

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月26日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21590168

研究課題名（和文）：抗癌剤で誘導されるヴォールトの発現亢進機序と抗癌剤耐性機構の解明
 研究課題名（英文）：Molecular basis for the induction of vaults by anti-cancer agents, and the role of vaults in resistance to anti-cancer agents.

研究代表者：山田 勝士 (Yamada Katsushi)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員

研究者番号：00037491

研究成果の概要（和文）：Vault は RNA タンパク質複合体で、その発現量と多剤耐性癌細胞における治療抵抗性との相関が指摘されているが、vault 自体の機能については未だ不明な点が多い。これまでに、vault の構成成分である major vault protein (MVP) は、DNA 傷害性抗癌剤により発現が亢進することが報告されている。本研究は、抗癌剤処理下での MVP の発現亢進機序およびその機能について検討を行うことを目的とした。ヒト大腸癌細胞株 SW-620 における MVP mRNA と MVP タンパク質の発現はアドリマイシン (ADM) により誘導された。また、ADM により、MVP プロモーター活性が約 2 倍上昇した。さらに、ADM によって誘導される MVP の発現は Sp1 を knockdown することにより抑制された。MVP が抗癌剤耐性に関与することが考えられたので、knockdown 株を作製し、抗癌剤感受性試験を行ったところ、MVP 発現株は MVP knockdown 株に比べ、ADM に耐性を示した。さらに、ADM 処理下における Caspase 8 および Caspase 3 の活性化について解析したところ、MVP 発現株では、MVP knockdown 株に比べ、ADM で誘導される Caspase 8 および Caspase 3 の活性化が抑制されていた。癌細胞は MVP の発現を亢進することにより、抗癌剤によって誘導されるアポトーシスを回避し、vault が癌の抗癌剤耐性化に重要な役割を担っている可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The major vault protein (MVP) is the main constituent of the vault ribonucleoprotein particle. Although the role in multidrug resistance has been suggested, the physiological function of vaults remains unclear. It has been reported that MVP levels were elevated after treatment with the DNA-damaging agents such as adriamycin (ADR). The aim of this study was to investigate molecular basis for the induction of MVP by ADM, and to investigate the potential role of MVP in drug resistance. Expression levels of both MVP protein and MVP mRNA were increased by ADM. ADM could also enhance MVP promoter activity. Introduction of siRNA against Sp-1 in SW620 cells attenuated the expression of MVP induced by ADM. Down-regulation of MVP expression by MVP RNAi in SW620 cells increased the sensitivity of the cells to ADM. Furthermore, ADM enhanced the activation of caspase 3 and caspase 8 in the MVP knock-down cells, but not in control cells. Our data demonstrate that exposure of cancer cells to DNA-damaging agents induces MVP that might have an important role in the resistance to chemotherapeutic agents.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合 計
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
総 計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：Vaults, 抗がん剤耐性, apoptosis, caspase, adriamycin, major vault protein, Sp-1

1. 研究開始当初の背景

Vault は RNA タンパク質複合体で、その発現量と多剤耐性癌細胞における治療抵抗性との相関が指摘されている。この複合体は、major vault protein (MVP)、telomerase-associated protein 1 (TEP1) および vault poly (ADP-ribose) polymerase (VPARP) の 3 種類のタンパク質と 1 種類の RNA 分子から構成されているが、vault 自体の機能については未だ不明な点が多い。これまでに、MVP は、アドリアマイシン (ADM) やエトポシドなどの DNA 傷害性薬剤により発現が亢進することが報告されている。

2. 研究の目的

本研究は、MVP の発現および機能と抗癌剤ストレスとの間に何らかの関係があるのではないかと考え、抗癌剤処理下での MVP の発現亢進機序およびその機能について検討を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

ヒト大腸癌細胞株 SW-620 を ADM で処理し、イムノブロット法および RT-PCR 法、real time PCR 法を用いて MVP 発現量を調べた。MVP プロモーター活性の変化はルシフェラーゼアッセイにより解析した。MVP 発現を制御する転写因子の同定は標的転写因子特異的な siRNA を用いてその転写因子の発現を抑制した後、ADM で処理し、イムノブロット法により MVP 発現量の変化を調べた。さらに、ADM 存在下での MVP の機能について検討するため、SW-620 細胞の MVP knockdown 株およびコントロール株を使用した。これらの細胞を ADM で処理し、MTT アッセイにより生存率を比較した。ま

た、イムノブロット法を用いて、ADM 処理細胞におけるアポトーシスシグナルについて調べた。

4. 研究成果

ヒト大腸癌細胞株 SW-620 における MVP mRNA と MVP タンパク質の発現は ADM により誘導された (図 1A, B, 2A, B)。また、ADM により、約 2 倍の MVP プロモーター活性の上昇が認められた (図 3)。さらに、ADM によって誘導される MVP の発現は Sp1 を knockdown することにより抑制されたが、Stat1 を抑制しても影響はなかった (図 4)。

MVP が抗癌剤耐性に関与する可能性が期待されたので、MVP を knockdown した細胞株を作製し、抗癌剤感受性試験 (MTT アッセイ) を行った。MVP 発現株は、MVP 非発現株比べ、ADM 存在下での生存率が高かった (テーブル 1)。さらに、イムノブロット法により ADM 処理下における Caspase 8 および Caspase 3 の活性化について解析したところ、MVP 発現株では、MVP 非発現株より Caspase 8 および Caspase 3 の活性化が抑制されていた (図 6)。

MVP のプロモーター領域には、Y box、MyoD、GATA、E box、Sp1、p53 および Stat の 7 個の転写因子結合モチーフが確認されており、今回の研究で、ADM によって誘導される MVP は、Sp1 によりその発現が制御され、Caspase の活性化経路を抑制することでアポトーシスに対して癌細胞に抵抗性を賦与すると考えられる。

細胞は MVP の発現を亢進することにより、抗癌剤によって誘導されるアポトーシスを回避している可能性があり vault は、癌の抗癌剤耐性化に重要な役割を担っていることが示唆された。

テーブル1 (SW-620細胞:親細胞、MVP knockdown 細胞、コントロール細胞におけるADM感受性の比較)

Drug	Drug sensitivity [IC ₅₀ (nM)]		
	SW-620 cells	MVP knockdown cells	Control cells
ADM	203.0 ± 52.76	111.5 ± 18.80	285.6 ± 74.42
	NS		

Statistical significance was determined by ANOVA (* P<0.05 mean±SD)

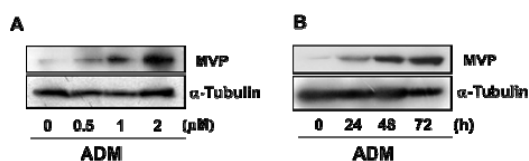


図1 (ADM)によるMVPの発現誘導

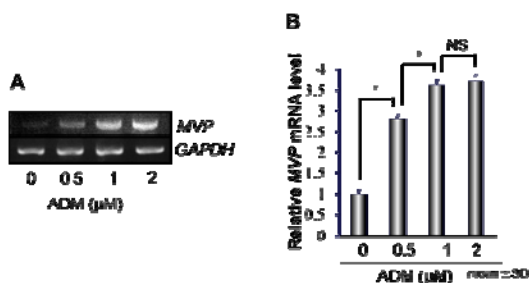


図2 (ADM)によるMVP mRNAの発現誘導

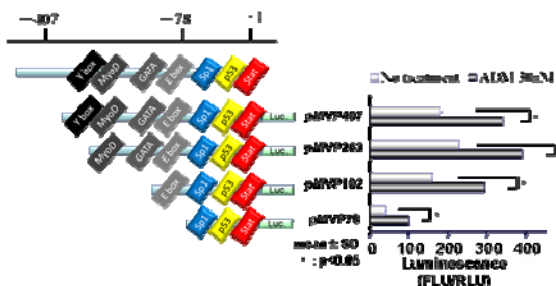


図3 (ADM)によるMVP プロモーター活性の上昇

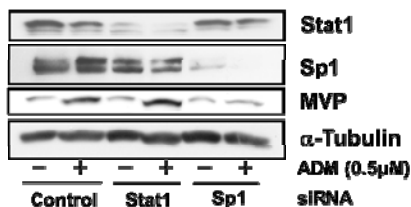


図4 (Stat1およびSp1 knockdownがADMによって誘導されるMVP発現に及ぼす影響について)

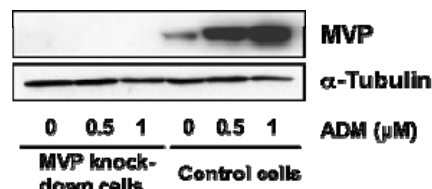


図5 (MVP knockdown細胞およびコントロール細胞におけるMVP発現)

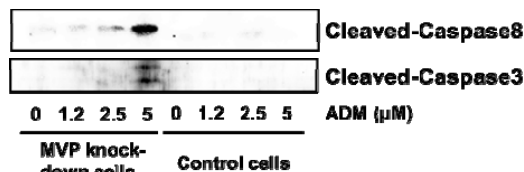


図6 (ADMによって誘導されるアポトーシスへのMVPの影響)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 18 件)

(1) Tabata, S., Ikeda, R., Yamamoto, M., Furukawa, T., Kuramoto, T., Takeda, Y., Yamada, K., Haraguchi, M., Nishioka, Y., Sone, S., Akiyama, S., Thymidine phosphorylase activity is involved in augmented reactive oxygen species and interleukin-8 production in human cancer cells, *Oncology Reports*, 2012, in press. (査読有)

(2) Miyawaki, A., Hijioka, H., Ikeda, R., Ishida, T., Nozoe, E., Nakamura, N., Analysis of the outcome of concurrent neoadjuvant chemoradiotherapy with S-1 compared to super-selective intra-arterial infusion for oral squamous cell carcinoma, *Oncology letters*, 2012, in press. (査読有)

(3) Shigemi, A., Matsumoto, K., Ikawa, K., Yaji, K., Shimodozono, Y., Morikawa, N., Takeda, Y., Yamada, K., Safety analysis of liposomal amphotericin B in adult patients: anaemia, thrombocytopenia, nephrotoxicity, hepatotoxicity and hypokalaemia, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 38, 417-420, 2011. (査読有)

(4) Shibayama, Y., Iwashita, Y., Yoshikawa, Y., Kondo, T., Ikeda, R., Takeda, Y., Osada, T., Sugawara, M., Yamada, K., Iseki, K., Effect of 5-fluorouracil treatment on SN-38 absorption from intestine in rats,

Biological and Pharmaceutical Bulletin, 34, 1418-1425, 2011. (査読有)

(5) Shibayama, Y., Nakano, K., Maeda, H., Taguchi, M., Ikeda, R., Sugawara, M., Iseki, K., Takeda, Y., Yamada, K., Multidrug resistance protein 2 implicates anticancer drug-resistance to sorafenib, Biological and Pharmaceutical Bulletin, 34, 433-435, 2011. (査読有)

(6) Ikeda, R., Vermeulen, L. C., Lau, E., Jiang, Z., Sachidanandam, K., Yamada, K., Kolesar, J. M., Isolation and Characterization of Gemcitabine-resistant in Human Non-small Cell Lung Cancer A549 cells, International Journal of Oncology, 38, 513-519, 2011. (査読有)

(7) Ikeda, R., Vermeulen, L. C., Lau, E., Jiang, Z., Kavanaugh, S. M., Yamada, K., Kolesar, J. M., Isolation and Characterization of Erlotinib-resistant in Human Non-small Cell Lung Cancer A549 cells, Oncology Letters, 2, 91-94, 2011. (査読有)

(8) Takumi, S., Komatsu, M., Furukawa, T., Ikeda, R., Sumizawa, T., Akenaga, H., Maeda, Y., Aoyama, K., Arizono, K., Ando, S., Takeuchi T., p53 Plays an Important Role in Cell Fate Determination after Exposure to Microcystin-LR, Environmental Health Perspectives, 118, 1292-1298, 2010. (査読有)

(9) Miyawaki, A., Ikeda, R., Hijioka, H., Ishida, T., Ushiyama, M., Nozoe, E., Nakamura, N., SUVmax of FDG-PET correlates with the effects of neoadjuvant chemoradiotherapy for oral squamous cell carcinoma, Oncology Reports, 23, 1205-1212, 2010. (査読有)

(10) Ushiyama, M., Ikeda, R., Yoshida, M., Mori, K., Kangawa, K., Sugawara, H., Inoue, K., Yamada, K., and Miyata, A., Alternative Splicing of the Pituitary Adenylate Cyclase-activating Polypeptide (PACAP) Receptor Contributes to Function of PACAP-27, Journal of Molecular Neuroscience, 42, 341-348, 2010. (査読有)

(11) Ikeda, R., Vermeulen, L. C., Jiang, Z., Lau, E. and Kolesar, J. M., Gemcitabine and Paclitaxel Repress the Production of Vascular Endothelial Growth Factor Induced by Deferoxamine in Human

Non-small Cell Lung Cancer A549 cells, Experimental and Therapeutic Medicine, 1, 853-857, 2010. (査読有)

(12) Ikeda, R., Vermeulen, L. C., Lau, E., Jiang, Z., Pomplun, M. and Kolesar, J. M., Establishment and Characterization of Irinotecan-resistant Human Non-small Cell Lung Cancer A549 cells, Molecular Medicine Reports, 6, 1031-1034, 2010. (査読有)

(13) Matsushita, S., Ikeda, R., Nishizawa, Y., Che, X. F., Furukawa, T., Miyadera, K., Tabata, S., Ushiyama, M., Tajitsu, Y., Yamamoto, M., Takeda, Y., Minami, K., Mataka, H., Kanzaki, T., Yamada, K., Kanekura, T., Akiyama, S., The role of thymidine phosphorylase in the induction of early growth response protein-1 and thrombospondin-1 by 5-fluorouracil in human cancer carcinoma cells, International Journal of Oncology, 36, 1193-1200, 2010. (査読有)

(14) Iwashita, K., Ikeda, R., Takeda, Y., Sumizawa, T., Furukawa, T., Yamaguchi, T., Akiyama, S., Yamada, K., Major vault protein forms complexes with hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and reduces HIF-1 α level in ACHN human renal adenocarcinoma cells, Cancer Science, 101, 920-926, 2010. (査読有)

(15) Shigemi, A., Matsumoto, K., Yaji, K., Shimodouzo, Y., Takeda, Y., Miyanohara, H., Kawamura, H., Orita, M., Tokuda, K., Nishi, J., Yamada, K., Correlation between meropenem and doripenem use density and the incidence of carbapenem-resistant Pseudomonas aeruginosa, International Journal of Antimicrobial Agents, 34, 589-591, 2009. (査読有)

(16) Ushiyama, M., Ikeda, R., Yamaguchi, H., Miyawaki, A., Nitta, T., Yamaguchi, T., Matsumoto, K., Shimodouzo, Y., Furukawa, T., Akiyama, S., Nakamura N., Yamada, K., Adverse effects of superselective intra-arterial infusion chemotherapy in patients with oral cancer, Journal of Applied Therapeutic Research, 7, 58-64, 2009. (査読有)

(17) Ushiyama, M., Ikeda, R., Nitta, T., Tajitsu, Y., Miyawaki, A., Nishizawa, Y., Yamaguchi, T., Yamaguchi, H., Akatsuka,

C., Shimodouzo, Y., Ushinohama, K., Sugawara, H., Sugihara, K., Nakamura, N., Takeda, Y., Yamada, K., Stability of hospital preparations of Azunol Water Gargles for pain relief in oral cancer patients with oral mucositis, *Cancer Therapy*, 7, 277-281, 2009. (査読有)

(18) Ayukawa, O., Nakamura, K., Kariyazono, H., Ikeda, R., Arima, J., Shinkawa, T., Iwase, H., Sakata, R., Yamada, K., Enhanced platelet responsiveness due to chilling and its relation to CD40 ligand level and platelet-leukocyte aggregate formation, *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, 20, 176-184, 2009. (査読有)

〔学会発表〕(計 16 件)

(1) Ikeda, R., Tajitsu, Y., Nishizawa, Y., Tabata, S., Ushiyama, M., Furukawa, T., Akiyama, S., Yamada, K., Takeda, Y., Hyperosmotic stress up-regulates the expression of major vault protein in SW620 human colon cancer cells, 5th Young Investigators Symposium on Clinical Pharmaceutical Sciences, 2011 年 11 月 27 日, 名古屋大学医学部附属病院 (名古屋市)

(2) 西澤由紀彦、池田龍二、田畑祥、田實裕介、俣木博徳、古川龍彦、牛山美奈、山口辰哉、山本雅達、松下茂人、秋山伸一、山田勝土、武田泰生、チミジンホスホリラーゼ発現腫瘍での 5-fluorouracil (5-FU) による thrombospondin-1 (TSP-1) 発現誘導、第 64 回日本薬理学会西南部会、2011 年 11 月 20 日、KKR ホテル博多 (福岡市)

(3) 田實裕介、池田龍二、田畑祥、西澤由紀彦、山口辰哉、牛山美奈、山本雅達、古川龍彦、秋山伸一、山田勝土、武田泰生、高浸透圧による major vault protein (MVP) 発現制御における Sp1 の役割、第 64 回日本薬理学会西南部会、2011 年 11 月 20 日、KKR ホテル博多 (福岡市)

(4) 池田龍二、武田泰生、山田勝土、抗がん剤耐性機序の解明に向けて、第 5 回日本緩和医療薬学会年会、2011 年 9 月 24 日、幕張メッセ (千葉市)

(5) 池田龍二、武田泰生、牛山美奈、山口辰哉、下堂蘭権洋、山田勝土、現場の薬剤師が実践している研究活動と 6 年制薬学生への期待 - 抗がん剤耐性機序の解明に向けて -、第 27 回日本薬学会九州支部大会、2010 年 12

月 12 日、長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 (長崎市)

(6) 新塘麻奈、松元一明、池田龍二、牛山美奈、横山雄太、武田泰生、石神純也、前村公成、有上貴明、夏越祥次、山田勝土、5-fluorouracil の血中濃度および遺伝子診断に基づいた投与量に関する検討、第 27 回日本薬学会九州支部大会、2010 年 12 月 11 日、長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 (長崎市)

(7) 田口深雪、柴山良彦、池田龍二、武田泰生、山田勝土、抗がん剤耐性細胞におけるマイクロ RNA の発現とその役割、第 27 回日本薬学会九州支部大会、2010 年 12 月 11 日、長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 (長崎市)

(8) 俣木博徳、池田龍二、田畑祥、田實裕介、西澤由紀彦、南謙太郎、山口辰哉、牛山美奈、山本雅達、武田泰生、秋山伸一、山田勝土、抗癌剤によって誘導される major vault protein (MVP) の発現亢進機序の解明、第 63 回日本薬理学会西南部会、2010 年 11 月 26 日、鹿児島県民交流センター (鹿児島市)

(9) 池田龍二、ゲムシタビン耐性非小細胞肺癌細胞の耐性化機構、第 4 回日本緩和医療薬学会年会、2010 年 9 月 26 日、鹿児島市民文化ホール (鹿児島市)

(10) 田口深雪、柴山良彦、池田龍二、武田泰生、山田勝土、抗がん剤耐性細胞における miRNA126 の発現とその役割、第 26 回日本薬学会九州支部大会、2009 年 12 月 13 日、九州大学大学院薬学研究院 (福岡市)

(11) 南謙太郎、古川龍彦、新里能成、車暁芳、山本雅達、池田龍二、武田泰生、秋山伸一、山田勝土、Gemcitabine 耐性細胞での nucleoside transporter と ribonucleotide reductase の変化、第 26 回日本薬学会九州支部大会、2009 年 12 月 12 日、九州大学大学院薬学研究院 (福岡市)

(12) 西澤由紀彦、池田龍二、田實裕介、俣木博徳、武田泰生、古川龍彦、牛山美奈、山口辰哉、車暁芳、山本雅達、松下茂人、秋山伸一、山田勝土、チミジンホスホリラーゼ発現腫瘍での 5-fluorouracil (5-FU) による early growth response factor-1 (EGR-1) 発現誘導、第 26 回日本薬学会九州支部大会、2009 年 12 月 12 日、九州大学大学院薬学研究院 (福岡市)

(13) 益田将吾、二川俊隆、西田健太郎、田畑祥、藤井寛樹、武田泰生、山田勝土、神経接

着分子コンタクトを介した癌浸潤・転移のメカニズム、第62回日本薬理学会西南部会、2009年11月27日、リジェール松山（松山市）

(14) 田實裕介、池田龍二、岩下健一、田畑祥、西澤由紀彦、山口辰哉、牛山美奈、山本雅達、車暁芳、古川龍彦、武田泰生、秋山伸一、山田勝土、高浸透圧によって誘導される major vault protein (MVP) の発現亢進機構の解明、第62回日本薬理学会西南部会、2009年11月27日、リジェール松山（松山市）

(15) 岩下健一、池田龍二、武田泰生、住澤知之、古川龍彦、山口辰哉、秋山伸一、山田勝土、RNA-タンパク質複合体 vault はヒト腎癌由来細胞株 ACHN 細胞において hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) と結合し、そのユビキチン依存的な分解を促進する、第62回日本薬理学会西南部会、2009年11月27日、リジェール松山（松山市）

(16) 田畑祥、山本雅達、池田龍二、古川龍彦、車暁芳、新里能成、南謙太朗、向田直史、武田泰生、山田勝土、秋山伸一、チミジンホスホリラーゼによる NF- κ B の活性化機構、第68回日本癌学会学術総会、2009年10月3日、パシフィコ横浜（横浜市）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 勝土 (Yamada Katsushi)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・客員研究員

研究者番号：00037491

(2) 研究分担者

武田 泰生 (Takeda Yasuo)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・教授

研究者番号：60245462

池田 龍二 (Ikeda Ryuji)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・副薬剤部長

研究者番号：50398278