

令和 5 年 5 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07199

研究課題名(和文) リソソーム膜タンパク質LAPTM4 による多剤耐性獲得機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism of multidrug resistance acquisition by lysosomal membrane protein LAPTM4b

研究代表者

廣田 有子(Hirota, Yuko)

九州大学・薬学研究院・助教

研究者番号：50588259

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、リソソーム膜タンパク質LAPTM4 が抗がん剤耐性に寄与するかについて細胞生物学的アプローチにより検討を行なった。まず、LAPTM4 がリソソームへ正しく輸送されるためにはトランスゴルジネットワークにおいて、アダプタータンパク質Eps15と相互作用する必要があることを明らかにした。また、LAPTM4 過剰発現時には、抗がん剤の一種ドキシソルビシンの核内への取り込みが低下したこと、P-糖タンパク質阻害剤であるベラパミル併用時にはその影響が相殺されたことから、LAPTM4 がドキシソルビシン取り込みに抑制的に関与し、その機構はP-糖タンパク質と共役してい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

抗がん剤に対する多剤耐性獲得は、がん治療の妨げとなり長年問題視されてきた。耐性獲得のメカニズムとして、細胞外へ抗がん剤を積極的に排出するP-糖タンパク質などが知られているが、このシステムに依存しない薬剤耐性が存在している。その耐性獲得の要因として、物質分解を担うリソソーム内への抗がん剤の隔離が示唆されている。そこで、本研究によりリソソーム膜タンパク質LAPTM4 が抗がん剤の排出を正に制御している可能性を示すことができた。今後は、LAPTM4 を新たな多剤耐性機構のコア因子として位置づけ、抗がん剤耐性に対する治療に既存の方法とは異なるアプローチが可能である。

研究成果の概要(英文)：In this study, I investigated whether the lysosomal membrane protein LAPTM4 contributes to anticancer drug resistance. First, I found that LAPTM4 must interact with the adapter protein Eps15 in the trans-Golgi network to be correctly transported to the lysosome. In addition, the nuclear uptake of doxorubicin, an anticancer drug, was decreased in cells overexpressed LAPTM4, but this effect was counteracted when those cells were treated with verapamil, a P-glycoprotein inhibitor. This suggests that LAPTM4 plays an inhibitory role in doxorubicin uptake and that the mechanism is covalent with P-glycoprotein.

研究分野：細胞生物学

キーワード：リソソーム 膜タンパク質 抗がん剤

1. 研究開始当初の背景

がん治療において、治療中に投与歴の有無にかかわらず、作用機構や構造が異なる抗がん剤に対して耐性になる、多剤耐性獲得の存在が知られている。多剤耐性のメカニズムとして、P-糖タンパク質 (P-gp) や Multidrug resistance-associated protein (MRP) が過剰に発現し、抗がん剤を細胞外へ排出することが明らかにされている (図 1)。これまで、P-gp や MRP が関与する薬剤耐性機構について多くの研究が進められてきた一方、生体高分子の分解機能の中核をなすリソソーム内へ抗がん剤が隔離されるという現象が観察されていた。この現象は、新たな薬剤耐性能獲得の機構を示唆する知見にも関わらず、その詳細については未解明のままである。

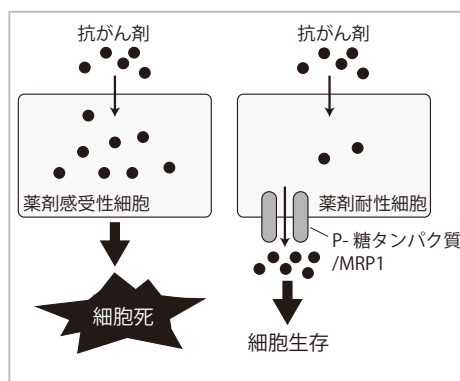


図 1. 既存の多剤耐性獲得機構

Mouse transporter protein はエンドソーム・リソソーム膜に局在し、酵母の薬物感受性株に発現させると P-gp や MRP と同様の多剤耐性を示すことが過去の研究で報告されている。研究代表者は、そのヒトホモログであるリソソーム膜タンパク質 LPTM4 α (lysosomal-associated protein transmembrane 4 α) が実際にヒト細胞で同様の機能を発揮しているかについて研究を行ってきた。その結果、LPTM4 α が抗がん剤曝露時の細胞生存率を回復させることを示唆する結果を得ている (未発表、論文投稿中) が、その影響が極めて限定的であったことからその機能を相補する分子として、LPTM4 のもうひとつのサブファミリーである LPTM4 β に着目している。

LPTM4 β は様々な種類のがん (肝細胞がん、乳がん、胃がん、肺がん、大腸がん、胆嚢がんなど) に高発現していること、その発現レベルがリンパ節等への転移に正に相関すること、反対に LPTM4 β の発現を抑制すると化学療法に対する感受性が増すことが断片的に示唆されているが、LPTM4 β の細胞内輸送や局在との関連を含めて、包括的な解明には至っていない。

2. 研究の目的

本研究では以下の 3 点を目的として実験を行う。(図 2 を参照)

- (1) LPTM4 β の細胞内輸送メカニズムの解明: MALDI-TOF-MS から同定した LPTM4 β と相互作用する因子が如何にして、その細胞内輸送に関与するかを明らかにする。
- (2) LPTM4 β の生理機能の解明: LPTM4 β が薬剤耐性をどのようにして誘発するか、細胞膜に局在する LPTM4 β 変異体が薬剤耐性に寄与するか、またがん転移への関与について明らかにする。

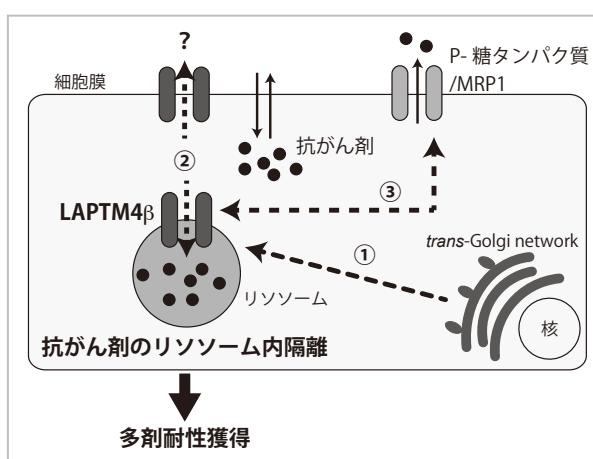


図 2. LPTM4 β による多剤耐性獲得機構

- (3) 薬剤に対する詳細な基質特異性の解析ならびに P-糖タンパク質および MRP を介した既存の耐性システムへの関与の解明: 薬剤に対しての特異性を明らかにする、P-gp や MRP と LPTM4 β の関連の有無について明らかにする。

3. 研究の方法

本研究は以下に示す方法で遂行した。

- (1) Eps15およびEps15関連因子との相互作用が直接的あるいは間接的に他の因子を介した結合なのか、免疫沈降やプルダウンアッセイ等の解析を行なった。
- (2) siRNAを用いてEps15の発現を抑制させた際、LAPTM4βのリソソームへの局在に影響するか検討した。また、LAPTM4βは多種のがん細胞に高発現していることから、その発現量と局在に相関があるかについて種々のがん細胞を用いて検討を行なった。
- (3) LAPTM4βのユビキチン化がEps15との結合に必須であるか、LAPTM4βユビキチン不能変異体を発現させた細胞あるいは精製タンパク質を用いて、プルダウンアッセイ等で検討した。
- (4) 多くの抗がん剤 (doxorubicin等) は蛍光物質であることを利用し、LAPTM4βの局在が抗がん剤の取り込みに影響するかについて共焦点レーザー顕微鏡で観察、またフローサイトメトリーによって定量した。
- (5) P-gpの阻害剤で前処理し、抗がん剤のリソソーム内隔離に対する効果を解析することで、LAPTM4βがこれら既知の排出システムとは異なる分子機構により薬物輸送ポンプとして機能しているか否かを明らかにした。

4. 研究成果

- (1) LAPTM4βが Eps15 およびその関連因子 X と相互作用することは精製タンパク質 LAPTM4βをベイトとして HeLa 細胞抽出液を用いたプルダウンアッセイならびに MALDI-TOF-MS 解析により明らかにしていた。そこで次に、その相互作用について COS-1 細胞ならびに HeLa 細胞に共発現させ免疫沈降およびプルダウンアッセイにより検討した。その結果、タンパク質同士の直接的な相互作用かについて明らかにすることはできなかったものの、Eps15 と LAPTM4β の相互作用がその関連因子 X と LAPTM4βとの相互作用に必須であったことから、Eps15 が LAPTM4βとその関連因子 X が結合する際のアダプターとして機能することを明らかにした。
- (2) HeLa 細胞にて Eps15 特異的な siRNA を導入し、Eps15 の発現を抑制させると、LAPTM4βの局在がリソソームではなく、*trans*-Golgi network (TGN)に繫留されていることが明らかとなった。また、関連因子 X をノックダウンした場合には LAPTM4βは TGN から発出することができるもののエンドソームの近傍に留まっていた。(1) の結果と合わせて、LAPTM4βの TGN からエンドソーム・リソソームへの輸送は Eps15 および関連因子 X が必要であり、TGN からの輸送の上流として Eps15 が関与することが明らかとなった。
- (3) LAPTM4βのユビキチン化は HECT 型 E3 ユビキチンリガーゼ Itch によるものであることは先行研究により明らかにしていたため、Itch のユビキチン化活性不能変異体を発現させ、LAPTM4βのユビキチン化が Eps15 との相互作用に必須か否かについて検討を行なった。この際、関連因子 X は Itch によりユビキチン化されることが明らかとなり、さらに X のユビキチン化が Eps15 との結合に必須であったことから、LAPTM4βのユビキチン化が Eps15 との結合に必要なか直接的に言及することはできなかった。しかしながら、これらタンパク質の正常なユビキチン化が LAPTM4βの TGN からのソーティングに必要であることが示唆された。
- (4) ドキソルビシン (DOX) は 1967 年に発見された最も代表的な抗がん剤の一つで、核内の DNA にインターカレーションすることで、がん細胞の増殖を抑制し、死滅させることを目的として汎用されている。また、ドキソルビシンの最大径は 1.5nm であり、細胞内に取り込まれると核内孔の直径とされる 30~40 nm よりも小さいため、ドキソルビシンは核膜孔を通して、核内に入り込み、核内の DNA に架橋して核内に蓄積すると考えられる。ドキソルビシンは

励起波長 470nm・発光波長 595nm の自家蛍光を有しており、本研究では励起波長 555nm、蛍光波長 595nm で検出を行なった。まずヒト結腸がん由来 Caco-2 細胞に LAPTМ4 β 、さらにその他の LAPTМ ファミリータンパク質である LAPTМ4 α 、LAPTМ5 を発現させた際に、核内のドキシソルビシン量が継時的にどのように変化するのかについて検討した。Caco-2 細胞に GFP-LAPTМ4 α 、GFP-LAPTМ4 β 、GFP-LAPTМ5 を発現させ、24 時間培養後に、10 μ M のドキシソルビシンで処理をし、固定ならびに DAPI 染色を行なった。ドキシソルビシン処理時間は 3 時間、6 時間、12 時間、24 時間、36 時間の 5 つに設定し、核内のドキシソルビシン量の経時変化を共焦点レーザー顕微鏡により観察した。その結果、ドキシソルビシン処理時間が 3 時間から 12 時間の間では、コントロール細胞 (GFP 発現細胞) と各 LAPTМ ファミリータンパク質発現細胞のいずれにおいても、継時的な核内ドキシソルビシン量の増加が認められ、それらの間にドキシソルビシン蛍光強度の有意な増減は見られなかった。しかしながら、ドキシソルビシン処理 24 時間後あるいは 36 時間後においては、コントロール細胞では継時的な核内ドキシソルビシン量の増加ならびにプラトー状態が見られたのに対し、各 LAPTМ ファミリータンパク質発現細胞では、核内ドキシソルビシン蛍光強度がコントロール細胞ならびに 12 時間処理時の同細胞と比較して有意に減少した (図 3)。この結果より、Caco-2 細胞に発現した LAPTМ4 β を含む各 LAPTМ ファミリータンパク質は、ドキシソルビシン処理後 24 時間以降に、核内のドキシソルビシン量を減少させることが示唆された。

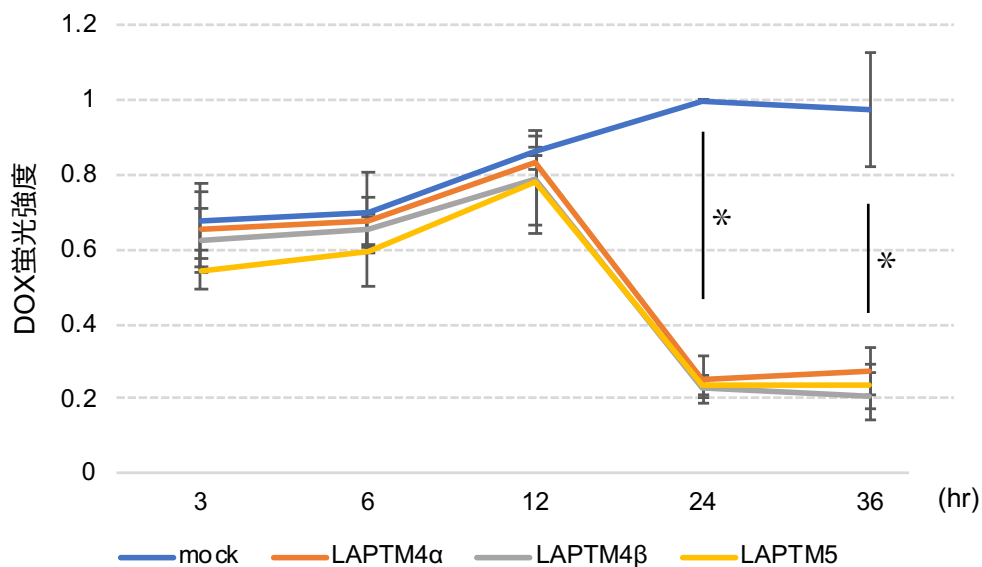


図 3. Caco-2 細胞における各 LAPTМ ファミリータンパク質発現時の核内ドキシソルビシン蛍光強度の解析

- (5) 各 LAPTМ ファミリータンパク質を発現した Caco-2 細胞を P-gp 阻害剤のベラパミルで処理した際の、核内ドキシソルビシン蛍光強度の変化を解析した。Caco-2 細胞に GFP-LAPTМ4 α 、GFP-LAPTМ4 β 、GFP-LAPTМ5 を発現させ、24 時間培養後に 10 μ M ドキシソルビシンと 25 μ M のベラパミルを同時に処理し、固定および DAPI 染色後に、共焦点レーザー顕微鏡により観察した。その結果、コントロール細胞 (mock 細胞) では、ベラパミル併用時には核内ドキシソルビシン量が非併用時と比較して 1.2 倍程度増加していた (図 4)。これは、ドキシソルビシン 24 時間処理時にも一定量のドキシソルビシンが P-gp によって細胞外へ排出されていることを示唆している。一方で、各 LAPTМ ファミリータンパク質発現時には、第一項の結果と同様、コントロール細胞と比較して核内ドキシソルビシン量が減少していたが、ベラパミル併用時にはコントロール細胞と同程度まで回復していた (図 4)。すなわち、LAPTМ ファミリータ

ンパク質発現による細胞内ドキソルビシン量の減少は P-gp あるいは P-gp と同様のメカニズムによるものであると示唆される。この結果から、LAPTM ファミリータンパク質がドキソルビシンを核内から放出させるはたらきは、P-gp と共役した機序によるものであることが示唆された。

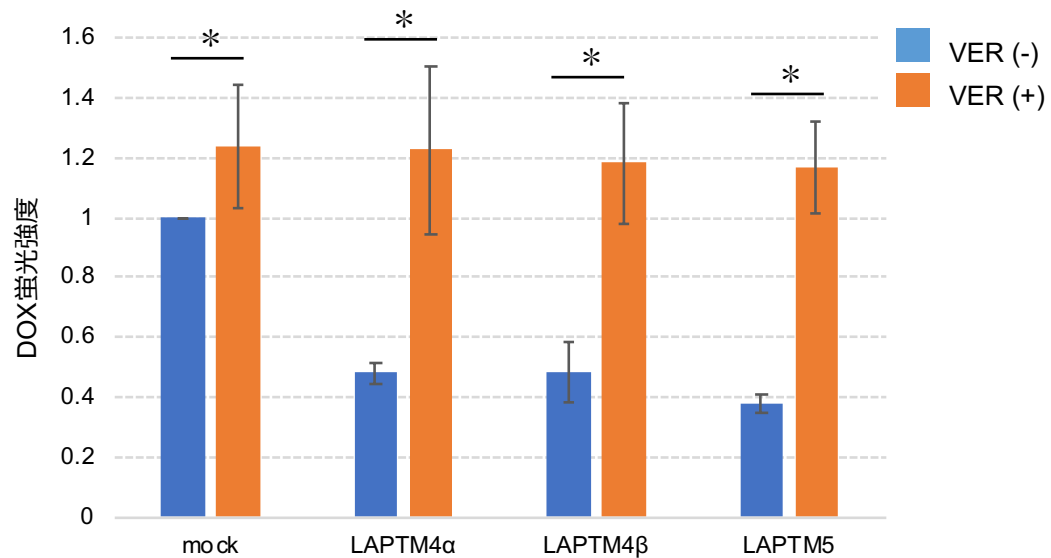


図4. ベラパミル処理時の核内ドキソルビシン濃度の解析

上記の結果には示していないが、Caco-2 細胞に比べ P-gp の発現量が少ない HeLa 細胞では各 LAPTM ファミリータンパク質の発現による核内ドキソルビシン量の減少が観察されなかった。これらの結果から、各 LAPTM ファミリータンパク質は、P-gp の発現量に共役する機序で、ドキソルビシンを核から放出させる可能性が示唆される。実際、LAPTM4βが P-gp との共局在化や相互作用を通じて、ドキソルビシンなどの抗がん剤の細胞外への排出を促進している可能性も示唆されている。このことから、いずれの LAPTM ファミリータンパク質も細胞膜上の P-gp との相互作用などにより、がん細胞の薬剤耐性に関与している可能性が考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hirota Yuko, Hayashi Masaharu, Miyauchi Yuu, Ishii Yuji, Tanaka Yoshitaka, Fujimoto Keiko	4. 巻 556
2. 論文標題 LAPTM4 is targeted from the Golgi to late endosomes/lysosomes in a manner dependent on the E3 ubiquitin ligase Nedd4-1 and ESCRT proteins	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 9~15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.03.151	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Chen Hong-bin, Pineda Garcia Jorge Carlos, Arizono Shinako, Takeda Tomoki, Li Ren-shi, Hattori Yukiko, Sano Hiroe, Miyauchi Yuu, Hirota Yuko, Tanaka Yoshitaka, Ishii Yuji	4. 巻 11
2. 論文標題 DAPL1 is a novel regulator of testosterone production in Leydig cells of mouse testis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 18532
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-97961-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fujimoto Keiko, Uchida Shotaro, Amen Riham N.S., Ishii Yuji, Tanaka Yoshitaka, Hirota Yuko	4. 巻 524
2. 論文標題 Lysosomal integral membrane protein LGP85 (LIMP-2) is ubiquitinated at the N-terminal cytoplasmic domain	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 424~430
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.01.095	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fujimoto Keiko, Nakashima Sanae, Uchida Shotaro, Amen Riham N.S., Ishii Yuji, Hirota Yuko, Tanaka Yoshitaka	4. 巻 23
2. 論文標題 HM1.24/BST-2 is constitutively poly-ubiquitinated at the N-terminal amino acid in the cytoplasmic domain	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 100784~100784
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2020.100784	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miyachi Yuu, Kurohara Ken, Kimura Akane, Esaki Madoka, Fujimoto Keiko, Hirota Yuko, Takechi Shinji, Mackenzie Peter I., Ishii Yuji, Tanaka Yoshitaka	4. 巻 35
2. 論文標題 The carboxyl-terminal di-lysine motif is essential for catalytic activity of UDP-glucuronosyltransferase 1A9	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Drug Metabolism and Pharmacokinetics	6. 最初と最後の頁 466 ~ 474
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dmpk.2020.07.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 河野 祐輔、藤本 景子、石井 祐次、田中 嘉孝、廣田 有子
2. 発表標題 ESCRTタンパク質Hrsによるリソソーム膜タンパク質LAPTM4 の細胞内輸送制御機構
3. 学会等名 第73回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮内 優、木村 茜、江崎 円香、藤本 景子、廣田 有子、武知 進士、石井 祐次、田中 嘉孝
2. 発表標題 新規シトクロムP450 3A4 発現系の構築:パキユロウイルスを用いた COS-1細胞における過剰発現
3. 学会等名 日本薬学会 第141年回
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 津森 良士、河野 祐輔、藤本 景子、石井 祐次、田中 嘉孝、廣田 有子
2. 発表標題 ESCRT関連因子Al ixによるLAPTM4 のエンドソーム内部小胞への選別輸送機構
3. 学会等名 第74回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2022年

〔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
---------	---------