

報告番号	甲 乙 第	号	氏 名	近藤 慎吾
主 論 文 題 名 : ABCB5/Abcb5 発現細胞の薬剤耐性機構に関する研究				
(内容の要旨) 【背景・目的】 ABC (ATP-binding cassette) トランスポーターは、膜貫通領域と ATP 結合領域を持っており、種々の生理物質の輸送に働いている。ABCB1 (P 糖タンパク質) は抗がん剤を輸送することから、ABCB1 の発現量の増大は、細胞内の抗がん剤取り込み量の低下を引き起こす。これは、がん化学療法に対する耐性の獲得に繋がる。 当研究室では、ヒト全長 <i>ABCB5</i> の遺伝子クローニングを行い、その構造を決定した。 <i>ABCB5</i> は、膜貫通領域と ATP 結合領域を二つずつ持ち、ABCB 1 とよく似た構造をしている。ヒト胎児腎細胞株 HEK293 にヒト <i>ABCB5</i> 遺伝子を導入した 293/B5-11、マウス <i>Abcb5</i> 遺伝子を導入した 293/mb5-8 は、分子量約 140 kDa の <i>ABCB5/Abcb5</i> を発現する。 <i>ABCB5</i> 発現細胞は、docetaxel や paclitaxel などの抗がん剤の細胞内取り込み量が低下しており、これにより耐性を示していると考えられる。 メタボローム解析により、 <i>ABCB5</i> 発現細胞は、HEK293 と比較して、細胞内のグルタチオン (GSH) と Cys 含量が低下していた。グルタチオンは、Cys、Glu と Gly の 3 つのアミノ酸から構成されている。 <i>ABCB5/Abcb5</i> 発現細胞は、グルタチオン合成の律速酵素である glutamate-cysteine ligase (GCL) の阻害剤 Buthionine sulfoximine (BSO) に対して耐性を示すことが明らかとなっている。BSO は GCL の阻害により細胞内のグルタチオン (GSH) 含量を低下させる薬剤である。本研究は、 <i>ABCB5/Abcb5</i> 発現細胞の BSO に対する薬剤耐性機構の解明を目的とした。 【方法】 <u>細胞増殖阻害試験</u> 薬剤を各細胞に 5 日間処理した後、コールターカウンターにより細胞数を測定した。 <u>Western Blotting</u> <i>ABCB5/Abcb5</i> 、Glutaminase (GLS)、STAT1、Phospho-STAT1 (Tyr701)、GAPDH の蛋白質の発現を確認した。 <u>BSO の細胞内取り込み、排出実験</u> 各細胞を BSO 500 μ M で処理した後、新しい medium 中で再度培養した。外液の洗浄後に細胞				

ペレットを EtOH 抽出した。6-Aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC) (Waters) で細胞内の BSO を誘導体化した後、HPLC で測定をした。

細胞内 GSH 含量の測定とアミノ酸含量の測定

細胞内 GSH は、(1) 細胞の MeOH 抽出液を AQC で誘導体化した後、HPLC で定量した。(2) グルタチオンアッセイキット (Cayman Chemical) を用いて定量した。アミノ酸含量は、4-Fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-F) (DOJINDO) で誘導体化した後、HPLC により定量した。非誘導体化条件でのアミノ酸含量は、LC/MS/MS により定量した。

細胞内と細胞膜ベシクルへの GSH 取り込み実験

細胞に ^3H -GSH 1 nM を 37 °C で取り込ませて、GSH 取り込み量を測定した。細胞膜ベシクル 25 µg に ATP 3 mM 存在下、非存在下で ^3H -GSH 66 nM を 25 °C で取り込ませて、ベシクルへの GSH 取り込み量を測定した。

mRNA 発現量の測定

全 mRNA は SurePrint G3 Human GE 8 × 60K cDNA Microarray を用いた。mRNA 発現量は、RT-PCR、Real-time PCR により測定した。

【結果】

ABCB5 発現細胞の BSO 耐性と細胞内グルタチオン含量の上昇

過去のデータとして得られている ABCB5 発現細胞の BSO 耐性と細胞内グルタチオン含量減少の確認から行なった。ヒト ABCB5 の発現量が高い 293/B5-126 と 293/B5-11 は、293/mock と比較して BSO に対してそれぞれ 4.6 倍と 6.5 倍の耐性を示し、ABCB5 の発現量が低い 293/B5-104 と 293/B5-118 は、それぞれ 1.4 倍と 1.7 倍の耐性を示した。BSO のブチル基がメチル基へと置換された Methionine sulfoximine (MSO) に対して、293/B5-11 と 293/mb5-8 は、293/mock と比較してそれぞれ 3.0 倍と 4.5 倍の耐性を示した。細胞内のグルタチオン含量は、HPLC とグルタチオンアッセイキットを用いて定量した。AQC 試薬で GSH を誘導体化した後、HPLC でピークを分離して定量した。293/B5-11 と 293/mb5-8 のグルタチオン含量は、293/mock の含量よりも 1.4 倍高いことが示された。グルタチオンアッセイキットによる測定でも ABCB5/Abcb5 発現細胞でのグルタチオン含量は増大していた。これらの結果は、メタボローム解析の結果とは異なるものであった。

ABCB5/Abcb5 発現細胞の BSO 取り込みと排出

BSO の耐性機構として、ABCB5 が BSO を輸送外へ輸送していることが考えられたため、ABCB5/Abcb5 発現細胞の細胞内への BSO の取り込み量と排出量を測定した。AQC 試薬で BSO を誘導体化した後、HPLC により細胞内の BSO 量を測定した。293/mock の HPLC クロマトグラムでは、14 min 付近に background となるピークはなく、BSO を取り込ませると 14.3 min に BSO ピークが検出できた。293/B5-11 と 293/mb5-8 の BSO 取り込み量は、293/mock と比較して同程度であった。また、BSO の排出に関しても検討をしたが、293/B5-11 と 293/mb5-8 の BSO 排出能は、

293/mock と同程度であった。これらの結果より、ABCB5/Abcb5 発現細胞の BSO 耐性機構は、細胞内の薬剤取り込み量の低下によってもたらされるものではないことが示された。

ABCB5/Abcb5 発現細胞での BSO によるグルタチオン含量の減少の抑制

BSO 48 h 処理により細胞内のグルタチオン含量は、BSO の濃度依存的に低下した。グルタチオンに対する BSO の効果は、293/mock と比較して 293/B5-11 と 293/mb5-8 で抑制されていた。また、BSO 処理後に枯渇した細胞内グルタチオン含量の再上昇についても検討を行ったところ、293/B5-11 と 293/mb5-8 のグルタチオン上昇率は 293/mock よりも高かった。これらの結果が BSO 耐性の原因であると考えられる。

ABCB5/Abcb5 発現細胞の Glu 含量の増大

グルタチオン含量の増大には、ABCB5 によるグルタチオンの取り込み上昇と細胞内グルタチオンの代謝変動が起きていることが考えられたため、ABCB5 によるグルタチオンの輸送と代謝酵素の発現量について検討をした。ABCB5 は GSH の輸送に関与しないことが示された。Microarray data の解析から、ABCB5/Abcb5 発現細胞では、Gln から Glu へと代謝する酵素である GLS の発現上昇が起きていたが、それ以外の代謝酵素の発現量に変化はなかった。HPLC と LC/MS/MS によるアミノ酸含量の測定結果より、ABCB5/Abcb5 発現細胞では、293/mock と比較して Glu 含量が増大していた。一方、Gly と Cys の含量は、同程度であった。

ABCB5/Abcb5 発現細胞の STAT1 の発現増大と BSO に対する薬剤耐性

GLS の発現上昇の機構を明らかにするために、microarray data から GLS の発現に関係する遺伝子を検索した。ABCB5/Abcb5 発現細胞では、*STAT1* の発現量が増大しており、STAT1 が GLS の発現をコントロールする論文が報告されていた。ABCB5/Abcb5 の発現量が高い 293/B5-126、293/B5-11、293/mb5-8 は STAT1 の発現が増大していたが、低発現細胞株では、293/mock と同程度であった。*STAT1* 遺伝子導入細胞は、293/mock と比較して、BSO と MSO に対して耐性を示した。これらの結果より、STAT1 の発現増大は BSO 耐性をもたらすことが示された。

【結論】

ABCB5/Abcb5 発現細胞の BSO 耐性は、BSO による細胞内グルタチオン含量の減少が抑制されていることに加えて、BSO により枯渇したグルタチオン含量の上昇率が高いことによって起こっていると考えられる。また、これらの原因として STAT1 の関与が示唆された。

【主論文に関する原著論文】

Kondo S, Hongama K, Hanaya K, Yoshida R, Kawanobe T, Katayama K, Noguchi K, Sugimoto Y. Upregulation of cellular glutathione levels in human *ABCB5*- and murine *Abcb5*-transfected cells. BMC Pharmacol Toxicol. 2015 Dec 15;16:37.