

博士論文 平成 28 (2016) 年度

ABCB5/Abcb5 発現細胞の  
薬剤耐性機構に関する研究

慶應義塾大学大学院薬学研究科

近藤 慎吾

## 論文内容の要約

### 【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、種々の生体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 細胞にヒト *ABCB5* 遺伝子を導入した 293/B5-11 細胞は、分子量約 140 kDa の *ABCB5* を発現する。*ABCB5* 発現細胞は、親株の HEK293 細胞と比較して 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* 発現細胞では docetaxel と paclitaxel の細胞内取り込み量が低下していた。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。

メタボローム解析により、*ABCB5* 発現細胞は、HEK293 細胞と比較して、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。グルタチオン合成の律速酵素である glutamate-cysteine ligase (GCL) を阻害する buthionine sulfoximine (BSO) は、細胞内のグルタチオン含量を低下させる。ヒト *ABCB5* 発現細胞は、BSO に対して耐性を示した。HEK293 細胞にマウス *Abcb5* 遺伝子を導入した 293/mb5-8 細胞は、分子量約 140 kDa のマウス *Abcb5* を発現する。マウス *Abcb5* 発現細胞は、ヒト *ABCB5* 発現細胞と同様に、BSO に対して耐性を示した。本研究は、*ABCB5/Abcb5* 発現細胞の BSO に対する薬剤耐性機構を解明することを目的とした。

### 【方法】

細胞株

HEK293 細胞に empty vector を導入した 293/mock 細胞、ヒト *ABCB5* 遺伝子を導入した 293/B5-104、293/B5-118、293/B5-126、293/B5-11 細胞、マウス *Abcb5* 遺伝子を導入した 293/mb5-8 細胞、*Signal transducer and activator of transcription 1* (*STAT1*) 遺伝子を導入した 293/STAT1-mixture 細胞とクローニングを行なった 293/STAT1-13、293/STAT1-18、293/STAT1-22 細胞を使用した。

#### 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 ( $IC_{50}$ ) と耐性を算出した。

#### 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  $\mu$ M で処理した後、新しい medium 中で再度培養した。外液を PBS で洗浄後、細胞ペレットをエタノールで抽出した。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、細胞ペレットをメタノールで抽出した。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  $^3$ H-GSH 1 nM を 37 °C で取り込ませた。洗浄後に、 $^3$ H 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  $\mu$ g に ATP 3 mM 存

在下、非存在下で  $^3\text{H}$ -GSH 66 nM を 25 °C で取り込ませた。洗浄後に、 $^3\text{H}$  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 × 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 発現細胞の BSO 耐性と細胞内グルタチオン含量の上昇

本研究を始めるにあたり、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。BSO 耐性の確認は、数種類のヒト ABCB5 発現細胞の BSO 耐性と BSO の構造類縁体に対する耐性について検討した。

ヒト ABCB5 の発現量が高い 293/B5-126 と 293/B5-11 細胞は、293/mock 細胞と比較して 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 細胞は、それぞれ 1.4 倍と 1.7 倍の耐性を示した。BSO の耐性度と ABCB5 の発現量には、正の相関が見られた。

BSO のブチル基がメチル基へと置換された Methionine sulfoximine (MSO) は、BSO と同様に GCL を阻害して、細胞内のグルタチオン含量を低下させる。293/B5-11 と 293/m5-8 細胞は、293/mock 細胞と比較して MSO に対してそれぞれ 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。GSH のピークは、20 min に検出できた。293/B5-11 と 293/m5-8 細胞のグルタチオン含量は、293/mock 細胞の含量よりも 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による細胞内グルタチオン含量の測定では、ABCB5/Abcb5 発現細胞でのグルタチオン含量が増大していた。これらの結果は、先に得られていた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 細胞の 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 細胞の BSO 取り込み量は、293/mock 細胞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 細胞の BSO 排出能は、293/mock 細胞と同程度であった。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 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 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 細胞と比較して 293/B5-11 と 293/mb5-8 細胞で抑制されていた。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 細胞のグルタチオン上昇率は 293/mock 細胞よりも高かった。これらの結果より、ABCB5/Abcb5 発現細胞の BSO 耐性は、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ることと、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。

<sup>3</sup>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 <sup>3</sup>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 <sup>3</sup>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 Glutaminase (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。Real-time PCR と Western Blotting による解析から、ABCB5/Abcb5 発現細胞の GLS の遺伝子発現量と蛋白質発現量は、増大していた。

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、論文と 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。Real-time PCR により、ABCB5/Abcb5 発現細胞は、*STAT1* の mRNA 発現量が増大していた。Western Blotting により、ABCB5/Abcb5 の発現量が高い 293/B5-126、293/B5-11、293/mb5-8 細胞は、ABCB5 の発現量の低い 293/B5-104、293/B5-118 細胞や 293/mock 細胞と比較して、STAT1 の発現量が増大していた。また、IFN- $\alpha$  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。しかし、恒常的な STAT1 のリン酸化の上昇は見られなかった。

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* 遺伝子導入細胞を作製して、BSO 耐性、GLS の発現量と Glu 含量について検討をした。293/STAT1-13、293/STAT1-18、293/STAT1-22 細胞は、293/mock 細胞と比較して、BSO に対してそれぞれ 3.2 倍、4.6 倍、3.5 倍の耐性を示し、MSO に対して 5.8 倍、5.2 倍、5.5 倍の耐性を示した。293/STAT1-13、293/STAT1-18、293/STAT1-22 細胞は、293/mock 細胞と比較して GLS の mRNA と蛋白質の発現量が増大していた。293/STAT1-mixture 細胞は、293/mock 細胞と比較して、細胞内 Glu 含量の増大が起きていた。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。

#### **【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。これらのことから、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) 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 (2) 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。

## 論文目録

#### 【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.