

氏名	こんどう しんご 近藤 慎吾
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	博士甲第 4622 号
学位授与の日付	平成 29 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	ABCB5/Abcb5 発現細胞の薬剤耐性機構に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 杉本 芳一 (薬学博士) (副査) 教授 長谷 耕二 (博士(薬学)) 准教授 齋藤 義正 (博士(医学))

論文内容の要旨

【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、膜貫通領域と ATP 結合領域を二つずつ持つ分子量約 170 kDa の細胞膜糖タンパク質である。ABCB1 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 *ABCB5* の遺伝子クローニングを行い、その構造を決定した。*ABCB5* は、膜貫通領域と ATP 結合領域を二つずつ持ち、*ABCB1* とよく似た構造をしている。*ABCB5* mRNA は、Prostate や Testis などの組織に発現がある。ヒト胎児腎細胞株 HEK293 にヒト *ABCB5* 遺伝子を導入した 293/B5-11 は、分子量約 140 kDa の *ABCB5* を発現する。*ABCB5* 発現細胞は、docetaxel や paclitaxel などの抗がん剤に耐性を示す。薬物取り込み実験から、*ABCB5* 発現細胞は docetaxel と paclitaxel の細胞内取り込み量が低下している。この結果から、*ABCB5* 発現細胞の抗がん剤耐性機構は、薬物の細胞内取り込み量が低下していることによるものだと考えられる。

HEK293 にマウス *Abcb5* 遺伝子を導入した 293/mb5-8 は、分子量約 140 kDa のマウス *Abcb5* を発現する。293/mb5-8 は、docetaxel に対して耐性を示す。この結果から、マウス *Abcb5* は、ヒト *ABCB5* と同様に薬剤耐性の機能を持つことが考えられる。

当研究室でのさらなる *ABCB5* の研究から、*ABCB5/Abcb5* 発現細胞は、glutamate-cysteine ligase (GCL) の阻害剤である Buthionine sulfoximine (BSO) に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、*ABCB5/Abcb5* 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】

細胞株

HEK293 に empty vector を導入した 293/mock、ヒト *ABCB5* 遺伝子を導入した 293/B5-104、293/B5-118、293/B5-126、293/B5-11、マウス *Abcb5* 遺伝子を導入した 293/mb5-8、*Signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1)* 遺伝子を導入した 293/STAT1-mix を使用した。

細胞増殖阻害試験

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。薬剤未処理の細胞数を 100%として、50%増殖阻害濃度 (IC50) と耐性度を算出した。

Western Blotting

ABCB5/Abcb5 は anti-c-Myc antibody clone 9E10 (Millipore)、Glutaminase (GLS) は anti-glutaminase antibody EP7212 (Abcam)、STAT1 は anti-STAT1 antibody #9172 (Cell Signaling Technology)、Phospho-STAT1 は p-STAT1 (Tyr701) (58D6) antibody (Cell Signaling Technology)、Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) は、anti-GAPDH antibody clone 6C5 (Millipore) の各種抗体を用いて、蛋白質の発現を確認した。

BSO の細胞内取り込み、排出実験

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) 試薬 (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

各細胞を 500 万個で播種して接着させた後、新しい medium 中で再度 4 h 培養して、細胞ペレットを MeOH 抽出した。細胞内 GSH は 2 種類の方法で測定をした。(1) GSH を AQC 試薬で誘導体化した後、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、Intrada Amino Acid カラム (Imtakt) を用いて、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 100 万個に ^3H -GSH 1 nM を 37 $^{\circ}\text{C}$ で取り込ませた。洗浄後に、 ^3H 量から細胞内への 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 $^{\circ}\text{C}$ で取り込ませた。洗浄後に、 ^3H 量からベシクルへの 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 \times 60K cDNA Microarray により解析した。グルタチオン代謝酵素と STAT1 関連蛋白質の mRNA 発現量は、RT-PCR、Real-time

PCRにより測定した。

【結果】

ABCB5/Abcb5 発現細胞の BSO に対する薬剤耐性

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。

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 の取り込み量と排出量は、AQC 試薬で BSO を誘導体化した後、HPLC により測定した。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 の細胞内の 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 発現細胞のグルタチオン含量の増大

BSO 耐性機構が ABCB5 による細胞外への輸送ではないことが示唆されたため、BSO の効果について着目をした。BSO は、グルタチオン代謝の律速酵素をターゲットとすることから、ABCB5/Abcb5 がグルタチオン含量に対して影響を与えていることが考えられた。そのために、BSO とターゲットが同じである Methionine sulfoximine (MSO) の細胞増殖阻害試験について検討をし、細胞内のグルタチオン含量についても測定した。

293/B5-11 と 293/mb5-8 は、293/mock と比較して GCL 阻害剤の MSO に対してそれぞれ 3.0 倍と 4.5 倍の耐性を示した。

HPLC での測定により、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。また、グルタチオンアッセイキットを用いた細胞内グルタチオン含量の測定では、HPLC と同様に含量の増大が確認できた。

次に、ABCB5/Abcb5 発現細胞での BSO の効果を検討した。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が、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。これらの結果より、ABCB5/Abcb5 発現細胞の BSO 耐性は、細胞内のグルタチオン含量が増大していることと、BSO による細胞内のグルタチオン含量の低下が抑制されていて、なおかつ 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るものであると考えられる。

ABCB5/Abcb5 発現細胞の Glu 含量の増大

グルタチオン含量が増大している機構には、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。

$^3\text{H-GSH}$ を細胞内に取り込ませて、その取り込み量を液体シンチレーションカウンターで測定したが、細胞内への $^3\text{H-GSH}$ の取り込みは検出できなかった。細胞膜ベシクルを用いた取り込み実験を行ったが、293/B5-11 と 293/mock 細胞膜ベシクル間で ATP の存在下と非存在下共に $^3\text{H-GSH}$ の取り込み量に差はなかった。このことから、ABCB5 は GSH の輸送に関与しないことが示された。

GSH とその構成アミノ酸 (Glu、Cys、Gly) の代謝酵素の発現量を Microarray data から解析した。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。ABCB5/Abcb5 発現細胞での GLS の遺伝子発現量と蛋白質発現量の増大は、Real-time PCR と Western Blotting から観察できた。

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 細胞と比較して Glu 含量が増大していることが示された。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 発現細胞での STAT1 遺伝子の発現増大を Real-time PCR から確認した。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ることを Western Blotting により確認した。一方、ABCB5 の発現量の低い 293/B5-104、293/B5-118 の STAT1 発現量は、293/mock と同程度であった。また、IFN- α による STAT1 のリン酸化レベルは、ABCB5/Abcb5 発現細胞で増大していた。

ABCB5/Abcb5 発現細胞での STAT1 の発現増大と BSO 耐性の関係について明らかにするために、STAT1 遺伝子導入細胞 293/STAT1-mix を作製して、GLS の発現量、Glu 含量、BSO の細胞増殖阻害試験について検討をした。

293/STAT1-mix は、293/mock と比較して GLS 発現量の増大と細胞内 Glu 含量の増大が起きていた。

293/STAT1-mix は、293/mock と比較して、BSO と MSO に対してそれぞれ 4.1 倍と 3.7 倍の耐性を示した。この結果より、ABCB5 がどのようにして STAT1 発現の上昇を引き起こしているのかについてはさらなる研究が必要であるが、STAT1 の発現増大は BSO 耐性をもたらすことが示された。

【考察】

細胞内のグルタチオンレベルの増大は、酸化ストレスからの細胞の保護及び細胞外からの毒物に対する抵抗性の獲得に関与すると考えられる。また、シグナル伝達に関与する蛋白質である STAT1 の発現増大は、増殖因子に対する応答性の増大から、細胞の生存シグナルと薬剤耐性に関与する遺伝子群の発現変化に働くことが考えられる。これらことから、ABCB5 は STAT1 の発現増大の誘導や、細胞内のアミノ酸やグルタチオン含量に影響し、細胞の生存や増殖に関与すると考えられる。

近年では、幹細胞マーカー陽性のマウスメラノーマ細胞に発現する 140 kDa の *Abcb5* の抑制により、抗がん剤の感受性を増大させたことや、腫瘍増殖能を抑制したとの報告がある。ABCB5 の薬剤耐性の制御と生理機能の解明は、がんの増殖や抗がん剤耐性の克服に基づいたがん治療法の開発に繋がると考えられる。

【結論】

ABCB5/*Abcb5* 発現細胞の BSO 耐性は、(1) 細胞内グルタチオン含量が増大していること、(2) 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、これら二つの機構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。

論文審査結果の要旨

ABCB5 は、膜貫通領域と ATP 結合領域を二つずつ持ち、ABCB1 (P 糖タンパク質) とよく似た構造をしている。ヒト胎児腎細胞株 HEK293 にヒト *ABCB5* 遺伝子、マウス *Abcb5* 遺伝子を導入して作成した ABCB5/*Abcb5* 発現細胞は、docetaxel、paclitaxel などの抗がん剤に耐性を示す。これに加えて、ABCB5/*Abcb5* 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。申請者は、ABCB5/*Abcb5* 発現細胞の BSO 耐性の機構の解明を目的として研究を行った。

ABCB5 発現細胞の BSO 耐性は、ABCB5 の発現量と相関していた。ABCB5/*Abcb5* 発現細胞は、BSO の類縁体である Methionine sulfoximine (MSO) にも耐性を示した。ABCB5/*Abcb5* 発現細胞の BSO の取り込み量と排出量は、293/mock 細胞と同程度であり、これらの細胞の BSO 耐性は BSO の細胞内蓄積の低下によるものではないことが示された。

ABCB5/*Abcb5* 発現細胞では、細胞内のグルタチオン含量が 293/mock 細胞より高かった。細胞を BSO で処理すると、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が、ABCB5/*Abcb5* 発現細胞におけるグルタチオン含量の低下の程度は、293/mock 細胞より軽度であった。また、ABCB5/*Abcb5* 発現細胞では、BSO 処理後のグルタチオン含量の回復が速やかであった。以上より、ABCB5/*Abcb5* 発現細胞では、

BSO の細胞内グルタチオンに対する効果が減弱していることが示された。

細胞膜 vesicle を用いたグルタチオンの輸送実験では、ABCB5/Abcb5 発現細胞と 293/mock 細胞のグルタチオン輸送能は同程度であり、ABCB5/Abcb5 はグルタチオンの輸送に関与しないことが示唆された。ABCB5/Abcb5 発現細胞では、Glu 合成酵素である glutaminase (GLS) の発現が上昇していた。グルタチオンおよびその前駆体アミノ酸の代謝に関するその他の酵素の発現には変化は認められなかった。ABCB5/Abcb5 発現細胞では、293/mock 細胞と比較して細胞内の Glu 含量が増大していた。

以上より、ABCB5/Abcb5 発現細胞では、細胞内のグルタチオンと Glu の含量が増大し、BSO の細胞内グルタチオンに対する効果が減弱していることが示された。また、これらの原因として STAT1 の関与が示唆された。

申請者の研究は、細胞内グルタチオン代謝および STAT1 のシグナル伝達系と、ABC トランスポーターの生理機能を結びつける新しい概念を提供するものであり、ABC トランスポーターによる幹細胞の保護機能の解明などにもつながる重要な成果であると評価できる。

申請者は、事前の試問、発表会でのフロアーからの質問に対しても、丁寧かつ的確に答えており、本研究及びその関連領域に対する知識と理解は、ほぼ満足できるものであった。今後は、薬学領域全般について研究を続け、さらに活躍されることを期待したい。

以上より、申請者は博士（薬学）の学位に十分値するものと評価された。

論文目録

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 16: 37.