

チロシンキナーゼ阻害剤ゲフィチニブの ABCG2 阻害作用と癌化学療法及び
光線力学診断への応用

The Inhibition Effect of Gefitinib, EGFR Tyrosin Kinase Inhibitor, on ABCG2
and its Application to Cancer Chemotherapy and Photodynamic Diagnosis

平成 23 年度入学 井上裕貴 (Inoue, Yutaka)

指導教員 吉田久博

1. 序論

薬物トランスポーターや薬剤代謝酵素は、薬物の体内動態プロファイル（吸収・分布・代謝・排泄、ターゲット部位での薬物実効濃度）を規定し、ひいては薬剤の全体的な薬理効果をも左右する。したがって、薬物トランスポーターは、薬物の体内動態において、極めて重要な役割を果たしている。イリノテカン塩酸塩（CPT-11）とプロトポルフィリンIXは、いずれも ABC（ATP-binding cassette）トランスポーターと呼ばれる一群の膜蛋白質により輸送されることが明らかになっている。CPT-11 とその活性代謝物である SN-38 及びプロトポルフィリンIXの輸送に関わるのは、主に ABCB1/MDR1（ABCB1）及び ABCG2/BCRP（ABCG2）の ABC トランスポーターである。^{1, 2)} これら 2 つの ABC トランスポーターは、消化管上皮細胞、肝臓、腎臓、血液脳関門、血液胎盤関門などで発現しており、主な生物学的役割は、低分子性異物や生体内物質の吸収・排泄過程の輸送を担い、異物から細胞や組織を保護する機能にある。一方、EGFR チロシンキナーゼ阻害剤のゲフィチニブが ABCB1 と ABCG2 を阻害することが報告されており、^{3, 4)}これらの薬物トランスポーターを阻害することにより

基質薬剤の体内動態や有効性の改善が期待できる。

CPT-11 は、中国原産の喜樹などの植物に含有されている抗腫瘍性アルカロイド、カンプトテシンから合成された水溶性の誘導体であり、トポイソメラーゼ I を阻害することにより DNA 合成を阻害し、抗腫瘍効果を示す。CPT-11 はカルボキシルエステラーゼにより代謝され、SN-38 に変換されて抗腫瘍効果を示す。

プロトポルフィリンIXはヘム合成の中間代謝物であり、赤い蛍光を発する。アミノレブリン酸 (ALA) がペプチドトランスポーター(PEPT)1 及び PEPT2 により細胞内に取り込まれるか、ALA 合成酵素により細胞内でグリシンとスクシニル CoA より合成されると、多段階の代謝を受けプロトポルフィリンIXに代謝される。プロトポルフィリンIXは腫瘍蓄積性があり、青色光線の照射により赤色蛍光を発する。これを用い腫瘍部位を特定する方法を光線力学診断と呼ぶ。

そこで本研究では、ABCB1 及び ABCG2 の阻害剤としてゲフィチニブを用い、その基質薬剤である CPT-11、ALA との併用効果について *in vitro*、*in vivo* で検討を行った。

2. CPT-11 とゲフィチニブの併用効果⁵⁾

CPT-11 は ABCB1 に、SN-38 は ABCG2 により輸送される。本研究では、まずゲフィチニブによる ABCB1 及び ABCG2 に対する阻害効果について検討を行った。蛍光基質として ABCB1 はローダミン 123 を、ABCG2 はヘキスト 33342 を用い、フローサイトメトリーにより基質薬剤の細胞内蓄積を測定した。その結果、ゲフィチニブは ABCG2 を阻害するが、ABCB1 は殆ど阻害しないことを明らかにした (図 1)。また、薬剤感受性試験の結果、ゲフィチニブは ABCG2 による SN-38 の輸送を阻害し、SN-38 の細胞障害性を増強したが、ABCB1 による CPT-11 の輸送は阻害しなかった。

これらの結果よりゲフィチニブは ABCG2 に対して特異性の高い阻害剤であることが明らかとなった。

次に、ヒト小細胞肺癌細胞株を移植した担癌マウスを用い、CPT-11 とゲフィチニブの併用投与による体内動態及び抗腫瘍効果に及ぼす影響について検討を行った。その結果、SN-38 の血中濃度及び腫瘍内濃度の増加が認められたが、CPT-11 では有意な増加は認められなかった。また、ゲフィチニブ併用による CPT-11 の抗腫瘍効果への影響について検討を行ったところ、ゲフィチニブ併用により抗腫瘍効果の増強が認められた (図 2)。以上の結果から、ゲ

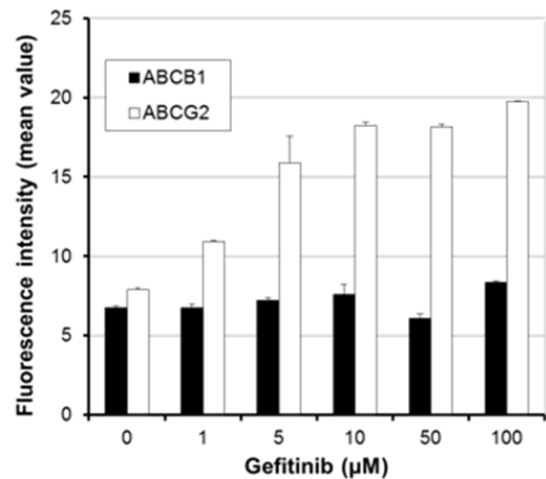


図1 ゲフィチニブによる細胞内蛍光強度への影響

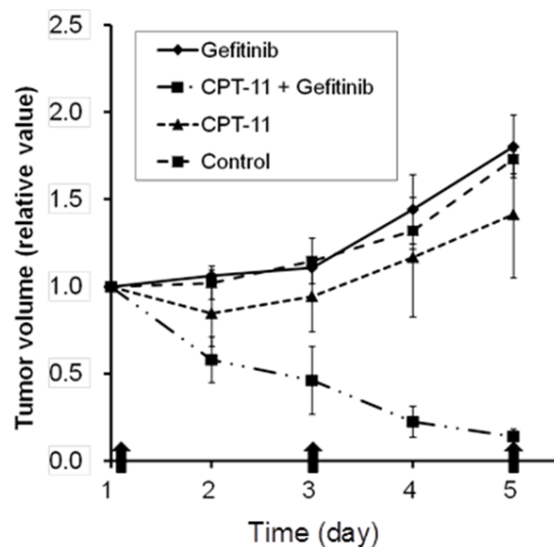


図2 ゲフィチニブによるCPT-11の抗腫瘍効果に及ぼす影響

フィチニブが腸管や肝臓に存在する ABCG2 を主に阻害することによりその体内動態が変化し、SN-38 の抗腫瘍効果が増強したものと推察される。また、CPT-11 はバイオアベイラビリティが低いため臨床では静脈内投与で用いられているが、今回経口投与で用いたところ、ゲフィチニブとの併用投与で十分な抗腫瘍効果が観察された。また、副作用に関しては CPT-11 単独時に比べゲフィチニブ併用時では呼吸抑制によるチアノーゼや肺障害、体重減少などの副作用が減少する傾向が認められた。本研究は、ゲフィチニブの併用により、CPT-11 の経口投与による QOL の向上と副作用

の軽減及び抗腫瘍効果の向上が期待できることを示唆するものである。

3. ゲフィチニブの光線力学診断および治療への応用 ⁶⁾

プロトポルフィリンIXは光線力学診断及び光線力学治療における活性本体であるが、ABCG2の基質となり細胞外へ排出され、光線力学診断や光線力学治療の効果を低下させることが報告されている。そこで本研究では、ABCG2阻害による細胞内プロトポルフィリンIXの蓄積への影響について検討する目的で、ヒトグリオブラストーマ細胞株U87MGとABCG2阻害剤としてゲフィチニブを用い *in vitro* および *in vivo* で検討を行った。

U87MG細胞を用い、ALA由来の細胞内蛍光強度の測定をフローサイトメトリーにより行った。ゲフィチニブ併用により細胞内蛍光強度の増強が

認められ、ゲフィチニブ濃度依存的に蛍光強度が強くなっていくことが確認された(図3)。また、新たに開発したHPLC法を用い細胞内プロトポルフィリンIX濃度の測定を行ったところ、

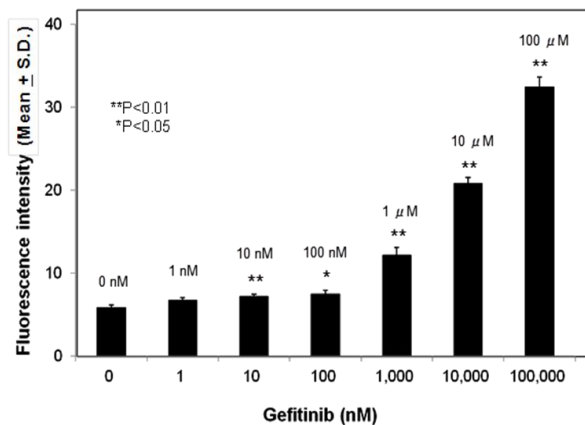


図3 ALA由来の細胞内蛍光強度に及ぼすゲフィチニブの影響

ゲフィチニブ併用により細胞内濃度の増加が認められた(図4)。次に、U87MG細胞を皮下移植したヌードマウスを用い、*in vivo*における腫瘍内プロトポルフィリンIX濃度の測定を行った。その結果、ゲフィチニ

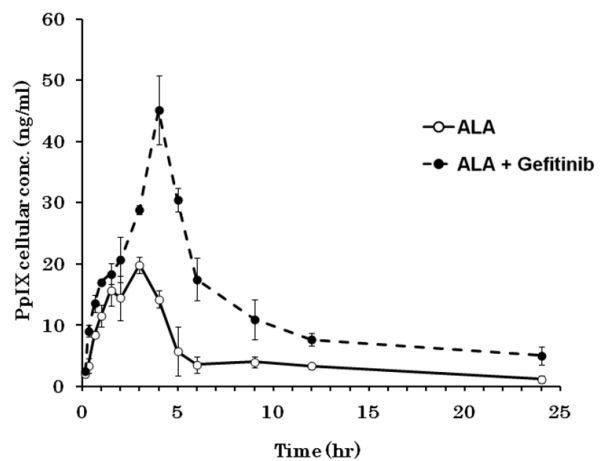


図4 細胞内プロトポルフィリンIX濃度に及ぼすゲフィチニブの影響

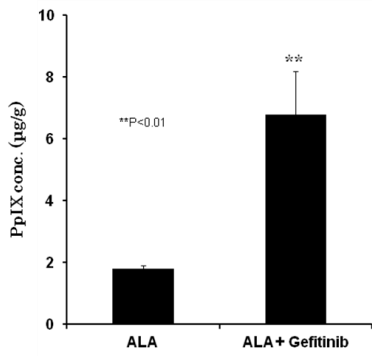


図5 *in vivo*における腫瘍内プロトポルフィリンIX濃度に対するゲフィチニブの影響

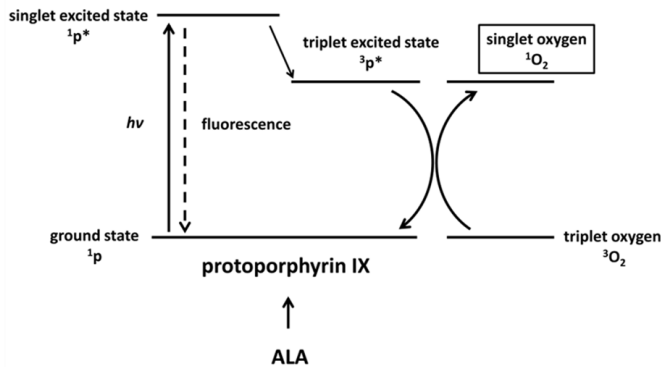


図6 光照射による一重項酸素の発生

ブ併用により、顕著な腫瘍内増加の増加が認められた（図5）。これらの結果から、ゲフィチニブ併用により U87MG 細胞に発現している ABCG2 が阻害され、その結果細胞内プロトポルフィリンIX濃度が増加し、細胞内の蛍光強度が増加したと考えられる。

また、プロトポルフィリンIXなどの光感受性物質は、光照射により光化学反応を引き

起こし、活性酸素を発生させる（図6）。これを利用した治療法を光線力学治療と呼ぶ。本研究では、ゲフィチニブの併用による ALA 光線力学治療への併用効果について検討を行った。その結果、ALA 単独時に比べ、ゲフィチニブ併用により殺細胞効果の増強が認められた（図7）。ゲフィチニブの光線力学診断への応用により、特に脳腫瘍のような周囲の正常組織を取り除くことなく癌細胞のみを切除する難易度の高い癌治療において、より正確に腫瘍のみを取り除くことが可能となり、治療成績の向上だけでなく患者の QOL の向上にも寄与で

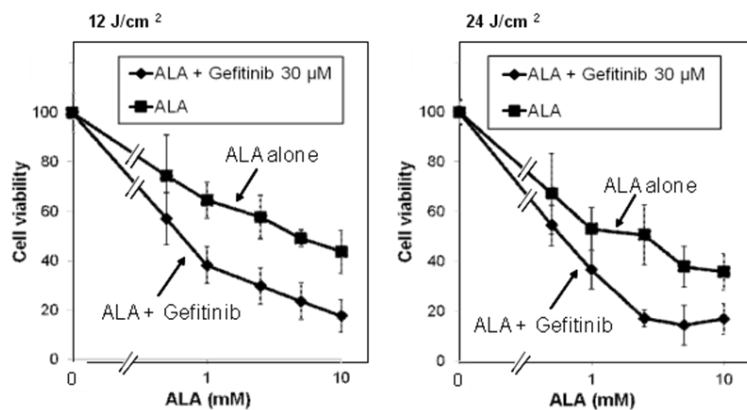


図7 ALAによる光線力学治療へのゲフィチニブの併用効果

きると考えられる。また、ゲフィチニブの併用により光線力学治療の有効性の向上に繋がるものと期待できる。

4. 総括

本研究では、ABC トランスポーター-ABCG2 阻害剤としてゲフィチニブに注目し、CPT-11 や ALA 由来のプロトポルフィリンIXの生体内における輸送への影響について検討を行った。その結果、生体内に発現する ABCG2 を阻害することにより体内動態を、癌細胞に発現する ABCG2 を阻害することにより細胞内薬物動態を制御し、既知薬剤の有効性を向上させることを明らかにした。今後は、ゲフィチニブやその他の ABC トランスポーター阻害剤の臨床応用が多いに期待される。

- 1) Yoshikawa M., Ikegami Y., Sano K., Yoshida H., Mitomo H., Sawada S., Ishikawa T., *J Exp Ther Oncol.* 4(1), 25-35 (2004)
- 2) Hagiya Y., Endo Y., Yonemura Y., Takahashi K., Ishizuka M., Abe F., Tanaka T., Okura I., Nakajima M., Ishikawa T., Ogura S., *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 9(3), 204-24 (2012)
- 3) Kitazaki T., Oka M., Nakamura Y., Tsurutani J., Doi S., Yasunaga M., Takemura M., Yabuuchi H., Soda H., Kohno S., *Lung Cancer.* 49(3), 337-43 (2005)
- 4) Nakamura Y., Oka M., Soda H., Shiozawa K., Yoshikawa M., Itoh A., Ikegami Y., Tsurutani J., Nakatomi K., Kitazaki T., Doi S., Yoshida H., Kohno S., *Cancer research.* 65(4), 1541-6 (2005)
- 5) Inoue Y., Ikegami Y., Sano K., Suzuki T., Yoshida H., Nakamura Y., Nakagawa H., Ishikawa T., *Chemotherapy. Chemotherapy.* 59, 260-272 (2014).
- 6) Inoue Y., Ikegami Y., Kajimoto Y., Kuroiwa T., Ishikawa T., *ALA-Porphyrin Science. in press.*