牛, 馬, 鶏における多剤耐性遺伝子の検出と犬乳腺腫瘍 における P-糖タンパク質の免疫組織化学的検索

三好宣彰^{1)†} 安田宣紘¹⁾ 高山健二¹⁾ 亀山和久²⁾ 藤木 誠¹⁾

三角一浩¹⁾ 大石明広¹⁾ 坂本 紘¹⁾ 清水 孜¹⁾

1) 鹿児島大学農学部 (〒890-0065 鹿児島市郡元1-21-24)

2) 亀山動物病院 (〒899-5652 鹿児島県始良郡始良町平松4985-3)

(2001年2月26日受付・2002年3月5日受理)

要 約

ヒトの多剤耐性遺伝子の一つである *MDR1* の cDNA を用いたサザンブロットハイブリダイゼーションを, 牛, 馬, 鶏の正常ゲノム DNA について行い, ヒト *MDR1* と相同性がある関連遺伝子が存在していることを認めた. また, 犬乳腺腫瘍 24 例における *MDR1* の遺伝子産物である P-糖タンパク質に対する免疫組織化学的検索では, ほとんどすべての腫瘍細胞に P-糖タンパク質が発現していた. したがって化学療法感受性が低いとされる犬乳腺腫瘍においては, P-糖タンパク質が関与する多剤耐性機構がその原因の一つと考えられる.

——キーワード: 犬乳腺腫瘍, 多剤耐性, P-糖タンパク質.

----- 日獣会誌 55, 364~366 (2002)

悪性腫瘍の治療法として外科手術に加えて抗癌剤を用いた化学療法や放射線療法を併用することが人医領域では一般的である. しかしながら, 化学療法においては腫瘍細胞の抗癌剤に対する耐性発現が治療の障害となる. この耐性発現機構の一つと考えられているものとして, 多剤耐性遺伝子の一つである *MDR1* がコードする P-糖タンパク質の関与がある. ヒトの P-糖タンパク質は 1280 残基のアミノ酸からなる約 170kD の膜タンパク質であり, 細胞膜に局在する [2]. P-糖タンパク質はさまざまな抗癌剤と結合し, ATP 依存性に抗癌剤を細胞外へ排出する機能を有している. また正常な腎臓, 肝臓, 大腸, 副腎, 血液脳関門部位の血管内皮細胞等, さまざまな組織に発現し, 有害物質や代謝産物の体外排出やステロイドホルモンの細胞外輸送に関与していると考えられている [11-13]. P-糖タンパク質をコードする *MDR1* 遺伝子に相当する遺伝子がヒトや齧歯類だけではなく犬 [10], 猫 [9], 豚 [3] でも単離されている.

本研究では牛, 馬, 鶏の正常ゲノム DNA における *MDR1* 関連遺伝子をサザンブロットハイブリダイゼーションによって検出した. また小動物の腫瘍に対して化学療法を行う際には, 個々の腫瘍における薬剤耐性を考慮する必要があることから, 抗癌剤感受性が低いとされる犬乳腺腫瘍における P-糖タンパク質の発現を免疫組織化学的に検索した.

材 料 お よ び 方 法

MDR1 関連遺伝子の検出: -70℃凍結保存の犬, 猫, 牛, 豚, 馬の正常な精巣各 5 検体, ヒト胎盤 1 検体, 新鮮な鶏末梢血 5 検体から Miyoshi ら [7, 8] の方法に従って正常ゲノム DNA を抽出し, 制限酵素 *EcoR* I^{a)}, *Pst* I^{a)}, *Hind* III^{a)}, *Bam*H I^{a)} で消化し, ヒト *MDR1* の全翻訳領域を含む cDNA をプローブとして low stringency (30% formamide・1M NaCl・1% SDS・5% dextran sulfate 反応液, 37℃, 16 時間) の条件でサザンブロットハイブリダイゼーションを行った. また -70℃で凍結保存した化学療法を受けていない犬乳腺腫瘍 24 例 (腺腫 12 例, 混合腫瘍 9 例, 腺癌 3 例) も同様の方法で検索した.

P-糖タンパク質の免疫組織化学的検索: 上記と同一の犬乳腺腫瘍 24 例を凍結保存前に定法に従い 10% 中性緩衝ホルマリン固定を行い, パラフィン切片を作成し, Vectastain Elite ABC kit^{b)} で免疫染色を行った. 1 次抗体に抗ヒト P-糖タンパク質抗体 (C494^{c)} [4], 150 倍希釈を用いて, 4℃で 1 晩反応させた. なお抗原賦活化のために切片はオートクレーブ処理を行った (10mM クエン酸緩衝液 (pH 6.0), 121℃, 15 分間).

a) 宝酒造, 京都. b) Vector Laboratories, Inc., U.S.A.

c) ダコ・ジャパン, 京都.

† 連絡責任者: 三好宣彰 (鹿児島大学農学部獣医学科家畜病理学教室)

図1 各種動物のゲノムDNAにおけるMDR1遺伝子のサザンブロットハイブリダイゼーション。(左: EcoRI消化, 右: PstI消化, kb: kilobase pairs).

図2 犬の乳腺腫瘍組織におけるP-糖タンパク質の免疫組織化学的染色(ABC法). 腫瘍細胞の細胞膜と細胞質が陽性に染色されている。(右: 腺腫 ×50, 左: 腺癌 ×50)

成 績

各種動物の正常ゲノムDNAにおけるサザンブロットハイブリダイゼーションでは, ヒトMDR1 cDNAと相溶性がある多数のバンドが検索に用いたすべての動物で検出された(図1). 動物種間でバンドの数やサイズ, シグナルの強弱などに差があった. しかし, 同一動物種内での個体差はみられなかった. また犬乳腺腫瘍組織における検索では, 遺伝子増幅やその他のバンドの変化は認められなかった.

犬乳腺腫瘍24検体において, 抗ヒトP-糖タンパク質抗体を用いた免疫組織化学的検索では, 腫瘍形態に関わらず, すべての検体において腺上皮および筋上皮由来腫瘍細胞の細胞膜および細胞質が陽性に染色された(図2). また, 腫瘍組織の周囲に存在した正常な乳腺上皮細胞や筋上皮細胞, 結合織に存在する血管の内皮細胞も陽性であった. 腫瘍細胞と正常な乳腺上皮細胞および筋上皮細胞との染色結果を比較すると, ほとんどすべての細胞が陽性に染色されており, 陽性細胞の頻度における差は特に認められなかった.

考 察

サザンブロットハイブリダイゼーションの結果から,

牛, 馬, 鶏のゲノムDNAにはヒトMDR1に相溶性を有する遺伝子が存在し, この遺伝子は各種動物においてよく保存されていることが示唆される. 豚ではヒトMDR1関連遺伝子が複数単離されており[3], 今回の検索でも各動物におけるMDR1に相溶性を有する関連遺伝子も同時に検出されている可能性がある.

小動物の癌腫は一般的に化学療法に対して感受性が低いとされており, できるかぎり外科的療法により摘出しなければならない. Ginnが報告した犬の腫瘍組織におけるP-糖タンパク質発現についての免疫組織化学的検索では, 癌腫においては非上皮性腫瘍に比べて著しく高い頻度で発現がみられ, P-糖タンパク質の発現が癌腫の化学療法に対する低感受性の原因の一つであることを示唆している[4]. また非上皮性腫瘍においても, 犬骨肉腫細胞株や犬および猫のリンパ腫細胞株において, 抗癌剤耐性獲得にはP-糖タンパク質の発現増強が関与していると報告されている[5, 6, 9]. 本検索ではすべての検体において, オートクレープ前処理による抗原の賦活化により, 乳腺上皮由来腫瘍細胞および筋上皮由来腫瘍細胞のほとんどが陽性を呈しており, 犬の乳腺腫瘍における抗癌剤に対する低感受性はP-糖タンパク質が関与する多剤耐性機構が原因の一つであることが考えられる. ヒト, 犬, 猫の腫瘍においてP-糖タンパク質が発

現することにより、ビンクリスチン、ドキソルビシン(アドリアマイシン)、アクチノマイシンD等の複数の抗癌剤に交差耐性を示すようになると考えられているため[1, 5, 6, 9, 10], 犬乳腺腫瘍に化学療法を行う場合には、抗癌剤の選択に十分な注意が必要である。

引用文献

- [1] Bergman PJ, Ogilvie GK : *Compend Contin Educ*, 17, 549-560 (1995)
- [2] Chen CJ, Chin JE, Ueda K, Clark DP, Pastan I, Gottesman MM, Roninson IB : *Cell*, 47, 381-389 (1986)
- [3] Childs S, Ling V : *Biochim Biophys Acta*, 1307, 205-212 (1996)
- [4] Ginn PE : *Vet Pathol*, 33, 533-541 (1996)
- [5] Lee JJ, Hughes CS, Fine RL, Page RL : *Cancer*, 77, 1892-1898 (1996)
- [6] Mealey KL, Barhoumi R, Rogers K, Kochevar DT : *Cancer Lett*, 126, 187-192 (1998)
- [7] Miyoshi N, Tateyama S, Ogawa K, Nosaka D, Ohashi T, Sunyasootcharee B : *Am J Vet Res*, 52, 940-944 (1991)
- [8] Miyoshi N, Tateyama S, Ogawa K, Yamaguchi R, Kuroda H, Yasuda N, Shimizu T : *Am J Vet Res*, 52, 2046-2049 (1991)
- [9] Okai Y, Nakamura N, Matsushiro H, Kato H, Setoguchi A, Yazawa M, Okuda M, Watari T, Hasegawa A, Tsujimoto H : *Am J Vet Res*, 61, 1122-1127 (2000)
- [10] Steingold SF, Sharp NJ, McGahan MC, Hughes CS, Dunn SE, Page RL : *Anticancer Res*, 18, 393-400 (1998)
- [11] Sugawara I, Kataoka I, Morishita Y, Hamada H, Tsuruo T, Itoyama S, Mori S : *Cancer Res*, 48, 1926-1929 (1988)
- [12] van der Valk P, van Kalken CK, Ketelaars H, Broxterman HJ, Scheffer G, Kuiper CM, Tsuruo T, Lankelma J, Meijer CJLM, Pinedo HM, Scheper RJ : *Ann Oncol*, 1, 56-64 (1990)
- [13] van Kalken CK, Giaccone G, van der Valk P, Kuiper CM, Hadisaputro MMN, Bosma SAA, Scheper RJ, Meijer CJLM, Pinedo HM : *Am J Pathol*, 141, 1063-1072 (1992)

Detection of Multidrug Resistance Gene (*MDR1*) in Bovine, Equine and Avian Genomic DNA and Immunohistochemical Detection of P-glycoprotein in Canine Mammary gland Tumors

Noriaki MIYOSHI^{*†}, Nobuhiro YASUDA, Kenji TAKAYAMA, Kazuhisa KAMEYAMA, Makoto FUJIKI, Kazuhiro MISUMI, Akihiro OISHI, Hiroshi SAKAMOTO and Tsutomu SHIMIZU

^{*} *Department of Veterinary Pathology, Faculty of Agriculture, Kagoshima University, 1-21-24 Korimoto, Kagoshima 890-0065, Japan*

SUMMARY

Bovine, equine, and avian genomic DNA was subjected to Southern blot hybridization using a human multidrug resistance gene (*MDR1*) cDNA probe. *MDR1* related genes were conserved in each species. In most neoplastic cells from 24 canine mammary gland tumors, immunohistochemistry detected P-glycoprotein (P-gp) encoded with *MDR1*. Expression of P-gp may be one of the mechanisms for low sensitivity to chemotherapy in canine mammary gland tumors.

—Key words : canine mammary gland tumors, multidrug resistance, P-glycoprotein.

[†] *Correspondence to : Noriaki MIYOSHI (Department of Veterinary Pathology, Faculty of Agriculture, Kagoshima University) 1-21-24 Korimoto, Kagoshima 890-0065, Japan TEL 099-285-8722 FAX 099-285-6593*

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 55, 364 ~ 366 (2002)