

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16251

研究課題名(和文) 抗癌剤耐性トランスポーターABCB1の薬剤排出メカニズムの解明

研究課題名(英文) Identification of critical residues in the drug-binding pocket of ABCB1

研究代表者

村上 恵 (Murakami, Megumi)

東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：60817378

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ABCB1は癌細胞に過剰発現するトランスポーターであり、ABCB1は抗癌剤を細胞内から細胞外へ排出することで、多剤耐性の一因となっている。しかし、その輸送に関する詳細なメカニズムは現在までに明らかになっていない。本研究では、ABCB1の基質結合部位の重要な4つのアミノ酸(F728/F978/Y310/Y953)に注目し、そのアミノ酸の変異がトランスポート機能に与える影響について解析した。結果、4つ全てを変異させた場合、ABCB1のトランスポート機能は抑制された。このことから、これら4つのアミノ酸がABCB1トランスポート機能の解明に重要であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ABCB1は癌細胞に過剰発現するトランスポーターであり、抗癌剤を細胞内から細胞外に排出することで抗癌剤耐性を生じる。よってABCB1に対する抑制剤を開発することができれば、抗癌剤の感受性を高めることができ、癌細胞の抗癌剤耐性を克服できると考えられる。しかし現在までにABCB1による薬剤排出機構の詳細は不明である。抑制剤開発のためには、ABCB1がどのように薬物を認識し排出するか、そのメカニズムを明らかにする必要がある。本研究ではABCB1の薬物結合部位の4つのアミノ酸を変異させることにより、薬剤の排出を抑制することが可能となった。このことは薬剤排出機構の解明にあたって重要な一歩と考えられた。

研究成果の概要(英文)：P-glycoprotein (P-gp) is an efflux pump that transports cytotoxic agents, thereby disturbing the pharmacokinetics of many drugs and conferring resistance to chemotherapeutic agents in many cancers. However, the nature and number of translocation pathways for the transport of substrate-drugs in P-gp is not yet known. Recently, we found that Tyrosine-Phenylalanine structural motifs which consist of four residues located in the drug-binding pocket of P-gp are critical for the inhibition of basal ATP hydrolysis by high-affinity modulators such as zosuquidar, tariquidar and elacridar. Interestingly, the substitution of these four residues with alanine (Y310A/F728A/Y953A/F978A) in a single mutant, when expressed to similar levels as wild type protein in HeLa cells, resulted in a complete loss of transport of ten different fluorescent substrates.

研究分野：消化器外科

キーワード：ABCトランスポーター

## 1. 研究開始当初の背景

進行・再発消化器癌患者における抗癌剤療法は、効果的である一方、しばしば癌細胞における抗癌剤耐性が生じ治療継続の妨げになることが問題である。その原因の一つに癌細胞における多剤耐性 ABC (ATP binding cassette) トランスポーターの過剰発現があげられる。ABC トランスポーターは、癌細胞膜に先天的あるいは後天的に過剰発現し、ATP 加水分解のエネルギーを用いて抗癌剤を細胞内から細胞外に排出することで抗癌剤耐性を生じさせる。ABC トランスポーターに対する効果的抑制剤を開発することができれば、抗癌剤の感受性を高めることができ、癌細胞の抗癌剤耐性を克服できると考えられてきた。48 種類存在するヒト ABC トランスポーターのうち、抗癌剤耐性に関与する主なものとして ABCB1、ABCG2、ABCC1 などが知られている。その中で、ABCB1 に対して、これまで数多くの抑制剤の開発が試みられ、臨床試験で検討されたが、有効性、安全性の面からこれまでに臨床応用に至ったものはない。また、ABCB1 による薬剤排出機構の詳細は不明であり、効果的抑制剤開発のためには、ABCB1 がどのように基質を認識し、基質を排出するか、薬剤排出メカニズムの解明が必須である。

ABCB1 には、ATP が結合する ATP 結合部位、基質が結合する基質結合部位が存在する。既報の多くの抑制剤は、ABCB1 の基質結合部位に作用し、ATPase 活性を促進させる特徴がある一方で、ATPase 活性を阻害する薬剤も存在し、ABCB1 の基質結合部位には複数の基質認識部位があると考えられている。ATPase 活性を促進させる薬剤は、ABCB1 の基質として排出されるが、ATPase 活性を抑制する薬剤は、細胞外へ排出されず ABCB1 の抑制剤として理想的である。これまでの研究で基質結合部位に存在するフェニルアラニン(F)-チロシン(Y)が、ATPase 活性の抑制に関与していることが予測されたため、本研究の対象となった。

## 2. 研究の目的

ABCB1の基質結合部位の4つのアミノ酸 (F728/F978/Y310/Y953) に注目し、そのアミノ酸の変異がトランスポート機能に与える影響について解析することを目的とした。

## 3. 研究の方法

F978、F728、Y953、Y310 をそれぞれアラニン (A) に変異させた ABCB1、野生型 ABCB1 を baculovirus により HeLa 細胞に発現させ、以下の実験に用いる。

- Transportアッセイ：変異ABCB1発現HeLa細胞において、抑制剤が、基質である蛍光薬剤 (Rhodamine123など)の排出を抑制するかどうかフローサイトメトリで解析する。
- ATPaseアッセイ：ABCB1の基質はATPase活性を促進する。抑制剤が変異ABCB1のATPase活性を促進すれば、抑制剤は、変異ABCB1の基質結合部位に作用していることを示唆する。
- IAAPアッセイ：ABCB1の基質であるプラゾシンのアナログ、 $[^{125}\text{I}]$ iodoarylazidoprazosin (IAAP)はABCB1の基質結合部位を標識できる。抑制剤が変異ABCB1のIAAP標識を抑制するかどうか確認することで、抑制剤が変異ABCB1の基質結合部位に結合 (競合) するかどうかを証明できる。

#### 4. 研究成果

まず、4つのアミノ酸全てを変異させた変異株（以下SM変異と示す）を作成し、ABCB1の蛍光基質のトランスポートアッセイを行った（図1A）。野生型ABCB1（以下WTと示す、図1A、水色）では蛍光基質がABCB1のトランスポート機能によって排出されるため、ABCB1が発現していない通常のHeLa細胞（図1A、赤）より細胞内の蛍光強度（Fluorescence intensity）は低下する。SM変異において（図1A、紫）蛍光強度は通常のHeLa細胞と同等の値を示したことから、SM変異によってABCB1のトランスポート機能が抑制されることが判明した。また、2つのフェニルアラニンの変異（F728/F978: 以下FF変異と示す、図1B、灰）の場合でも同等の結果が得られた。このことから、4つのアミノ酸全ての変異、少なくとも2つのフェニルアラニンの変異がABCB1のトランスポート機能に影響をもたらすことが明らかとなった。

続いて、これら2種の変異がATPase活性に与える影響を調べるため、ATPaseアッセイを行った（図2）。本来、WTは基質によってATPase活性が促進されるが（図2、黒）、SMまたはFF変異においては基質によるATPase活性の促進は認められなかった。また、SM、FF変異の基質結合部位を評価するために放射性を持つABCB1の基質であるIAAPを用いてIAAP結合アッセイを行った。その結果、IAAPはWTと同等にSMとFF変異の基質結合部位に結合することが判明した。よって、SM、FFというアミノ酸の変異によってABCB1の基質結合部位への基質の結合は影響を受けないが、これらの変異がABCB1のATP加水分解に影響を及ぼすことが考えられた。

以上より、SM、FF変異はABCB1のATP加水分解に変化を与えることで、トランスポート機能を抑制することが示唆された。

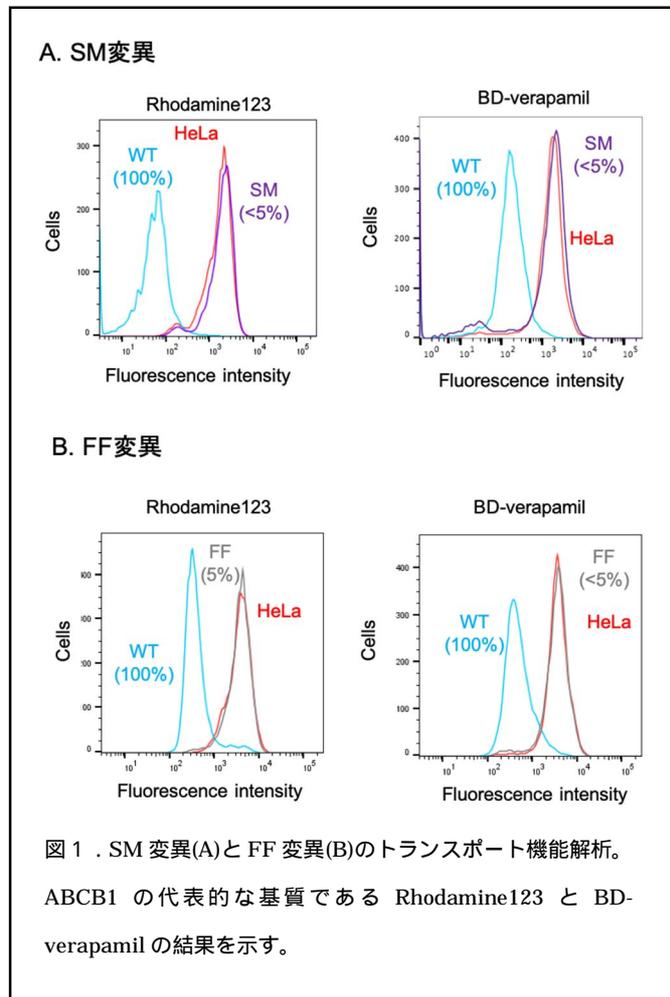


図1. SM変異(A)とFF変異(B)のトランスポート機能解析。ABCB1の代表的な基質であるRhodamine123とBD-verapamilの結果を示す。

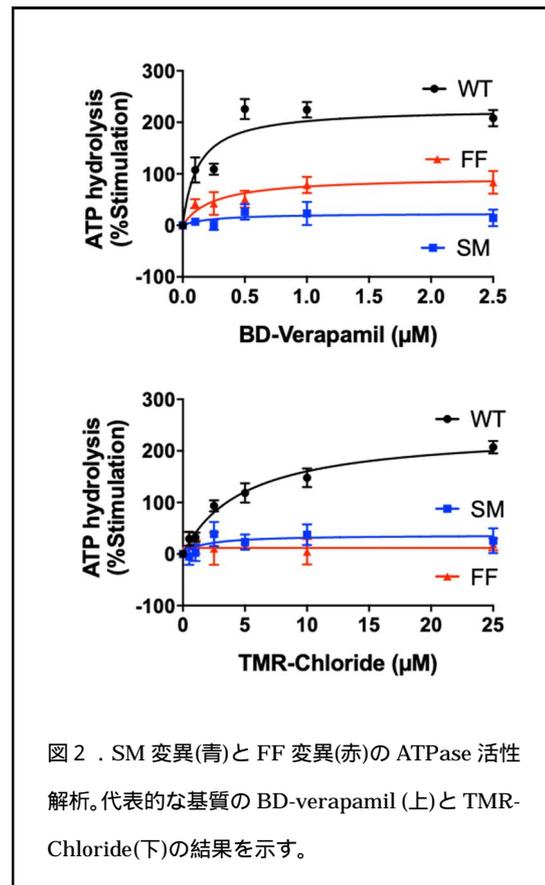


図2. SM変異(青)とFF変異(赤)のATPase活性解析。代表的な基質のBD-verapamil(上)とTMR-Chloride(下)の結果を示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------