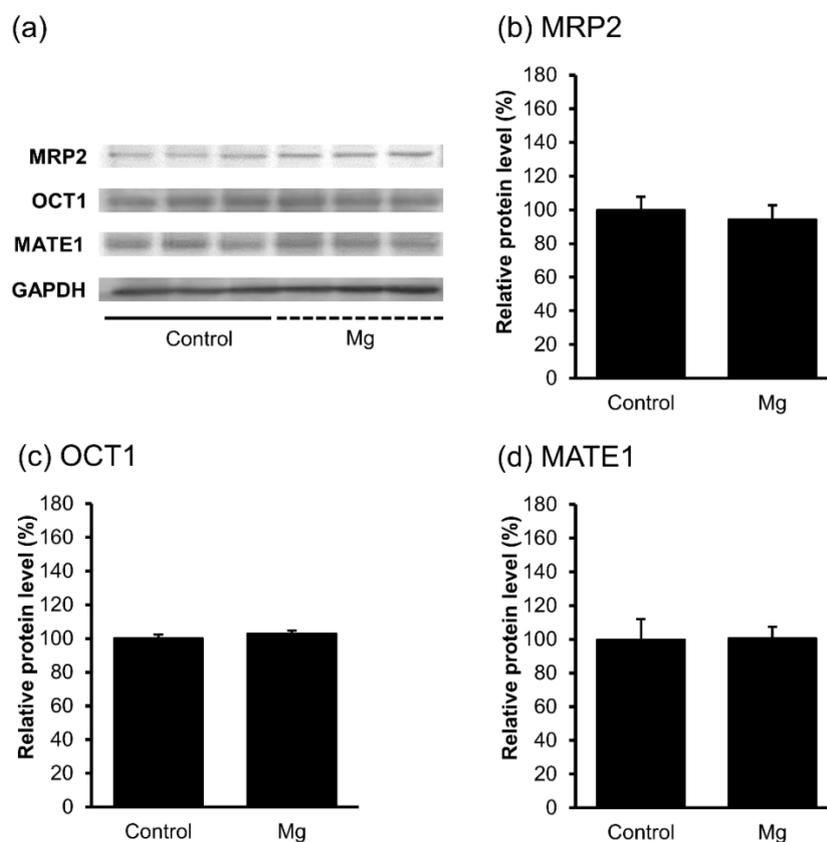


Figure 3. Relative membrane protein expression levels of transporters in HepG2 cells exposed to 2 mM of Mg for 24 h. (a) Immunoblotting for MRP2, OCT1, and MATE1 in HepG2 cells. Protein levels of MRP2 (b), OCT1 (c), and MATE1 (d) were normalized to that of GAPDH. Relative protein level of each transporter is expressed as a fold increase with respect to the control group. The control group is only in culture but not in contact with the drugs. Data are presented as mean \pm SD of three independent experiments.

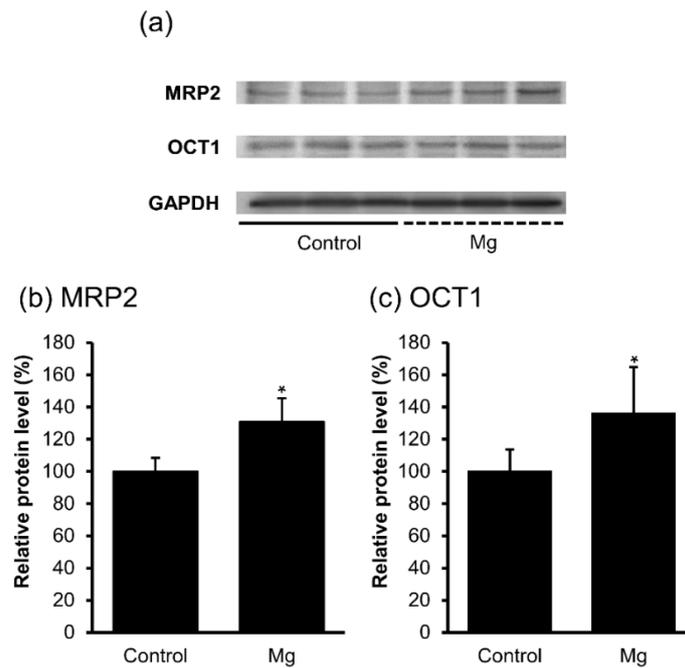


Figure 4. Relative membrane protein expression levels of transporters in 2008 cells exposed to 2 mM of Mg for 24 h. (a) Immunoblotting for MRP2 and OCT1 in 2008 cells. Protein levels of MRP2 (b) and OCT1 (c) were normalized to that of GAPDH. The relative protein level of each transporter is expressed as a fold increase with respect to the control group. The control group is in culture but not in contact with the drugs. Data are presented as mean \pm SD of three independent experiments. * $p < 0.05$ vs. control.

1-3-3. 細胞内白金量および細胞内 Mg 量に対する Mg 併用の影響

8 時間または 24 時間 CDDP と Mg を併用接触したときの HepG2 細胞の細胞内白金量および細胞内 Mg 量を比較した (Figure 5)。CDDP 接触後の細胞内白金量は CDDP の接触時間とともに増加を認めたが、Mg の併用接触による影響は認められなかった。一方、細胞内 Mg 量は、CDDP 単独接触のコントロール群において、接触時間の 8 から 24 時間の延長により、25%の減少を認めた。また、24 時間接触においてコントロール群に比べ、Mg 併用群では、わずかであるが有意な増加を認めた。しかし、2008 細胞に CDDP および Mg を 8 時間併用接触した場合、細胞内白金量の差は見られず、細胞内 Mg 量は CDDP 単独接触したコントロール群と比較して約 30%程度の増加が認められた (Figure 6)。2008 細胞では、HepG2 細胞よりも細胞内白金量は低値を示した。

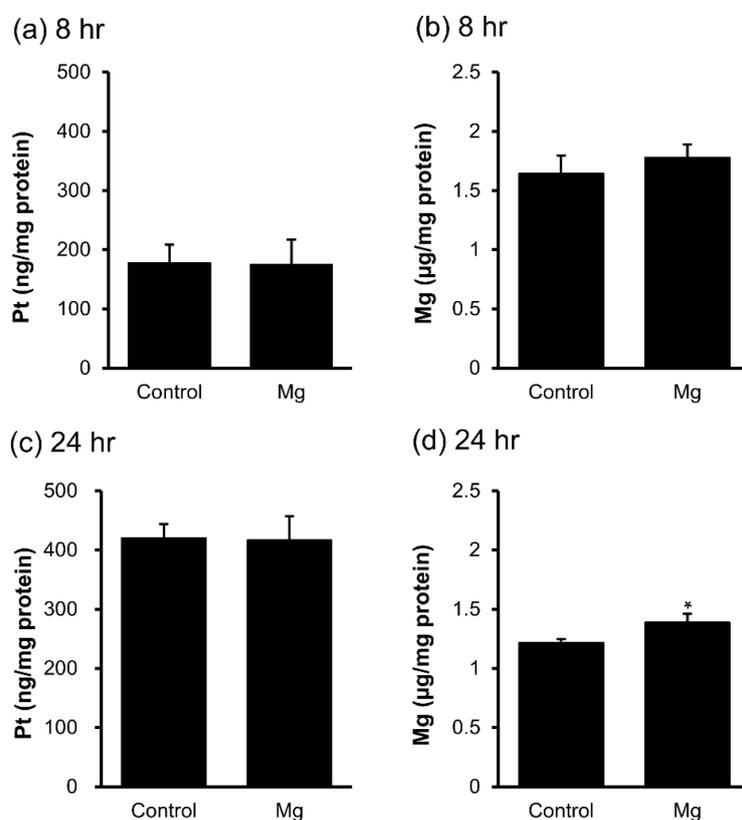


Figure 5. Intracellular platinum and Mg accumulation in HepG2 cells exposed to 25 μ M of CDDP and 2 mM of Mg for 8 or 24 h. (a) Platinum levels after exposure to CDDP with or without Mg for 8 h, (b) Mg levels after exposure to CDDP with or without Mg for 8 h, (c) Platinum levels after exposure to CDDP with or without Mg for 24 h, and (d) Mg levels after exposure to CDDP with or without Mg for 24 h. The control group was exposed to CDDP only. Data are presented as mean \pm SD of three independent experiments. * p <0.05 vs. control.

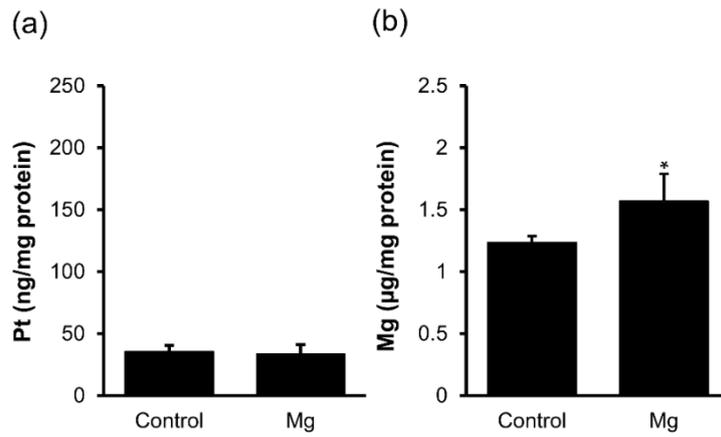


Figure 6. Intracellular platinum and Mg accumulation in 2008 cells exposed to 25 μ M of CDDP and 2 mM of Mg for 8 h. (a) Platinum levels after exposure to CDDP with or without Mg for 8 h and (b) Mg levels after exposure to CDDP with or without Mg for 8 h. The control group was exposed to CDDP only. Data are presented as mean \pm SD of three independent experiments. * p <0.05 vs. control.

1-3-4. CDDP の細胞増殖抑制効果に対する Mg 併用の影響

HepG2 細胞および 2008 細胞において、2 mM Mg の併用接触による CDDP の細胞増殖抑制効果への影響について検討した (Figure 7)。Mg の単独接触は、細胞の増殖に影響しなかった。HepG2 細胞における CDDP 単独および Mg 併用接触時の CDDP の IC₅₀ 値はそれぞれ、 $0.79 \pm 0.04 \mu\text{M}$ および $0.95 \pm 0.18 \mu\text{M}$ 、2008 細胞では $1.21 \pm 0.15 \mu\text{M}$ および $1.42 \pm 0.11 \mu\text{M}$ であった。これらの結果から、CDDP の細胞増殖抑制効果に対して、Mg 併用は影響しないことが示された。

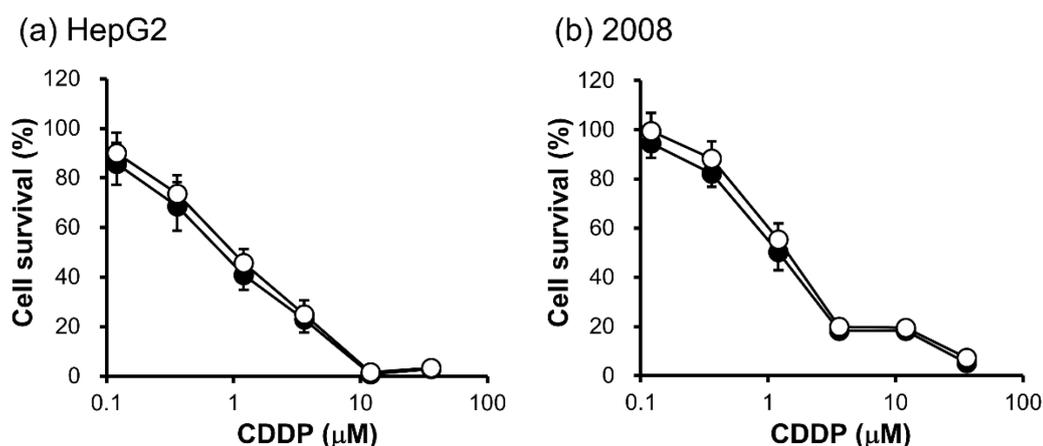


Figure 7. Effect of Mg on the cytotoxicity of CDDP in HepG2 cells (a) and 2008 cells (b). The graphs represent proliferation rates in HepG2 cells and 2008 cells treated with CDDP and CDDP combined with Mg. Cells were exposed to 2 mM of Mg and/or CDDP for 96 h. Cytotoxicity was assessed by the SRB assay. Opened circles: CDDP, closed circles: CDDP combined with Mg. Data are presented as mean \pm SD of three independent experiments.

1-4. 考察

腎障害は、CDDP の用量制限毒性である。CDDP による腎障害は、大量の輸液により軽減されるが、完全に回避することは困難である。In vitro の研究により、ヒト OCT2 は CDDP を基質とし、CDDP の近位尿細管細胞内への蓄積に関与することが報告されている²⁷⁾。Nakamura らによると、Mate1 欠損マウスを用いた研究により、Mate1 は CDDP を管腔側に輸送し、Mate1 の発現低下が CDDP の尿細管障害に関与していることが明らかとなっている⁴⁾。CDDP によって引き起こされる低 Mg 血症では、OCT2 の発現量増大や MATE の活性減弱がおき、尿細管細胞における CDDP の蓄積を増加させることが報告されている²⁵⁾。Mg の併用は、腎トランスポーターである Oct2 および Mate1 の発現を調節することにより CDDP 蓄積を減少させ、それにより CDDP 誘発腎障害を弱めることが報告された⁵⁾。しかし、Mg の補充投与が、がん細胞における CDDP の動態と抗腫瘍効果に及ぼす影響は不明のままであった。CDDP の細胞外排出は MRP2 および MATE1 が関与していることが実証されている。CDDP の取り込みに関与するトランスポーターはさまざまな報告がされているが、腎臓での CDDP 輸送に寄与する OCT ファミリーが、HepG2 細胞などのがん細胞における CDDP 輸送に寄与することが報告されている。

本章では、CDDP 輸送に関与するトランスポーターの発現量に対する Mg 接触の影響を検討した。HepG2 細胞に Mg を接触後、取り込みに関与するトランスポーターである OCT1 の mRNA 発現量は減少し、排出トランスポーターである MRP2 および MATE1 の mRNA 発現量は増加を認め、特に MATE1 の mRNA 発現量の変化は顕著であった。一方、Mg の接触は、HepG2 細胞のトランスポーターのタンパク質発現量に影響を与えず、CDDP 接触後の細胞内白金量にも影響を与えなかった。Mg は転写を行う RNA ポリメラーゼの必須の補因子であるため²⁸⁾、Mg 負荷は、mRNA の転写活性を増大させた可能性が考えられる。しかしながら、HepG2 細胞の MATE1 の mRNA 発現量に特に大きな影響を及ぼした理由については不明である。MATE1 は CDDP の尿中排泄をもたらす一つの因子であり、Mg 補充は、特に尿細管細胞での MATE1 の機能改善をもたらす可能性が考えられる。尿細管細胞とがん細胞では、MATE1 タンパク質の翻訳制御に大きな違いがある可能性も考えられた。2008 細胞において、Mg 接触は、これらのトランスポーターの mRNA 発現量に影響を与えず、CDDP 接触後の細胞内白金量は、HepG2 細胞よりもはるかに低いものであった。この結果は、HepG2 細胞とは異なり、2008 細胞では CDDP 輸送に対するトランスポーターの寄与が低いことを示唆している。Mg は生体内の構成要素であるため、細胞外 Mg 量の数倍程度の変化は、細胞内 Mg 量に大きな変化を示さない可能性がある。しかし、同じトランスポーターによって輸送される物質が共存する場合、いずれかの物質の輸送が競合的または非競合的に抑制されることはよく知られている。銅トランスポーターである solute carrier family 31 member 1 (SLC31A1) による CDDP の取り込みは、共存する銅濃度が 50 μM 程度の低い場合には影

響を受けず、銅濃度が 500 μM 以上の場合は影響すると報告されている^{29,30})。本研究において、生体内構成要素である Mg の併用接触は CDDP の輸送と細胞内 Mg 量に影響を与えなかった。逆に、CDDP の長時間接触は、HepG2 細胞の細胞内 Mg 量を低下させた。solute carrier family 41 (SLC41) は最近 Mg のトランスポーターとして注目されており^{31,32})、CDDP は SLC41 発現／機能に影響を与える可能性も考えられる。Mg の併用接触は、HepG2 細胞および 2008 細胞における CDDP の細胞毒性には影響しなかった。本研究において使用された Mg 濃度は、臨床的な Mg の負荷により想定される最高の血漿濃度と同じであるため、臨床レジメンにおける Mg の投与は、CDDP の腎障害を回避するものの CDDP の抗腫瘍効果に影響することはほとんどないことが示された。

第二章

CDDP の抗腫瘍活性に対する Pregnane X receptor の影響

2-1. 緒言

CDDP 耐性獲得の主なメカニズムには、細胞内白金量の減少、CDDP 不活化能の亢進および DNA 修復能の亢進といった経路が知られている。この中でも多くの CDDP 耐性細胞では、細胞内白金量の低下が認められる。ヒト肝腺がん SK-HEP-1 およびヒト黒色腫 MeWo 細胞株において、薬物排出トランスポーターである MRP2 の発現量の増大が CDDP 耐性化の原因であることが報告されており^{33, 34)}、ヒト神経膠腫 NHG2 細胞株に MRP3 を過剰発現させると、CDDP に対する感受性を低下させることが報告されている。これらのトランスポーターは、CDDP の細胞外への排出に関与することが知られている³⁵⁾。一方、CDDP 耐性細胞において、銅のトランスポーターである SLC31A1^{36, 37)}、OCT1-3^{38, 39)} および Na⁺, K⁺-ATPase^{40, 41)} の発現または活性レベルの低下によって細胞内白金量の減少が起こることが報告されており、これらのトランスポーターは CDDP の取り込みに関与していることが示唆される。しかし、シスプラチン取り込みに関与するトランスポーターは細胞の種類によってさまざま報告されており、主となる特定のトランスポーターは明らかにされていない。CDDP 耐性腫瘍は、トランスポーターの発現量の変化がさまざまに生じた細胞の集団で構成されており、CDDP の耐性化を克服するには、トランスポーターの発現を調節している核内受容体を標的とする手法の有効性が期待される¹⁵⁾。

核内受容体は、リガンド依存性転写調節因子として、標的遺伝子の発現を制御し、生体において分化、代謝、ホメオスタシスなどの重要な生命現象を厳密に調節していることが知られている。Pregnane X receptor (PXR) および constitutive androstane receptor (CAR) は、生体内に入った異物の代謝および排泄に関与するタンパク質の発現をコントロールしており、主に標的タンパク質としては、cytochromes P450 (CYPs) や MDR1、MRP2 などの排出トランスポーターが知られている。Peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) の活性化は、主に脂質や糖質のホメオスタシスの維持に重要な役割を担っている。これらの核内受容体はがん細胞においても細胞機能維持のために重要な役割を果たしている。近年、核内受容体による細胞機能の調節が、抗がん剤の抗腫瘍効果の発現に影響を与える可能性が報告されている。ヒト乳がん細胞における PXR 発現の増大は、タキサン、ドキソルビシン、タモキシフェン、ビンブラスチンなどの抗がん剤に対する感受性に影響を与えることが報告されている⁴²⁾。白血病細胞では、CAR 発現の増大により CYP2B6、CYP3A4 の発現が誘導され、シクロホスファミドの抗腫瘍効果の増強をもたらした⁴³⁾。PPAR は腫瘍抑制因子または促進因子として機能することができ、結腸直腸がんの進行に関与が報告され、がんの予防および治療の潜在的なターゲットであることが示唆されている⁴⁴⁾。

CDDP の抗腫瘍活性に対しても、核内受容体の発現制御する様々な因子が影響を与える可能性がある。PXR および CAR は、細胞外へ CDDP を排出するトランスポーターの発現を制御している^{42, 45)}。PPAR に作用する薬剤は、CDDP 誘発腎障害⁴⁶⁾および聴覚障害⁴⁷⁾を抑制し、その抗腫瘍活性⁴⁸⁾を高めることが報告されている。したがって、核内受容体のリガンドと CDDP との併用は、CDDP の抗腫瘍活性および副作用の発現を修飾しうることが期待される。本章では、核内受容体 PXR, CAR, PPAR α および PPAR γ の発現量に対する CDDP の影響と、核内受容体リガンドが CDDP の抗腫瘍活性に及ぼす影響について検討した。

2-2. 実験材料および方法

2-2-1. 細胞培養

HepG2 細胞は、大日本製薬から購入した。細胞は、5% CO₂、37°Cで 10% FBS 含有 MEM 培地で *in vitro* 継代維持した細胞を用いた。CDDP 耐性 HepG2 細胞は、以前の研究において、3 段階（1, 3 および 5 μM）の CDDP 接触により単離された¹⁵⁾。確立された細胞株は、HepG2/R と名付けた。

2-2-2. SRB assay

細胞毒性試験は、SRB（ナカライテスク）を使用して実施した。HepG2 細胞を 96 well plate に 4.0×10^3 個/well となるように播種し、24 時間後、リファンピシン（RFP、ナカライテスク）および/または 48 時間後に数段階の濃度の CDDP に接触させた。72 時間後、細胞を 10% トリクロル酢酸で固定後、水で洗浄し、乾燥させた。その後、0.4% SRB 溶液を添加し、室温で 30 分間インキュベートした。プレートを再洗浄し、結合した染色液を trisma base solution（ナカライテスク）で可溶化し、マイクロプレートリーダー（Model 550、BIO-RAD）で 570 nm で吸光度を測定した。データは Microsoft Excel を用いて評価し、相対生存細胞の割合は、コントロール群に対して各薬物接触群で計算した。すべてのデータは、5 つの well の平均値を用いた。

2-2-3. Caspase-3 活性 assay

Caspase-3 酵素活性は、Caspase-3 Fluorometric Assay Kit（BioVison）を使用して、基質 N-Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amido-4-trifluoromethylcoumarin (Ac-DEVD-AFC) の分解により生成する蛍光を測定した。HepG2 細胞および HepG2/R 細胞を 6 well plate に 2.0×10^5 個/well となるように播種し、24 時間後、100 μM RFP または 100 μM レフルノミド（LEF、ナカライテスク）に接触させた。

さらに 24 時間後、4 または 25 μM の CDDP を 72 時接触させた後、細胞を回収し、冷 PBS で洗浄した。Cell lysis buffer 100 μL を使用してペレットを溶解し、細胞溶解液の一部を使用し、BCA Protein Assay Kit（Pierce）にてタンパク質含量の測定を行った。細胞溶解液を、タンパク質濃度が 0.25 μg/μL となるように調製した。96 well plate にて、サンプル 50 μL、10 mM DTT を含む 2×reaction buffer 50 μL、2 mM Ac-DEVD-AFC 溶液 5 μL を加え、37°Cで 1 時間、室温でさらに 1 時間インキュベートした。蛍光リーダー（Versa Fluor 蛍光計、Bio-Rad Laboratories）で蛍光を測定した。それらは、コントロール群に対する相対的な値として表した。

2-2-4. 細胞内白金量

HepG2 細胞を、75 cm² 細胞培養フラスコに、1.0×10⁶ 個の細胞を播種し、24 時間後 100 μM RFP および/または 48 時間後に 25 μM CDDP を接触させた。24 時間後、細胞を回収し、冷 PBS で 3 回洗浄した。各群の細胞の一部 (5%) を用い、BCA Protein Assay Kit (Pierce) にてタンパク質含量の測定を行った。残りの細胞ペレットを、過塩素酸と 30% 過酸化水素の 1 : 2 の比率の酸混合物 1.5 mL に懸濁し、65°C で一晩静置し細胞を溶解させた。サンプル中の白金量は、SPS 3100 Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometer (ICP-OES、日立ハイテクサイエンス) にて測定した。結果は、タンパク質 1 mg あたりの白金量 (ng) として表した。

2-2-5. RNA 抽出および real-time PCR

HepG2 細胞を、75 cm² の細胞培養フラスコに、1.0×10⁶ 個の細胞を播種し、24 時間後、4 μM または 25 μM CDDP を加えた。所定時間接触後、細胞を回収し、冷 PBS で 3 回洗浄した。Sepasol-RNA I Super (ナカライテスク) を用いて total RNA を抽出し、NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific) を用いて RNA 濃度を測定した。PrimeScript II First Strand cDNA 合成キット (Takara Bio) を使用した逆転写により、total RNA から cDNA を合成した。Real-time PCR は、調製した cDNA、Table 2 の各種 primer および KAPA SYBR Fast qPCR キット (NIPPON Genetics) を用いて Rotor-Gene Q (Qiagen) を使用し、SYBER-GREEN 法にて行った。相対的 mRNA 発現量は、housekeeping gene として、GAPDH を用いた、 $\Delta\Delta$ CT 法によって解析した。

Table 2 使用した primer の塩基配列

Gene	Sense primer	Antisense primer
PXR	5'-TGA GGA GGA GTA TGT GCT CAT G-3'	5'-GCA GTG TCC ATC TGT CTT GG3'
CAR	5'-TGA GCT GAG GAA CTG TGT GG-3'	5'-TGA TGT CTG CGA AGT GTG TG-3'
PPAR α	5'-ATT CGC CAT GCT GTC TTC TG-3'	5'-CAT CCG ACT CCG TCT TCT TG-3'
PPAR γ	5'-GCA GGA GAT CAC AGA GTA TGC-3'	5'-GGC TTG TAG CAG GTT GTC TTG-3'
GAPDH	5'-CCA TCA CCA TCT TCC AGG AG-3'	5'-CCT GCT TCA CCA CCT TCT TG-3'

2-2-6. 統計学的処理

結果は平均±標準偏差 (SD) として表した。統計分析は、コントロール群との多重比較のために、Dunnett's test を使用した。p < 0.05 は有意とみなした。

2-3. 結果

2-3-1. CDDP 接触による caspase-3 活性化への影響

HepG2 細胞において、4 または 25 μM の CDDP を接触したときの caspase-3 活性を検討した (Figure 7)。4 および 25 μM の CDDP 濃度は、それぞれ IC_{50} および IC_{90} 値であり、4 μM CDDP は、48 時間接触でも caspase-3 活性に影響を与えなかった。25 μM CDDP は、コントロールと比較し、24 時間および 48 時間接触で caspase-3 活性は、8.6 倍および 10 倍に増大を認めた。HepG2 細胞において、4 μM CDDP は細胞の増殖抑制をもたらすが、アポトーシスを引き起こさないことがわかった。また、アポトーシス誘導は、25 μM CDDP で 24 時間以上の接触が必要であることが示された。

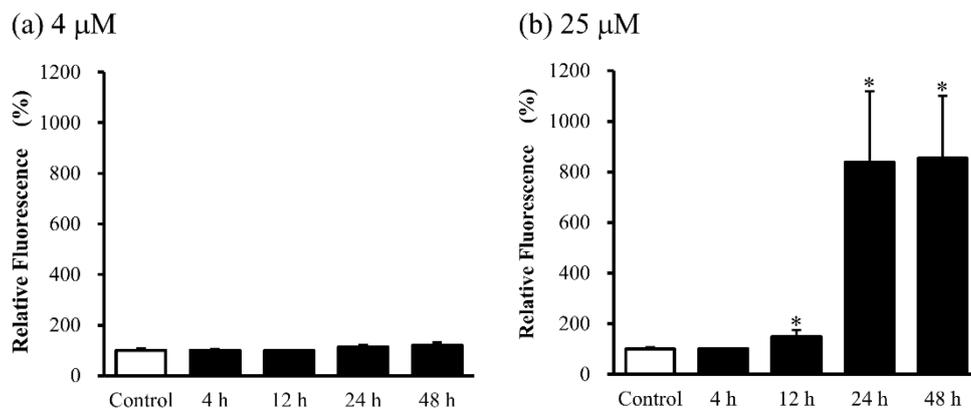


Figure 7. Caspase-3 activation induced by CDDP in HepG2 cells. The graphs represent caspase-3 activity values in HepG2 cells exposed to 4 (a) or 25 μM (b) of CDDP for 4 to 48 h. Caspase-3 activity was assessed by using Caspase-3 Fluorometric Assay Kit. The relative fluorescence is expressed as the fold increase with respect to the control group. Data are presented as means \pm SD for 3 individual experiments. * $p < 0.05$ vs. control.

2-3-2. CDDP 接触による核内受容体の発現量への影響

HepG2 細胞に CDDP を接触させた時の、核内受容体 PXR, CAR, PPAR α および PPAR γ の mRNA 発現量について検討を行った。4 μ M CDDP を接触させた時、PXR の mRNA 発現量はわずかに増加したが、CAR, PPAR α および PPAR γ の mRNA 発現量はいずれも減少傾向を示し、12 時間接触で最も低値を示した (Figure 8)。25 μ M CDDP を接触させた時、PXR の mRNA 発現量は一時的に減少を認め、12 時間接触で最低値に達した。PPAR α の mRNA 発現量は CDDP 接触により大幅に減少し、12 時間接触で最低値に達し、以降の接触時間でも発現量は低いままであった (Figure 9)。一方、CAR と PPAR γ の mRNA 発現量は二相性の変化を示した。したがって、PXR および PPAR α の mRNA 発現量は CDDP の接触濃度に依存した変化を示したが、CAR および PPAR γ の mRNA 発現量と CDDP の接触濃度との相関はみられなかった。

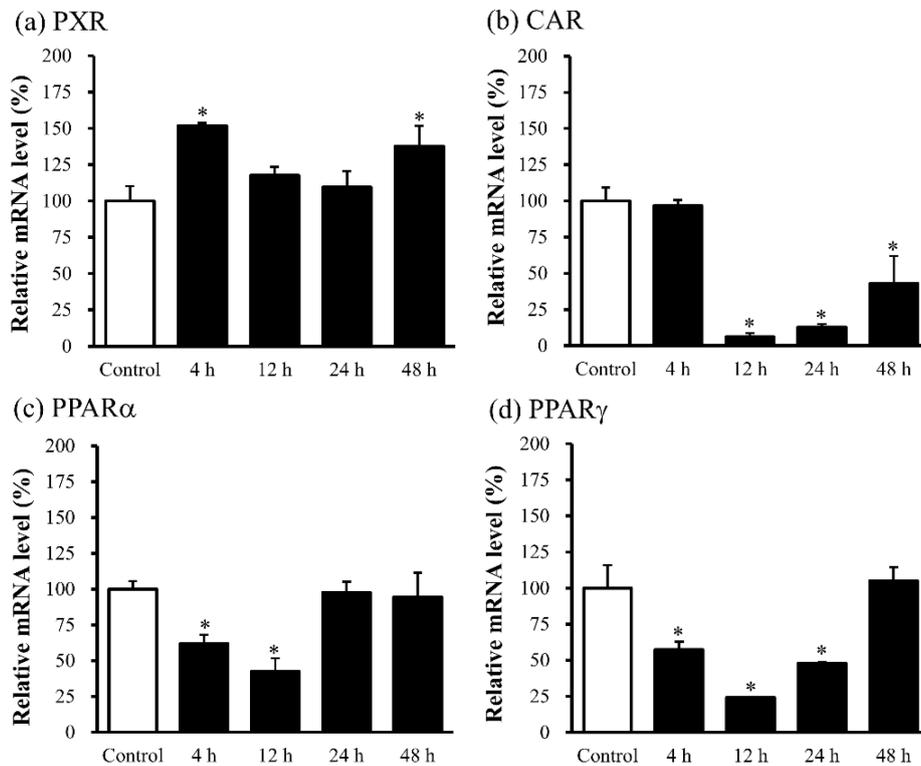


Figure 8. Relative mRNA levels of nuclear receptors in HepG2 cells exposed to 4 μ M of CDDP for 4 to 48 h. mRNA levels of PXR (a), CAR (b), PPAR α (c), and PPAR γ (d) were normalized to GAPDH mRNA expression level. The relative mRNA levels of each nuclear receptor are expressed as the fold increase with respect to the control group. Data are presented as means \pm SD for 3 individual experiments. *p<0.05 vs. control.

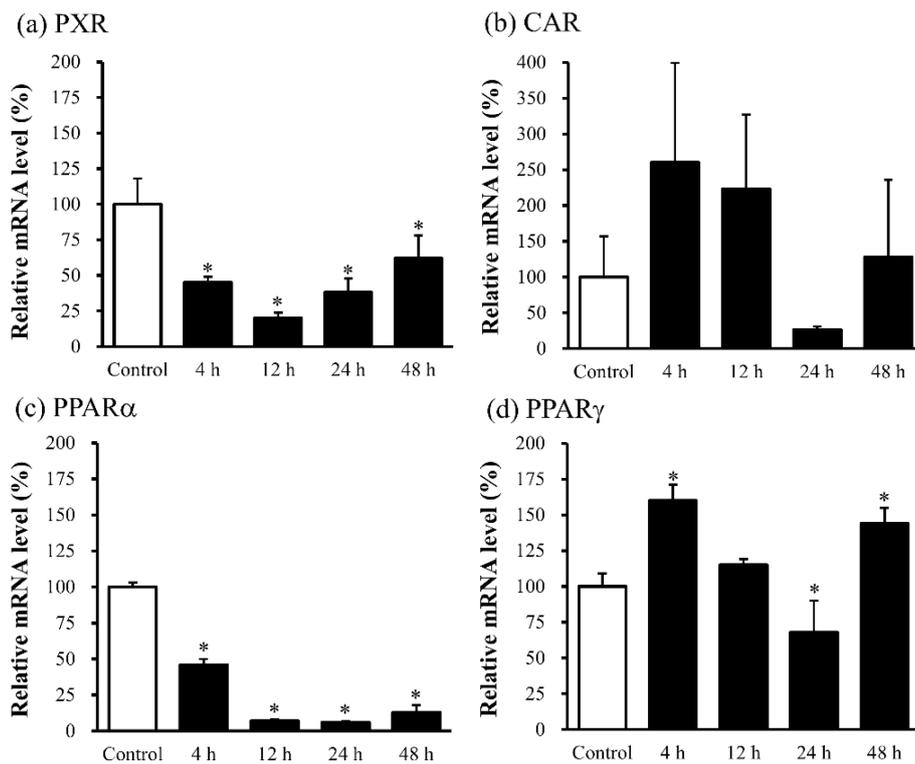


Figure 9. Relative mRNA levels of nuclear receptors in HepG2 cells exposed to 25 μ M of CDDP for 4 to 48 h. mRNA levels of PXR (a), CAR (b), PPAR α (c), and PPAR γ (d) were normalized to GAPDH mRNA expression level. The relative mRNA levels of each nuclear receptor are expressed as the fold increase with respect to the control group. Data are presented as means \pm SD for 3 individual experiments. *p<0.05 vs. control.

2-3-3. PXR アゴニスト RFP による CDDP 抗腫瘍活性への影響

HepG2 細胞において、PXR アゴニストである RFP が CDDP の抗腫瘍活性に与える影響について評価した。100 μM RFP は、HepG2 細胞の増殖挙動および caspase-3 活性に影響を与えなかった。CDDP 単独時の IC_{50} 値は $2.3 \pm 0.5 \mu\text{M}$ であったが、100 μM RFP との併用接触時、CDDP の IC_{50} 値は $8.5 \pm 1.5 \mu\text{M}$ と有意に増加した (Figure 10)。したがって、RFP は CDDP の細胞増殖抑制効果を有意に阻害することが明らかとなった。25 μM CDDP の単独接触は、コントロールと比較して caspase-3 活性を 12 倍に増加させたが、100 μM RFP と 25 μM CDDP との併用では、caspase-3 活性はコントロールと比較し約 2 倍程度の増大であり、RFP を併用することにより caspase-3 活性が有意に抑制された (Figure 11)。さらに、CDDP の細胞内蓄積に対する RFP の影響について検討した。25 μM CDDP を 24 時間接触後の細胞内白金量は、 $266.4 \pm 92.3 \text{ ng/mg protein}$ であったが、25 μM CDDP と 100 μM RFP の併用接触時、この値は $142.7 \pm 53.8 \text{ ng/mg protein}$ へと明らかに減少し、RFP は、CDDP の細胞内蓄積を抑制した。

以上より、RFP は、CDDP の細胞内蓄積を抑制することで、caspase-3 活性化の抑制および細胞増殖抑制効果の阻害をもたらすことが示唆された。

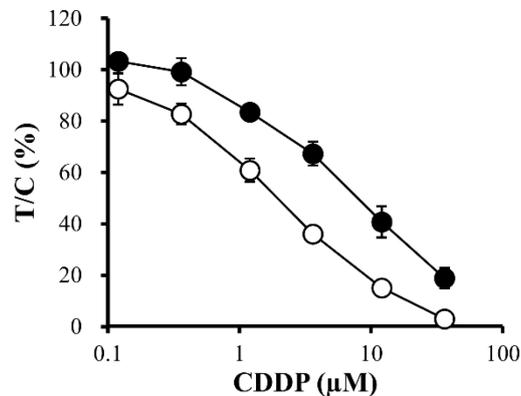


Figure 10. Effect of RFP on the cytotoxicity of CDDP in HepG2 cells. The graphs represent proliferation rates in HepG2 cells treated with CDDP and CDDP combined with RFP. Cells were exposed to 100 μM of RFP for 48 h and/or CDDP for 24 h. Cytotoxicity was assessed by the SRB assay. Opened circles: CDDP; closed circles: CDDP combined with RFP. Data are presented as means \pm SD for 3 individual experiments.

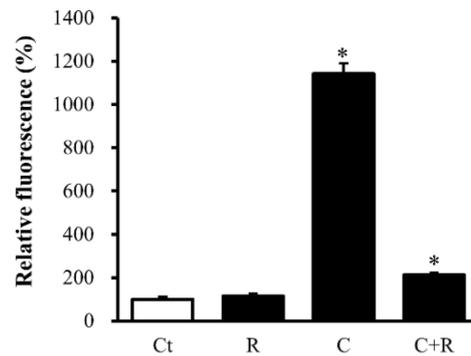


Figure 11. Effect of RFP on caspase-3 activation induced by CDDP in HepG2 cells. Cells were exposed to 100 μ M of RFP for 48 h and/or 25 μ M of CDDP for 24 h. Caspase-3 activity was assessed by Caspase-3 Fluorometric Assay Kit. The graph represents caspase-3 activity in HepG2 cells exposed to CDDP, RFP or both. The relative fluorescence in each group is expressed as the fold increase with respect to the control group. Ct: Control, R: RFP, C: CDDP, C+R: CDDP and RFP. Data are presented as means \pm SD for 3 individual experiments. * p <0.05 vs. control.

2-3-4. PXR アンタゴニスト LEF による CDDP 耐性への影響

以前の検討において、HepG2/R 細胞は、CDDP に対して 2.6 倍耐性があり、細胞内白金量は親株である HepG2 細胞と比較し、30%の減少を示した。また、HepG2/R 細胞の PXR 発現量は HepG2 細胞と比較し、約 1.5 倍の増加を示した。本検討では、抗リウマチ薬である LEF を PXR アンタゴニストとして用いた。HepG2 細胞および HepG2/R 細胞において、CDDP 単独、LEF 単独および CDDP と LEF を併用接触した時の、caspase-3 活性について検討を行った (Figure 12)。LEF 単独では、いずれの細胞でも caspase-3 活性に影響を及ぼさなかった。HepG2 細胞では、25 μ M の CDDP は、コントロールと比較して caspase-3 活性を 8 倍増加させた。一方、CDDP と LEF 併用は、コントロールと比較して 12 倍とより高い caspase-3 活性をもたらした。また、HepG2/R 細胞では、25 μ M の CDDP は、caspase-3 活性を 2 倍に増加させたが、CDDP と LEF 併用はコントロールと比較して 6 倍に増加させた。したがって、PXR アンタゴニストである LEF の併用は、PXR が高発現している HepG2/R 細胞の CDDP 感受性を回復させることを明らかとした。

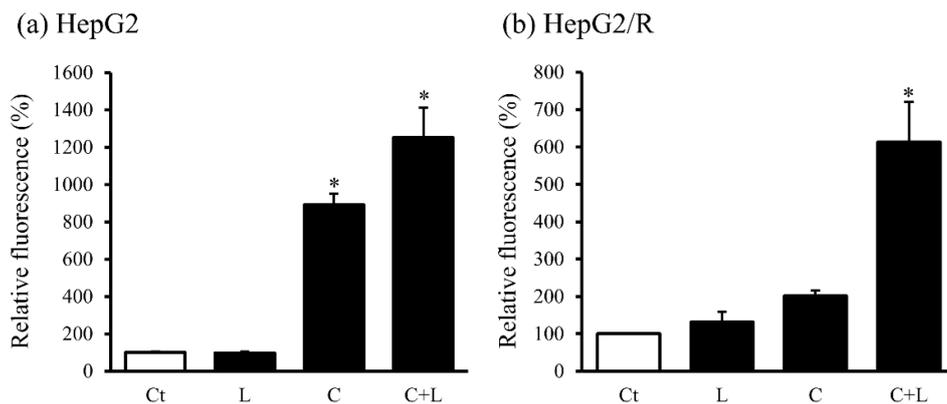


Figure 12. Effect of LEF on caspase-3 activation induced by CDDP in HepG2 cells (a) and HepG2/R cells (b). Cells were exposed to 100 μ M of LEF for 48 h and/or 25 μ M of CDDP for 24 h. Caspase-3 activity was assessed by Caspase-3 Fluorometric Assay Kit. The relative fluorescence in each group in both HepG2 cells and HepG2/R cells is expressed as the fold increase with respect to the control group. Ct: Control, L: LEF, C: CDDP, C+L: CDDP and LEF. Data are presented as the means \pm SD for 3 individual experiments. * p <0.05 vs. control.

2-4. 考察

CDDP は、多くの固形がんの治療に使用される抗がん剤であるが、薬剤に対する耐性の獲得は、臨床において大きな問題となっている。多くの CDDP 耐性細胞で認められる細胞内白金量の低さは、細胞内取り込みの減少、細胞外への排出の増強、または両方の経路の変化に関連している^{13,14)}。様々なトランスポーターがこれらの経路で重要な役割を果たしており、これらのトランスポーターの発現量の変化が CDDP に対する耐性をもたらす可能性がある。核内受容体は、トランスポーターの発現調節に関与することが知られているが^{49,50)}、CDDP の抗腫瘍活性に及ぼすそれらの影響は不明のままである。

本章では、トランスポーターと代謝酵素の発現を制御する核内受容体を発現している HepG2 細胞を使用した。IC₅₀ 程度の CDDP は細胞増殖を阻害し、IC₉₀ 程度の CDDP は細胞増殖抑制と caspase-3 の活性化の両方を生じさせた。核内受容体 CAR および PPAR γ の発現量は CDDP の接触濃度に依存した変化を示さなかったが、PPAR α の発現量は CDDP 濃度の増加とともに顕著に減少した。一方、PXR の発現量は、細胞増殖を抑制する濃度の CDDP によりわずかではあるが有意に増加し、caspase-3 を活性化する CDDP 濃度により著しく低下を認めた。これらの変化より、CDDP 接触を受けた細胞において、PXR は細胞を CDDP の毒性から保護する機能を有し、一方で PXR 発現の低下が細胞にアポトーシスを引き起こす可能性が示唆された。実際、PXR は、薬物代謝酵素と薬物トランスポーターの発現を調節することにより、抗がん剤の抗腫瘍効果に影響を与えることが報告されている⁵¹⁾。Harmsen によると、結腸腺がん由来 LS180 細胞において、PXR を介した MDR1 の誘導は、MDR1 の基質となる抗がん剤の細胞内蓄積を減少させることを報告した⁵²⁾。さらに、PXR アゴニストである RFP で前処理した細胞では、ドキソルビシンの抗腫瘍効果が減弱することが示されている。HepG2 細胞において、RFP は CDDP により誘導される細胞増殖抑制効果と caspase-3 の活性化を阻害し、細胞内白金量を減少させた。PXR の活性化は、薬物排出トランスポーターである MRP2 の発現を増加させることが知られている。したがって、RFP の前処理による MRP2 発現の増加が、細胞内白金量を減少させ、それにより CDDP の抗腫瘍効果を減弱させることが示唆された。

CDDP 耐性化のメカニズムの 1 つに、MRP2 の高発現による CDDP の細胞内蓄積の減少がある。MRP2 の発現は PXR によって制御されていることから、CDDP 耐性細胞は PXR の発現または活性の増加を示す可能性がある。以前の研究で確立した 3 つの CDDP 耐性細胞株はすべて、PXR 発現量が増加していた。PXR は、複数の細胞株において、微小管やトポイソメラーゼに作用する薬物を解毒することで知られている CYP3A4、および MDR1 の発現を誘導することが知られている^{53,54)}。いくつかの報告は、PXR アンタゴニストが特定の腫瘍において薬剤耐性を予防または克服できることを示唆している^{55,56)}。ファーマコフォアとドッキングツールを使用した新規小分子 PXR アンタゴニストの研究により、LEF が有

望な薬物である可能性が報告されている⁵⁷⁾。LEF による前処理により、HepG2 細胞では CDDP による caspase-3 の活性化が約 40%増大し、HepG2/R 細胞では、caspase-3 活性化が約 3 倍増加することが明らかとなった。したがって、PXR アンタゴニストは、CDDP 感受性の亢進とともに CDDP 耐性の克服をもたらすことが明らかとなった。

CDDP 耐性は、さまざまなトランスポーターの複雑な発現変化によって引き起こされる。本章では、これらのトランスポーターと代謝酵素の発現の調節に関与する核内受容体に焦点を当てた。PXR 発現量は、CDDP の接触濃度およびそれに応じた caspase-3 活性に 관련된変化を認めた。PXR アゴニストである RFP は、CDDP 接触した細胞を保護する反応として PXR の活性化を誘導し、CDDP の細胞増殖抑制効果を阻害した。一方、PXR アンタゴニストである LEF の併用により、CDDP 耐性を克服することができた。以上より、核内受容体リガンドは、将来のがん治療戦略において重要な物質となりうることが示唆された。今後、CDDP 耐性を完全に克服するためには、最適な PXR アンタゴニストの選択、併用スケジュール、および in vivo 併用方法に関するさらなる研究が必要である。

第三章

PXR アンタゴニストによる CDDP の抗腫瘍効果増強機構

3-1. 緒言

PXR は、多くの代謝酵素およびトランスポーターの転写調節を通じて、生体異物の解毒メカニズムを調節する⁵⁸⁾。PXR によって調節される標的遺伝子には、CYP3A4⁵⁹⁾、CYP2B6⁶⁰⁾、UDP-グルクロノシルトランスフェラーゼファミリー⁶¹⁾、MRP1-3^{62,63)}、および有機アニオン輸送ポリペプチド 2⁶⁴⁾等が報告されている。PXR は主に肝臓と腸管に発現しているが、腫瘍組織での発現は未だ明確にはなっていない。オールトランスレチノイン酸⁶⁵⁾、エトポシド⁶⁶⁾、パクリタキセル⁶⁷⁾などの抗がん剤の代謝と排泄に関与するさまざまな遺伝子の発現も PXR によって調節されており、抗がん剤の効果発現における PXR の潜在的な役割が近年注目されている。

CDDP は、多くの種類の固形がんの治療に使用され、がん細胞にアポトーシスを誘導する白金化合物である。ただし、がん細胞における CDDP 耐性の獲得は重要な臨床的問題となっている。CDDP 耐性に関与するメカニズムとして、細胞内 CDDP 取り込みの減少、細胞外 CDDP 排出の増加、解毒および核酸修復システムの活性の増加などが特定されている。その中でも多くの CDDP 耐性細胞株は、MRP2 発現量の増加に起因する細胞内白金量の減少を示す⁶⁸⁻⁷¹⁾。前述したように、MRP2 の発現は PXR によって制御されており^{72,73)}、CDDP 耐性細胞では PXR の発現/活性が増大している可能性が考えられる。

PXR アンタゴニストである bitter melon 抽出物は、がん細胞において、PXR の活性を抑制しドキシソルビシンの主な排出トランスポーターである MDR1 の発現を抑制することにより、ドキシソルビシンの細胞毒性を高めることが示された⁷⁴⁾。また、前章では、PXR アンタゴニストである LEF が、CDDP 耐性 HepG2/R 細胞における CDDP の細胞毒性を増強しうることも明らかとなった。したがって、PXR アンタゴニストは、排出トランスポーターの発現を抑制することにより、抗がん剤の効果を高めうる薬剤として可能性をもっている。

ケトコナゾール (KTZ) は、1980 年代からさまざまな真菌感染症の治療に使用されてきたイミダゾール系の抗真菌薬である⁷⁵⁾。さらに、KTZ は前立腺がんの治療に効果的であることが報告されている⁷⁶⁾が、その分子メカニズムは不明である。KTZ は、核内受容体の活性化を阻害することにより、CYP450 などの薬物代謝酵素に対する阻害作用があることも報告されている^{77,78)}。イソチオシアネートは、アブラナ科の野菜 (クレソン、キャベツ、芽キャベツ、カリフラワーなど) の主成分であるグルコシノレートの分解によって形成される。その 1 つであるフェネチルイソチオシアネート (PEITC) は、PXR を介して CYP3A4 の発現を阻害し、ミダゾラムのクリアランスの減少をもたらすことが報告されている⁷⁹⁾。本章では、2 つの PXR アンタゴニストである KTZ と PEITC が、CDDP の細胞毒性をさらに高め

る可能性があるという仮説を立てた。そこで、白金化合物の細胞毒性と細胞内蓄積に対する KTZ と PEITC の効果を比較し、MRP2 発現を抑制する PXR アンタゴニスト作用と白金化合物の効果増強との関連について検討を行った。

3-2. 実験材料および方法

3-2-1. 細胞培養

HepG2 細胞は、大日本製薬から購入した。細胞は、5% CO₂、37°Cで 10% FBS 含有 MEM 培地で *in vitro* 継代維持した細胞を用いた。

3-2-2. Caspase-3 活性 assay

Caspase-3 活性は、Caspase-3 Fluorometric Assay Kit (BioVison) を使用して、基質 N-Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amido-4-trifluoromethylcoumarin (Ac-DEVD-AFC) の分解により生成する蛍光を測定した。HepG2 細胞を 6 well plate に 2.0×10^5 個/well となるように播種し、24 時間後、30 μ M KTZ (ナカライテスク) または PEITC (ナカライテスク) を各 well に添加した。24 時間後、10 μ M CDDP または 180 μ M カルボプラチン (CBDCA) を対応する well に追加した。白金化合物を接触させて 24 時間後、細胞を回収し、冷 PBS で洗浄した。Cell lysis buffer 100 μ L を使用してペレットを溶解し、細胞溶解液の一部を使用し、BCA Protein Assay Kit (Pierce) にてタンパク質含量の測定を行った。細胞溶解液を、タンパク質濃度が 0.25 μ g/ μ L となるように調製した。96 well plate にて、サンプル 50 μ L、10 mM DTT を含む 2 \times reaction buffer 50 μ L、2 mM Ac-DEVD-AFC 溶液 5 μ L を加え、37°Cで 1 時間、室温でさらに 1 時間インキュベートした。蛍光リーダー (Versa Fluor 蛍光計、Bio-Rad Laboratories) で蛍光を測定した。それらは、コントロール群に対する相対的な値として表した。

3-2-3. 細胞内白金量

HepG2 細胞を、75 cm² の細胞培養フラスコに、 1.0×10^6 個の細胞を播種し、24 時間後 30 μ M KTZ または PEITC を各フラスコに添加した。24 時間後、25 μ M CDDP または 360 μ M CBDCA を対応するフラスコに追加した。白金化合物を接触させて 24 時間後、細胞を回収し、冷 PBS で 3 回洗浄した。各群の細胞の一部 (5%) を用い、BCA Protein Assay Kit (Pierce) にてタンパク質含量の測定を行った。残りの細胞ペレットを、過塩素酸と 30%過酸化水素を 1 : 2 の比率で合わせた酸混合物 1.5 mL に懸濁し、65°Cで一晩静置し細胞を溶解させた。サンプル中の白金量は、SPS 3100 Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometer (ICP-OES、日立ハイテクサイエンス) にて測定した。結果は、タンパク質 1 mg あたりの白金量 (ng) として表した。

3-2-4. RNA 抽出および real-time PCR

HepG2 細胞を、75 cm² の細胞培養フラスコに、 1.0×10^6 個の細胞を播種した。24 時間後、30 μ M KTZ または PEITC を加え、さらに 24 時間後、25 μ M の CDDP を加えた。KTZ または PEITC を 48 時間接触後、細胞を回収し、冷 PBS で 3 回洗浄した。FastGene Premium Kit

(NIPPON Genetics) を使用し、total RNA を抽出し、NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific) を用いて RNA 濃度を測定した。 PrimeScript II First Strand cDNA 合成キット (Takara Bio) を使用した逆転写により、total RNA から cDNA を合成した。 Real-time PCR は、調製した cDNA、Table 3 の primer および KAPA SYBR Fast qPCR キット (NIPPON Genetics) を用いて Rotor-Gene Q (Qiagen) を使用し、SYBER-GREEN 法にて行った。相対的 mRNA 発現量は、housekeeping gene として GAPDH を用いた、 $\Delta\Delta$ CT 法によって解析した。

Table 3 使用した primer の塩基配列

Gene	Sense primer	Antisense primer
MRP2	5'-AGG CAC TCC AGA AAT GTG CT-3'	5'-GAC TAT GGG CTG ATA TCC AGT GT-3'
GAPDH	5'-CCA TCA CCA TCT TCC AGG AG-3'	5'-CCT GCT TCA CCA CCT TCT TG-3'

3-2-5. SDS-PAGE および western blot 法

HepG2 細胞を、75 cm² の細胞培養フラスコに、 1.0×10^6 個の細胞を播種し、24 時間後、30 μ M KTZ または PEITC を加えた。KTZ または PEITC を 24 時間接触後、細胞を採取し、冷 PBS で 3 回洗浄した。細胞の膜タンパク質画分は、plasma membrane protein extraction kit (MBL) を用いて抽出した。20 μ g/lane をポリアクリルアミドゲルを用いて SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) によって分離し、polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜に転写した。メンブレンを Bullet Blocking One for Western Blotting (ナカライテスク) に浸し、1 時間室温で振盪させた。1 次抗体として MRP2 (24893-1-AP、Proteintech) または GAPDH (10494-1-AP、Proteintech) をそれぞれ用い、4°C で一晩反応させた。PVDF 膜を PBS-T (FUJIFILM Wako Pure Chemical) ですすぎ、その後、horseradish peroxidase (HRP) -conjugated anti-rabbit IgG (#7470、Cell Signaling Technology) を室温で 1 時間反応させた。その後、PVDF 膜を洗浄し、ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare Japan) で可視化を行った。

3-2-6. 統計学的処理

結果は平均±標準偏差 (SD) として表した。統計分析は、コントロール群との多重比較のために、Dunnett's test を使用した。p < 0.05 は有意とみなした。

3-3. 結果

3-3-1. PXR アンタゴニスト併用による Caspase-3 活性への影響

前章において、HepG2 細胞において、10 μM CDDP と比較して、25 μM の CDDP では caspase-3 活性を有意に増加させた。また、HepG2 細胞において、CBDCA は、360 μM で caspase-3 活性を増加させたが、180 μM では効果がなかった。したがって、10 μM CDDP および 180 μM CBDCA を、PXR アンタゴニストと併用する条件として設定し、caspase-3 活性に対する影響について検討した。HepG2 細胞において、30 μM KTZ あるいは 30 μM PEITC の単独接触は、caspase-3 活性に影響を与えなかった。CDDP または CBDCA と PXR アンタゴニストの併用接触では、caspase-3 活性は顕著な増大を示した (Figure 13)。また、caspase-3 活性に対する PXR アンタゴニストの併用効果は、いずれにおいても CDDP と比較し、CBDCA では低かった。

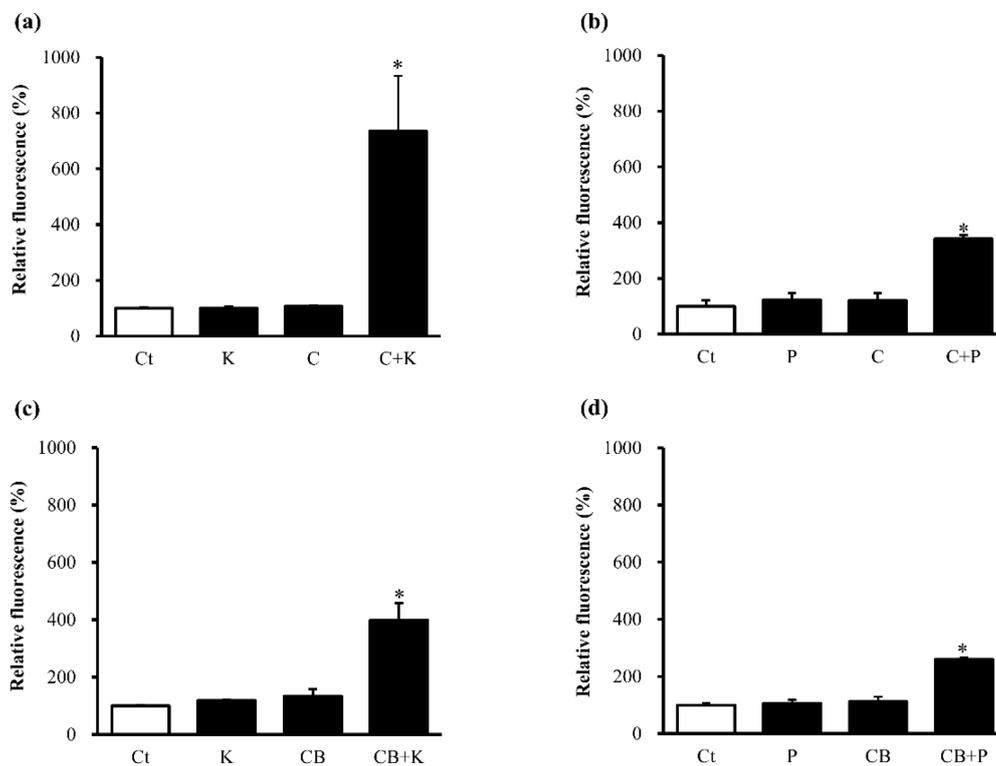


Figure 13. Effects of KTZ (K) and PEITC (P) on caspase-3 activation induced by CDDP (C) or CBDCA (CB) in HepG2 cells. Cells were exposed to 30 μ M of KTZ or PEITC for 48 h with/without 10 μ M of CDDP (a and b, respectively) or 180 μ M of CBDCA (c and d, respectively) for 24 h. Caspase-3 activity in HepG2 cells was assessed in each group by fluorescence and expressed as the fold increase with respect to the untreated control group (Ct). Data are presented as the mean \pm SD for three independent experiments. * p <0.05 vs. control.

3-3-2. PXR アンタゴニスト併用による細胞内白金量への影響

HepG2 細胞において、25 μM CDDP または 360 μM CBDCA を単独接触した場合、細胞内白金量はそれぞれ 110 ± 4.7 および 222 ± 55.8 ng/mg protein であった (Figure 14)。したがって、CBDCA 接触では、CDDP 接触と比較して、モル用量あたりの細胞内白金量は明らかに低く、CBDCA の細胞内蓄積性が低いことが示された。CDDP との併用において、30 μM KTZ および PEITC は、細胞内白金量をそれぞれ 2.3 倍と 4.9 倍に増加させた。また、CBDCA との併用において、KTZ は細胞内白金量に影響を与えず、PEITC は 1.9 倍に増加させた。

したがって、細胞内白金量に対する PXR アンタゴニストの併用効果は、CDDP と比較して CBDCA の方が低く、PEITC の方が KTZ よりも大きい細胞内白金量の増加作用を示した。

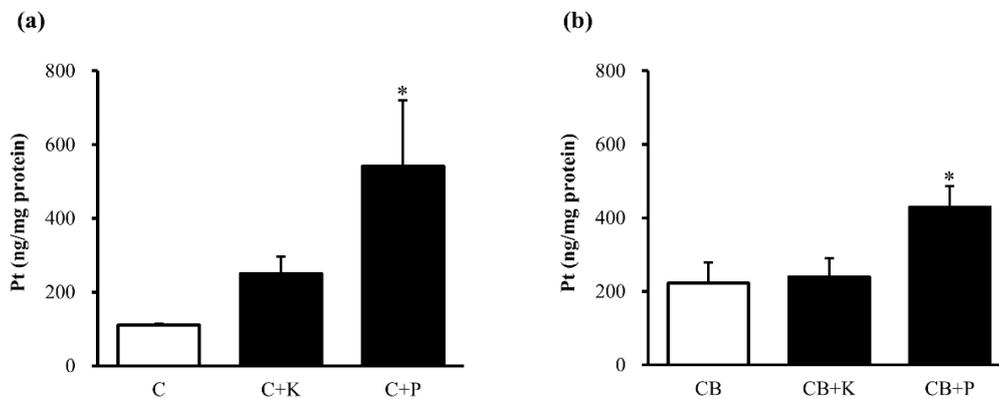


Figure 14. Effects of KTZ (K) and PEITC (P) on the intracellular platinum accumulation in HepG2 cells additionally exposed to CDDP (C) (a) or CBDCA (CB) (b) for 24 h. The control group was exposed to CDDP or CBDCA only. Data are presented as mean \pm SD of three independent experiments. * $p < 0.05$ vs. control.

3-3-3. PXR アンタゴニスト併用による MRP2 mRNA 発現への影響

白金化合物を細胞外に排出する機能を有し PXR によって調節されるトランスポーターである MRP2 の mRNA 発現量に及ぼす KTZ および PEITC の影響について検討した (Figure 15)。30 μ M KTZ 単独接触および 10 μ M CDDP との併用接触は、MRP2 mRNA の発現量に影響を与えなかった。しかし、30 μ M PEITC は、10 μ M CDDP と併用した場合、MRP2 mRNA 発現量を 18%と顕著に減少させた。また、10 μ M CDDP 単独接触では MRP2 の発現量に影響は見られなかったが、25 μ M CDDP 単独接触では発現量が 9%と著しく低下した (データは示さず)。

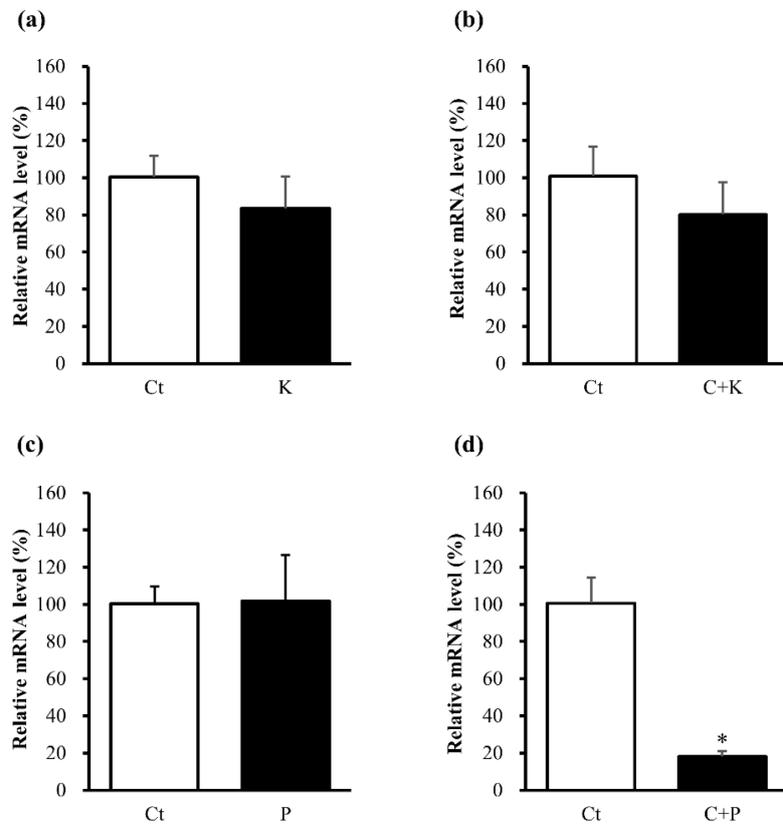


Figure 15. Relative MRP2 mRNA level in HepG2 cells exposed to KTZ (K) and PEITC (P) alone and in combination with CDDP (C). MRP2 mRNA level was normalized to that of GAPDH. The relative mRNA level was expressed as the fold increase with respect to that of the control group (Ct). Data are presented as means \pm SD of three independent experiments. * p <0.05 vs. control.

3-3-4. PXR アンタゴニスト併用による MRP2 タンパク質発現への影響

HepG2 細胞の細胞膜分画における MRP2 のタンパク質発現量に対する KTZ および PEITC の影響について検討を行った (Figure 16)。HepG2 細胞において、30 μ M KTZ 接触は、MRP2 発現量に影響は与えなかったが、30 μ M PEITC 接触は MRP2 発現量を 18%まで有意に低下させた。

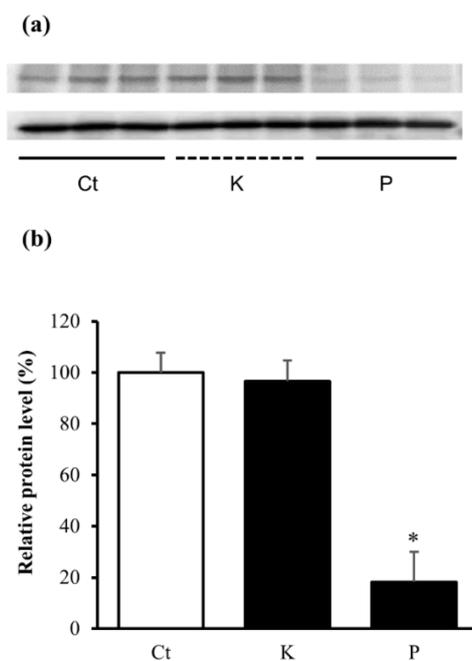


Figure 16. Membrane protein expression level of MRP2 in HepG2 cells exposed to KTZ (K) and PEITC (P) alone. A: Immunoblotting for MRP2 and GAPDH in HepG2 cells. B: Protein levels of MRP2 were normalized to that of GAPDH. Relative protein level of MRP2 is expressed as fold increase with respect to that of the untreated control group. Data are presented as mean \pm SD of three independent experiments. * p <0.05 vs. control.

3-4. 考察

CDDP に対する耐性獲得に関与する要因の 1 つは、細胞内白金蓄積の減少である。細胞内白金量の低下は、細胞内取り込みの減少、細胞外への排出の増強、またはその両方に起因する^{70,71)}。さまざまなトランスポーターがこれらの経路で重要な役割を担うが、その中でも、MRP2 が CDDP 耐性に関連することが多数報告されている^{68,69)}。核内受容体は、トランスポーターの発現調節に関与することが知られている^{72,73)}。前章において、PXR アゴニストである RFP が CDDP の抗腫瘍活性を抑制し、PXR アンタゴニストである LEF が CDDP 耐性を克服することを示した。他の報告においても、PXR アンタゴニストの併用が多剤耐性を克服することにより、抗がん剤の有効性を改善する可能性があることが示唆されている⁷⁴⁾。

本章では、PXR アンタゴニストの併用が、CDDP あるいは CBDCA の抗腫瘍活性を高める可能性を、2 つの構造的に異なる PXR アンタゴニストであるアゾール系抗真菌薬 KTZ、およびイソチオシアネート誘導体 PEITC を用いて検討を行った。両薬剤は、CDDP と併用すると、caspase-3 活性を有意に増加させ、KTZ はより強い増強作用を示した。また、両薬剤と CDDP との併用は、細胞内白金量を増大させ、PEITC はより強い増大作用を示した。CBDCA と併用させた場合においても、KTZ は caspase-3 活性をより顕著に増大させたが、細胞内白金量では、PEITC のみ有意な増加をもたらした。したがって、両薬剤による CDDP あるいは CBDCA との併用においてもたらされる caspase-3 活性の増大と細胞内白金量の増加には相関性が認められなかった。一般に、白金化合物の抗腫瘍活性は、細胞内に蓄積された白金量に依存する。したがって、KTZ と PEITC は、異なる作用機序を介して白金化合物の抗腫瘍活性を高めた可能性が考えられる。この研究では、PXR アンタゴニストの併用効果のメカニズムは、白金化合物の排出トランスポーターである MRP2 の発現量の減少であると想定した。本章の結果によると、PEITC は MRP2 タンパク質の発現を抑制したが、KTZ は MRP2 タンパク質の発現を抑制しなかった。よって、PEITC による CDDP の抗腫瘍活性の増強は、主に MRP2 の発現抑制による細胞内白金蓄積の増加に起因することが示唆される。ただし、MRP2 mRNA 発現量は PEITC 単独では変化せず、CDDP と併用した場合に、顕著な減少が観察された。一方、KTZ は、PEITC とは対照的に、CDDP と併用しても MRP2 mRNA 発現量に影響を与えなかった。Tang らによると、ヒト CDDP 耐性胃癌細胞 SGC7901/DDP において、PEITC を接触させると、PXR によって発現が制御されている MDR1 および MRP2 の mRNA およびタンパク質発現量の減少が生じた⁸⁰⁾。さらに、PEITC は、MRP2 の基質であるグルタチオンと細胞内で相互作用することで MRP2 を介した他の物質の輸送を阻害する可能性が報告されている⁸¹⁾。したがって、PEITC と CDDP の併用効果は、MRP2 発現の抑制と MRP2 の機能的阻害に基づいていると考えられる。

PXR は、主に薬物代謝酵素とトランスポーターの発現を調節して生体異物を排除する生体異物受容体であるが、アポトーシスを含む細胞増殖に関するタンパク質発現についても調節している可能性がある。PXR は、抗アポトーシス因子である Bcl-2 および Bcl-xL の活性化に関与し、スタウロスポリンによるアポトーシスを抑制し肝細胞を保護することが示されている⁸²⁾。Lin らは、ヒト骨肉腫細胞において、KTZ は、Ca²⁺非依存的に c-Jun N 末端キナーゼ (JNK) リン酸化を介して細胞死とアポトーシスを誘導することを明らかにした⁸³⁾。KTZ は、PXR によって制御される Bcl-2 ファミリーおよび増殖シグナル伝達経路に対しても抑制効果を持ち、細胞にアポトーシスを誘導する可能性がある。この作用が、KTZ による CDDP の抗腫瘍活性の増強メカニズムとなる可能性が考えられる。

本章では、白金化合物の抗腫瘍活性を高めることができる薬剤として PXR アンタゴニストに注目し、KTZ および PEITC の機能特性について比較した。KTZ と PEITC が、白金化合物との併用による活性増強を示す際に、caspase-3 活性と細胞内白金量の間には相関性は認められなかった。細胞内白金量の顕著な増加をもたらした PEITC の存在下でのみ、細胞膜における MRP2 タンパク質発現の抑制が認められた。一方、KTZ は、細胞内白金量の大きな変化なしに caspase-3 活性の顕著な増加をもたらし、KTZ の作用がアポトーシス制御機構に関与している可能性があることが示された。これらの結果は、KTZ と PEITC が PXR によって調節される異なる経路を抑制することにより、白金化合物の抗腫瘍活性を増強したことを示唆している。PXR アンタゴニストは白金化合物と組み合わせるとより大きな効果をもたらしたが、併用する白金化合物または標的とする腫瘍に応じて、複数の作用機序を持つ PXR アンタゴニストの併用方法を決定するには、さらなる研究が必要であると考えられる。

総括

本研究では、抗がん剤である CDDP の有用性を高める目的で 2 つの検討を行った。1 つは、CDDP による腎障害に対する Mg の補充投与が、がん細胞における CDDP の挙動に与える影響を *in vitro* にて検討を行った。もう 1 つは、トランスポーターや代謝酵素などの発現の調節を担っている核内受容体に着目し、CDDP の抗腫瘍効果の発現へのかかわり、さらに核内受容体のリガンド併用による CDDP 抗腫瘍活性への影響およびその作用機序について検討した。以下に本研究で得られた知見を示す。

1 Mg の補充投与は、がん細胞における CDDP の排出トランスポーターに対し、遺伝子発現量に影響はあるものの、タンパク質発現量には影響を与えなかった。

2 Mg の併用は、CDDP の細胞毒性および細胞内白金量には影響しないことが明らかとなった。したがって、臨床レジメンでの Mg の補充投与は、CDDP の抗腫瘍効果に影響することはほとんどないことが示唆された。

3 核内受容体のうち PXR は、CDDP の接触濃度およびそれに応じた caspase-3 活性に相関した変化を認め、CDDP の毒性から細胞を守るうえで重要な役割を果たしていることが示唆された。

4 PXR アゴニストである RFP の併用は、CDDP により誘導される細胞増殖抑制効果と caspase-3 の活性化を阻害し、CDDP の細胞内蓄積量を減少させた。一方、PXR アンタゴニストである LEF の併用は、CDDP による caspase-3 の活性化を増大し、PXR が高発現している CDDP 耐性細胞の CDDP 感受性の回復をもたらした。

5 PXR アンタゴニストの併用による白金化合物の抗腫瘍活性の増大の一因としては、白金化合物の細胞内蓄積量の増大があげられ、白金排出トランスポーターの MRP2 の発現量の減少が関与することが示された。

がんの治療には手術、放射線療法、化学療法の三大治療がある。手術や放射線治療が、がんに対する直接的・局所的な治療であるのに対し、化学療法では、より広い範囲に治療の効果が期待できる。各臓器の悪性腫瘍に対する化学療法は、ガイドラインが作成されている。ガイドラインの根拠になっている各種臨床試験では、一定の選択基準を満たした患者が対象となっていることが多く、選択基準に合致しない患者も少なくない。特に近年、高齢化社

会を迎え、高齢患者における化学療法の適応、治療効果と副作用のバランスを考慮した薬剤選択や投与量の決定を行わなければならない。

本研究より、Mgの併用は、がん細胞におけるCDDPの細胞内蓄積量や細胞毒性には影響がほとんどないことが明らかとなった。ガイドラインでは、CDDPによる腎障害を予防するためのMgの補充投与が推奨されているが、現時点においてMgの推奨投与量や投与の至適タイミングは未だ明らかでない。また、今回の検討ではガイドラインに記載されている濃度のMgを補充した場合を想定したものであるが、施設によってはさらに高濃度のMgを補充されている場合もある。したがって、今後さらに臨床の実情にあわせ、かつ、ガイドラインの策定にいかしうる検討が必要とされる。

また、PXRアンタゴニストの併用は、CDDPの抗腫瘍活性を高め、CDDP耐性を克服することが明らかとなった。すなわち、PXRアンタゴニストを併用薬として用いることにより、低用量CDDPで、高用量単独時と同程度の抗腫瘍効果を得られることが示唆された。これまで副作用の懸念から、CDDPの投与が困難であった臓器機能の低下を認める高齢患者あるいは、再発・転移し全身状態が低下しているような患者においてもPXRアンタゴニストの併用により治療可能とすることが期待される。今後は、白金化合物または標的とする腫瘍に応じて、最適なPXRアンタゴニストの選択、併用スケジュール、およびin vivo併用方法になどさらなる研究が必要であると考えられる。

参考文献

1. Cvitkovic E, Spaulding J, Bethune V, Martin J, Whitmore WF. Improvement of cis-dichlorodiammineplatinum (NSC 119875): therapeutic index in an animal model. *Cancer*, **39**, 1357-1361 (1977).
2. Finley RS, Fortner CL, Grove WR. Cisplatin nephrotoxicity: a summary of preventative interventions. *Drug Intell Clin Pharm*, **19**, 362-367 (1985).
3. Lajer H, Daugaard G. Cisplatin and hypomagnesemia. *Cancer Treat Rev*, **25(1)**, 47-58 (1999).
4. Nakamura T, Yonezawa A, Hashimoto S, Katsura T, Inui K. Disruption of multidrug and toxin extrusion MATE1 potentiates cisplatin-induced nephrotoxicity. *Biochem Pharmacol*, **80**, 1762-1767 (2010).
5. Saito Y, Okamoto K, Kobayashi M, Narumi K, Yamada T, Iseki K. Magnesium attenuates cisplatin-induced nephrotoxicity by regulating the expression of renal transporters. *Eur J Pharmacol*, **811**, 191-198 (2017).
6. Bodnar L, Wcislo G, Gasowska-Bodnar A, Synowiec A, Szarlej-Wcislo K, Szczylik C. Renal protection with magnesium subcarbonate and magnesium sulphate in patients with epithelial ovarian cancer after cisplatin and paclitaxel chemotherapy: a randomised phase II study. *Eur J Cancer*, **44**, 2608-2614 (2008).
7. Yoshida T, Niho S, Toda M, Goto K, Yoh K, Umemura S, Matsumoto S, Ohmatsu H, Ohe Y. Protective effect of magnesium preloading on cisplatin-induced nephrotoxicity: a retrospective study. *Jpn J Clin Oncol*, **44**, 346-354 (2014).
8. Barenholz Y. Doxil®--the first FDA-approved nano-drug: lessons learned. *J Control Release*, **160(2)**, 117-134 (2012).

9. Kenmotsu H, Yasunaga M, Goto K, Nagano T, Kuroda J, Koga Y, Takahashi A, Nishiwaki Y, Matsumura Y. The antitumor activity of NK012, an SN-38-incorporating micelle, in combination with bevacizumab against lung cancer xenografts. *Cancer*, **116(19)**, 4597-604 (2010).
10. Stathopoulos GP. Liposomal cisplatin: a new cisplatin formulation. *Anticancer Drugs*, **21(8)**, 732-736 (2010).
11. Wheate NJ, Walker S, Craig GE, Oun R. The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials. *Dalton Trans*, **39(35)**, 8113-8127 (2010).
12. Fernández-Delgado E, de la Cruz-Martínez F, Galán C, Franco L, Espino J, Viñuelas-Zahinos E, Luna-Giles F, Bejarano I. Pt(II) and Pd(II) complexes with a thiazoline derivative ligand: Synthesis, structural characterization, antiproliferative activity and evaluation of proapoptotic ability in tumor cell lines HT-29 and U-937. *J Inorg Biochem*, **202**, 110870 (2019).
13. Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*, **22(47)**, 7265-7279 (2003).
14. Hall MD, Okabe M, Shen DW, Liang XJ, Gottesman MM. The role of cellular accumulation in determining sensitivity to platinum-based chemotherapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **48**, 495-535 (2008).
15. Kishimoto S, Yasuda M, Fukushima S. Changes in the expression of various transporters as influencing factors of resistance to cisplatin. *Anticancer Res*, **37(10)**, 5477-5484 (2017).
16. Hakkola J, Bernasconi C, Coecke S, Richert L, Andersson TB, Pelkonen O. Cytochrome P450 Induction and Xeno-Sensing Receptors Pregnane X Receptor, Constitutive androstane receptor, aryl hydrocarbon receptor and peroxisome proliferator-activated receptor α at the crossroads of toxicokinetics and toxicodynamics. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, **123 Suppl**

- 5, 42-50 (2018).
17. Goren MP. Cisplatin nephrotoxicity affects magnesium and calcium metabolism. *Med Pediatr Oncol*, **41**, 186-189 (2003).
 18. Lajer H, Kristensen M, Hansen HH, Nielsen S, Frøkiaer J, Ostergaard LF, Christensen S, Daugaard G, Jonassen TE. Magnesium depletion enhances cisplatin-induced nephrotoxicity. *Cancer Chemother Pharmacol*, **56**, 535-542 (2005).
 19. Tong GM, Rude RK. Magnesium deficiency in critical illness. *J Intensive Care Med*, **20**, 3-17 (2005).
 20. Hansen BA, Bruserud Ø. Hypomagnesemia in critically ill patients. *J Intensive Care*, **6**, 21 (2018).
 21. van Angelen AA, Glaudemans B, van der Kemp AW, Hoenderop JG, Bindels RJ. Cisplatin-induced injury of the renal distal convoluted tubule is associated with hypomagnesaemia in mice. *Nephrol Dial Transplant*, **28**, 879-889 (2013).
 22. Okuda M, Tsuda K, Masaki K, Hashimoto Y, Inui K. Cisplatin-induced toxicity in LLC-PK1 kidney epithelial cells: role of basolateral membrane transport. *Toxicol Lett*, **106**, 229-235 (1999).
 23. Endo T, Kimura O, Sakata M. Carrier-mediated uptake of cisplatin by the OK renal epithelial cell line. *Toxicology*, **146**, 187-195 (2000).
 24. Yokoo S, Yonezawa A, Masuda S, Fukatsu A, Katsura T, Inui K. Differential contribution of organic cation transporters, OCT2 and MATE1, in platinum agent-induced nephrotoxicity. *Biochem Pharmacol*, **74**, 477-487 (2007).
 25. Yokoo K, Murakami R, Matsuzaki T, Yoshitome K, Hamada A, Saito H. Enhanced renal accumulation of cisplatin via renal organic cation transporter deteriorates acute kidney injury

- in hypomagnesemic rats. *Clin Exp Nephrol*, **13**, 578-584 (2009).
26. Yonezawa A, Inui K. Organic cation transporter OCT/SLC22A and H⁺/organic cation antiporter MATE/SLC47A are key molecules for nephrotoxicity of platinum agents. *Biochem Pharmacol*, **81**, 563-568 (2011).
 27. Filipinski KK, Loos WJ, Verweij J, Sparreboom A. Interaction of Cisplatin with the human organic cation transporter 2. *Clin Cancer Res*, **14**, 3875-3880 (2008).
 28. Yang W, Lee JY, Nowotny M. Making and breaking nucleic acids: two-Mg²⁺-ion catalysis and substrate specificity. *Mol Cell*, **22**, 5-13 (2006).
 29. Matsumoto S, Tanaka T, Kurokawa H, Matsuno K, Hayashida Y, Takahashi T. Effect of copper and role of the copper transporters ATP7A and CTR1 in intracellular accumulation of cisplatin. *Anticancer Res*, **27**, 2209-2216 (2007).
 30. Akerfeldt MC, Tran CM, Shen C, Hambley TW, New EJ. Interactions of cisplatin and the copper transporter CTR1 in human colon cancer cells. *J Biol Inorg Chem*, **22**, 765-774 (2017).
 31. Sahni J, Scharenberg AM. The SLC41 family of MgtE-like magnesium transporters. *Mol Aspects Med*, **34**, 620-628 (2013).
 32. de Baaij JH, Arjona FJ, van den Brand M, Lavrijsen M, Lameris AL, Bindels RJ, Hoenderop JG. Identification of SLC41A3 as a novel player in magnesium homeostasis. *Sci Rep*, **6**, 28565 (2016).
 33. Zhou Y, Ling XL. Establishment of a cisplatin-induced multidrug resistance cell line SK-Hep1/DDP. *Chin J Cancer*, **29(2)**, 167-171 (2010).
 34. Liedert B, Materna V, Schadendorf D, Thomale J, Lage H. Overexpression of cMOAT (MRP2/ABCC2) is associated with decreased formation of platinum-DNA adducts and decreased G2-arrest in melanoma cells resistant to cisplatin. *J Invest Dermatol*, **121(1)**, 172-

- 176 (2003).
35. Haga S, Hinoshita E, Ikezaki K, Fukui M, Scheffer GL, Uchiumi T, Kuwano M. Involvement of the multidrug resistance protein 3 in drug sensitivity and its expression in human glioma. *Jpn J Cancer Res*, **92(2)**, 211-219 (2001).
 36. Song IS, Savaraj N, Siddik ZH, Liu P, Wei Y, Wu CJ, Kuo MT. Role of human copper transporter Ctr1 in the transport of platinum-based antitumor agents in cisplatin-sensitive and cisplatin-resistant cells. *Mol Cancer Ther*, **3(12)**, 1543-1549 (2004).
 37. Zisowsky J, Koegel S, Leyers S, Devarakonda K, Kassack MU, Osmak M, Jaehde U. Relevance of drug uptake and efflux for cisplatin sensitivity of tumor cells. *Biochem Pharmacol*, **73(2)**, 298-307 (2007).
 38. Yonezawa A, Masuda S, Yokoo S, Katsura T, Inui K. Cisplatin and oxaliplatin, but not carboplatin and nedaplatin, are substrates for human organic cation transporters (SLC22A1-3 and multidrug and toxin extrusion family). *J Pharmacol Exp Ther*, **319(2)**, 879-886 (2006).
 39. Zhang S, Lovejoy KS, Shima JE, Lagpacan LL, Shu Y, Lapuk A, Chen Y, Komori T, Gray JW, Chen X, Lippard SJ, Giacomini KM. Organic cation transporters are determinants of oxaliplatin cytotoxicity. *Cancer Res*, **66(17)**, 8847-8857 (2006).
 40. Kishimoto S, Kawazoe Y, Ikeno M, Saitoh M, Nakano Y, Nishi Y, Fukushima S, Takeuchi Y. Role of Na⁺, K⁺-ATPase alpha1 subunit in the intracellular accumulation of cisplatin. *Cancer Chemother Pharmacol*, **57(1)**, 84-90 (2006).
 41. Andrews PA, Mann SC, Huynh HH, Albright KD. Role of the Na⁺, K⁺-adenosine triphosphatase in the accumulation of cis-diamminedichloroplatinum(II) in human ovarian carcinoma cells. *Cancer Res*, **51(14)**, 3677-3681 (1991).
 42. De Mattia E, Cecchin E, Roncato R, Toffoli G. Pregnane X receptor, constitutive androstane

- receptor and hepatocyte nuclear factors as emerging players in cancer precision medicine. *Pharmacogenomics*, **17(14)**, 1547-1571 (2016).
43. Wang D, Li L, Yang H, Ferguson SS, Baer MR, Gartenhaus RB, Wang H. The constitutive androstane receptor is a novel therapeutic target facilitating cyclophosphamide-based treatment of hematopoietic malignancies. *Blood*, **121(2)**, 329-338 (2013).
 44. Peters JM, Shah YM, Gonzalez FJ. The role of peroxisome proliferator-activated receptors in carcinogenesis and chemoprevention. *Nat Rev Cancer*, **12(3)**, 181-195 (2012).
 45. Pondugula SR, Mani S. Pregnane xenobiotic receptor in cancer pathogenesis and therapeutic response. *Cancer Lett*, **328(1)**, 1-9 (2013).
 46. Estrela GR, Wasinski F, Batista RO, Hiyane MI, Felizardo RJ, Cunha F, de Almeida DC, Malheiros DM, Câmara NO, Barros CC, Bader M, Araujo RC. Caloric restriction is more efficient than physical exercise to protect from cisplatin nephrotoxicity via PPAR-alpha activation. *Front Physiol*, **8**, 116 (2017).
 47. Kim SJ, Park C, Lee JN, Park R. Protective roles of fenofibrate against cisplatin-induced ototoxicity by the rescue of peroxisomal and mitochondrial dysfunction. *Toxicol Appl Pharmacol*, **353**, 43-54 (2018).
 48. De Lellis L, Cimini A, Veschi S, Benedetti E, Amoroso R, Cama A, Ammazalorso A. The Anticancer potential of peroxisome proliferator-activated receptor antagonists. *ChemMedChem*, **13(3)**, 209-219 (2018).
 49. Albermann N, Schmitz-Winnenthal FH, Z'graggen K, Volk C, Hoffmann MM, Haefeli WE, Weiss J. Expression of the drug transporters MDR1/ABCB1, MRP1/ABCC1, MRP2/ABCC2, BCRP/ABCG2, and PXR in peripheral blood mononuclear cells and their relationship with the expression in intestine and liver. *Biochem Pharmacol*, **70(6)**, 949-958 (2005).

50. Burk O, Arnold KA, Geick A, Tegude H, Eichelbaum M. A role for constitutive androstane receptor in the regulation of human intestinal MDR1 expression. *Biol Chem*, **386(6)**, 503-513 (2005).
51. Gupta D, Venkatesh M, Wang H, Kim S, Sinz M, Goldberg GL, Whitney K, Longley C, Mani S. Expanding the roles for pregnane X receptor in cancer: proliferation and drug resistance in ovarian cancer. *Clin Cancer Res*, **14(17)**, 5332-5340 (2008).
52. Harmsen S, Meijerman I, Febus CL, Maas-Bakker RF, Beijnen JH, Schellens JH. PXR-mediated induction of P-glycoprotein by anticancer drugs in a human colon adenocarcinoma-derived cell line. *Cancer Chemother Pharmacol*, **66(4)**, 765-771 (2010).
53. Mani S, Huang H, Sundarababu S, Liu W, Kalpana G, Smith AB, Horwitz SB. Activation of the steroid and xenobiotic receptor (human pregnane X receptor) by nontaxane microtubule-stabilizing agents. *Clin Cancer Res*, **11(17)**, 6359-6369 (2005).
54. Wang H, Huang H, Li H, Teotico DG, Sinz M, Baker SD, Staudinger J, Kalpana G, Redinbo MR, Mani S. Activated pregnenolone X-receptor is a target for ketoconazole and its analogs. *Clin Cancer Res*, **13(8)**, 2488-2495 (2007).
55. Mani S, Dou W, Redinbo MR. PXR antagonists and implication in drug metabolism. *Drug Metab Rev*, **45(1)**, 60-72 (2013).
56. Staudinger JL. Clinical applications of small molecule inhibitors of Pregnane X receptor. *Mol Cell Endocrinol*, **485**, 61-71 (2019).
57. Ekins S, Kholodovych V, Ai N, Sinz M, Gal J, Gera L, Welsh WJ, Bachmann K, Mani S. Computational discovery of novel low micromolar human pregnane X receptor antagonists. *Mol Pharmacol*, **74(3)**, 662-672 (2008).
58. Mackowiak B, Hodge J, Stern S, Wang H. The roles of xenobiotic receptors: Beyond chemical

- disposition. *Drug Metab Dispos*, **46(9)**, 1361-1371 (2018).
59. Lolodi O, Wang YM, Wright WC, Chen T. Differential regulation of CYP3A4 and CYP3A5 and its implication in drug discovery. *Curr Drug Metab*, **18(12)**, 1095-1105 (2017).
 60. Hedrich WD, Hassan HE, Wang H. Insights into CYP2B6-mediated drug-drug interactions. *Acta Pharm Sin B*, **6(5)**, 413-425 (2016).
 61. Hu DG, Meech R, McKinnon RA, Mackenzie PI. Transcriptional regulation of human UDP-glucuronosyltransferase genes. *Rf*
 62. Tocchetti GN, Rigalli JP, Arana MR, Villanueva SSM, Mottino AD. Modulation of expression and activity of intestinal multidrug resistance-associated protein 2 by xenobiotics. *Toxicol Appl Pharmacol*, **303**, 45-57 (2016).
 63. Pavek P. Pregnane X receptor (PXR)-mediated gene repression and cross-talk of PXR with other nuclear receptors via coactivator interactions. *Front Pharmacol*, **7**, 456 (2016).
 64. Ma X, Idle JR, Gonzalez FJ. The pregnane X receptor: from bench to bedside. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, **4(7)**, 895-908 (2008).
 65. Wang T, Ma X, Krausz KW, Idle JR, Gonzalez FJ. Role of pregnane X receptor in control of all-trans retinoic acid (ATRA) metabolism and its potential contribution to ATRA resistance. *J Pharmacol Exp Ther*, **324(2)**, 674-684 (2008).
 66. Mensah-Osman EJ, Thomas DG, Tabb MM, Larios JM, Hughes DP, Giordano TJ, Lizyness ML, Rae JM, Blumberg B, Hollenberg PF, Baker LH. Expression levels and activation of a PXR variant are directly related to drug resistance in osteosarcoma cell lines. *Cancer*, **109(5)**, 957-965 (2007).
 67. Masuyama H, Nakatsukasa H, Takamoto N, Hiramatsu Y. Down-regulation of pregnane X receptor contributes to cell growth inhibition and apoptosis by anticancer agents in

- endometrial cancer cells. *Mol Pharmacol*, **72(4)**, 1045-1053 (2007).
68. Wen X, Buckley B, McCandlish E, Goedken MJ, Syed S, Pelis R, Manautou JE, Aleksunes LM. Transgenic expression of the human MRP2 transporter reduces cisplatin accumulation and nephrotoxicity in Mrp2-null mice. *Am J Pathol*, **184(5)**, 1299-1308 (2014).
69. Han T, Zhu X, Wang J, Zhao H, Ma Q, Zhao J, Qiu X, Fan Q. Establishment and characterization of a cisplatin-resistant human osteosarcoma cell line. *Oncol Rep*, **32(3)**, 1133-1139 (2014).
70. Amable L. Cisplatin resistance and opportunities for precision medicine. *Pharmacol Res*, **106**, 27-36 (2016).
71. Ghosh S. Cisplatin: The first metal based anticancer drug. *Bioorg Chem*, **88**, 102925 (2019).
72. Kwatra D, Vadlapudi AD, Vadlapatla RK, Khurana V, Pal D, Mitra AK. Binary and ternary combinations of anti-HIV protease inhibitors: effect on gene expression and functional activity of CYP3A4 and efflux transporters. *Drug Metabol Drug Interact*, **29(2)**, 101-110 (2014).
73. Rigalli JP, Ciriaci N, Arias A, Ceballos MP, Villanueva SS, Luquita MG, Mottino AD, Ghanem CI, Catania VA, Ruiz ML. Regulation of multidrug resistance proteins by genistein in a hepatocarcinoma cell line: impact on sorafenib cytotoxicity. *PLoS One*, **10(3)**, e0119502 (2015).
74. Kwatra D, Venugopal A, Standing D, Ponnurangam S, Dhar A, Mitra A, Anant S. Bitter melon extracts enhance the activity of chemotherapeutic agents through the modulation of multiple drug resistance. *J Pharm Sci*, **102(12)**, 4444-4454 (2013).
75. Maertens JA. History of the development of azole derivatives. *Clin Microbiol Infect*, **10 Suppl 1**, 1-10 (2004).

76. Liebertz C, Fox P. Ketoconazole as a secondary hormonal intervention in advanced prostate cancer. *Clin J Oncol Nurs*, **10(3)**, 361-366 (2006).
77. Huang H, Wang H, Sinz M, Zoeckler M, Staudinger J, Redinbo MR, Teotico DG, Locker J, Kalpana GV, Mani S. Inhibition of drug metabolism by blocking the activation of nuclear receptors by ketoconazole. *Oncogene*, **26(2)**, 258-268 (2007).
78. Svecova L, Vrzal R, Burysek L, Anzenbacherova E, Cerveny L, Grim J, Trejtnar F, Kunes J, Pour M, Staud F, Anzenbacher P, Dvorak Z, Pavek P. Azole antimycotics differentially affect rifampicin-induced pregnane X receptor-mediated CYP3A4 gene expression. *Drug Metab Dispos*, **36(2)**, 339-348 (2008).
79. Zhou C, Poulton EJ, Grün F, Bammler TK, Blumberg B, Thummel KE, Eaton DL. The dietary isothiocyanate sulforaphane is an antagonist of the human steroid and xenobiotic nuclear receptor. *Mol Pharmacol*, **71(1)**, 220-229 (2007).
80. Tang T, Song X, Liu YF, Wang WY. PEITC reverse multi-drug resistance of human gastric cancer SGC7901/DDP cell line. *Cell Biol Int*, **38(4)**, 502-510 (2014).
81. Ji Y, Morris ME. Transport of dietary phenethyl isothiocyanate is mediated by multidrug resistance protein 2 but not P-glycoprotein. *Biochem Pharmacol*, **70(4)**, 640-647 (2005).
82. Zucchini N, de Sousa G, Bailly-Maitre B, Gugenheim J, Bars R, Lemaire G, Rahmani R. Regulation of Bcl-2 and Bcl-xL anti-apoptotic protein expression by nuclear receptor PXR in primary cultures of human and rat hepatocytes. *Biochim Biophys Acta*, **1745(1)**, 48-58 (2005).
83. Lin KL, Huang CC, Cheng JS, Tsai JY, Lu YC, Chang HT, Jan CR. Ketoconazole-induced JNK phosphorylation and subsequent cell death via apoptosis in human osteosarcoma cells. *Toxicol In Vitro*, **23(7)**, 1268-1276 (2009).

主論文

1. Megumi Yasuda, Shuichi Kishimoto, Rika Ebara, Manabu Amano, Shoji Fukushima., Effect of magnesium supplementation to prevent nephrotoxicity on the antitumor activity of cisplatin. *Journal of Cancer Treatment and Research*, **7(2)**, 41-46 (2019).
2. Megumi Yasuda, Shuichi Kishimoto, Manabu Amano, Shoji Fukushima., The involvement of Pregnane X receptor-regulated pathways in the antitumor activity of cisplatin. *Anticancer research*, **39**, 3601-3608 (2019).
3. Megumi Yasuda, Shuichi Kishimoto, Manabu Amano, Shoji Fukushima., Comparison of Pregnane X receptor antagonists for enhancing the antitumor effect of cisplatin. *Anticancer research*, **39**, 4749-4755 (2019).