

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：31305

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590194

研究課題名(和文)がん細胞における新規耐性マーカーとしてのARF GEP100の検討

研究課題名(英文)Role of a guanine nucleotide-exchange protein, ARF-GEP100, in the doxorubicin resistance of K562 human leukemia cells

研究代表者

蓬田 伸(YOMOGIDA, Shin)

東北薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：80230845

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：抗がん剤の耐性因子(P-糖タンパク質;Pgp)の発現にARF-GEP100(GEP100)が関与しているかを抗がん剤のDoxorubicin(DOX)を用いて耐性細胞を作製し検討した。その結果、Pgpの発現が確認されるとGEP100の増加が認められ、Pgpに対する抗体を用いて、免疫沈降を行ったところ、GEP100はPgpとともに共沈した。siRNAを作成し検討したところ、ARF6のノックダウンではPgpやGEP100の発現は変化しなかった。以上のことから、GEP100は、Pgpの発現にもなって増加し、ARF6が関与しない新たなpathwayによってPgpの発現に影響を与えることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：It has been already revealed that ARF-GEP100 (p100) preferentially activates ARF (ADP-ribosylation factor) in vitro and regulated various cell functions. In contrast, P-glycoprotein (Pgp) transports a broad range of anticancer drugs out of the cells. The inhibition of Pgp is expected to circumvent the Pgp-mediated drug resistance. In this study, we examined whether p100 may affect the expression of Pgp using the Doxorubicin (DOX)-resistant K562 cells. The expression level of p100 increased, accompanied with Pgp expression. Interestingly, the expression of p100 was increased in the cell membrane fraction. Furthermore, anti-Pgp antibody immunoprecipitated p100 in DOX resistant cell lysate. The DOX resistant cells treated with ARF6 siRNA were investigated for expression level of Pgp and p100. However, the expression of Pgp and p100 was not changed. Collectively, these observations suggest that p100 may be involved in the expression and activation of Pgp to induce the DOX resistance.

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：がん 抗がん剤耐性 P-糖タンパク質 ARF-GEP100 ARF6 Doxorubicin

1. 研究開始当初の背景

細胞内には数多くのシグナル分子が存在しており、その中でも低分子量Gタンパク質 (small GTP-binding protein) と呼ばれる一群の分子は、細胞運動やタンパク輸送をはじめとする多くの細胞機能に関わるシグナル分子として重要な役割を担っている。Gタンパク質はGTPと結合し、それ自身が持つGTPase活性によってGTPをGDPに分解するタンパク質の総称であり、分子量20-40kDaのものを特に低分子量Gタンパク質と呼ぶ。低分子量Gタンパク質の活性はGTP結合型 (活性型) とGDP結合型 (不活性型) の交換反応により調節されてい

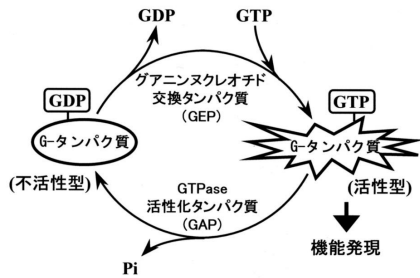


図1. 低分子量Gタンパク質の活性調節機構

る。図1に示すように、それぞれの反応にGDP結合型をGTP結合型に変換するグアニンヌクレオチド交換タンパク質 (guanine nucleotide exchange protein; GEP) とGTPase活性化タンパク質 (GTPase-activating protein; GAP) が関与している。研究分担者の染谷は、ARFをGTP結合型に変換するタンパク質、ARF-GEP100を発見し、白血球のアポトーシスや貪食作用における作用機序について研究を進めてきた。ARFとは、ADPリボシル化因子 (ADP-ribosylation factor) の略名で、すべての真核細胞に存在し、哺乳動物ではARF1からARF6の6種類が同定されている。ARFの役割として、細胞内の小胞輸送、ホスホリパーゼDやホスファチジルイノシトール5-キナーゼの活性化などが知られており、なかでもARF6は白血球機能の調節や細胞接着の調節、さらにはEGFR (epidermal growth factor receptor) を介したがん細胞の浸潤に関与することが報告されている。最近、ARF-GEP100は、乳がん細胞においてARF6を活性化するためにEGFRのリン酸化ドメインに直接結合し、浸潤や転移に関わる特異的なEGFR-GEP100-Arf6-AMAP1 pathwayの一翼を担っていることが報告されている。このようにARF-GEP100は、ARF6を活性化するタンパク質として同定され、ARF6の活性化が関与する種々の機能を調節するとともに、細胞の機能を多面的に調節している可能性が示唆される。

細胞におけるストレス応答は、外界からの様々な刺激が受容体や細胞膜を通過し、細胞内にその情報が伝達されると細胞は運動性を獲得や形態変化をもたらす。さらに細胞内ではストレス応答性のカスケードを利用して、様々な遺伝子発現やタンパク質の発現が

行われる。抗がん剤による治療は、がん細胞にとってはある意味ストレス応答と考えられ、その結果として薬物耐性能や転移能を獲得する要因となる。P-糖タンパク質は、抗がん剤に対する多剤耐性を獲得したがん細胞において発現しており、様々な抗がん剤を細胞外に排出輸送することから、多剤耐性因子として位置づけられている。そして、P-糖タンパク質の抗がん剤排出機能を阻害することにより多剤耐性の克服が期待されているが、いずれもそのメカニズム解明が色々行われているものの、基礎研究の成果が実際の治療として臨床の現場に反映されていないのが実情である。

2. 研究の目的

がんの予後を左右する因子として、転移性と薬剤耐性があげられる。このふたつの問題をどのようにコントロールするかが患者の存命のKeyとなるが、いずれもそのメカニズム等の解明が検討されているが、十分に臨床応用されていないのが実情である。そこで本研究では、白血球機能やがん細胞の運動性に関与することが知られているARF-GEP100に着目し、ARF-GEP100の薬剤耐性マーカーとしての可能性とP-糖タンパク質の発現メカニズムにARF-GEP100が関与するpathwayが存在するかを分子生物学的手法や免疫学的手法を用いて検証する。

3. 研究の方法

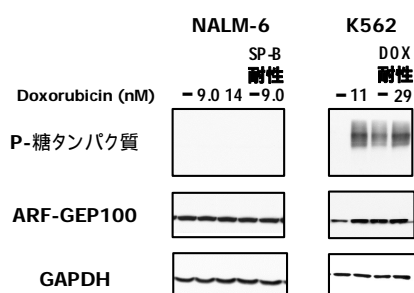
ヒト白血病細胞株であるK562あるいはNalm-6細胞を低濃度のドキソルピシン(DOX)存在下で継代培養し、耐性細胞を作製した。ARF-GEP100およびP-糖タンパク質の発現は、特異抗体を用いてWestern blottingで検討した。

白血球機能発現などに関与するARF-GEP100やARF6に対するsiRNAを作成し、ARF-GEP100、ARF6およびP-糖タンパク質の発現に影響があるかをそれぞれに対する抗体を用いたWestern blottingで確認する。さらに、DOXの細胞毒性についてMTT試薬を用いて測定を行った。

4. 研究成果

はじめに、がん細胞におけるARF-GEP100の薬剤耐性化のマーカーとしての検討を検討するため、ARF-GEP100の部分ペプチドを合成し、ウサギに免疫しペプチド抗体の作成を行った。その結果、ARF-GEP100を認識する特異性の高い抗体を作ることができた。次に、K562およびNalm-6を用いて、DOXに対する72時間における細胞毒性についてMTT試薬を用いて調べ、80%以上の生存率のある濃度の1/10用量である0.5 nMから処置し、DOXの濃度を徐々に上げて行くことで耐性細胞の作成を行った(130日から180日間)。そして、ARF-GEP100とP-糖タンパク質の発現の時間経過をK562細胞で検討した。その結果、図2. に示すようにDOX

を処置してから131日目にP-糖タンパク質の発現が確認されると、ARF-GEP100の発現が増加することが認められた。しかしながら、P-糖タンパク質が発現されている耐性細胞にDOXをさらに処置しても、ARF-GEP100の発現量には変化は認められなかった。一方、NALM-6に同じ期間DOXを処置しても、P-糖タンパク質の発現は認められなかった。そして、ARF-GEP100の発現の増加も認められなかった。また、histone deacetylase 阻害剤であるspiruchostatin B (SP-B)耐性NALM-6細胞を用いて、P-糖タンパク質とARF-GEP100の発現を検討したところ、図2. に示すようにP-糖タンパク質の発現は認められず、そして、



ARF-GEP100の発現増加も認められなかった。さらに、SP-B耐性NALM-6にDOXを処置しても、両タンパク質に変化は認められなかった。

図2. 耐性細胞におけるARF-GEP100の発現

P-糖タンパク質は140kDaの新生タンパク質として合成され、糖鎖付加により170kDa~の糖タンパク質となる。そして、細胞膜に移動したうえでリン酸化を受け、薬剤排出ポンプとして機能し、抗がん剤からのアポトーシスなどの細胞死から逃れる。この一連のP-糖タンパク質の細胞内での変化に、ARF-GEP100が関与している可能性が十分に考えられる。そこで、細胞膜でのARF-GEP100の発現を検討したところ、P-糖タンパク質の細胞膜での発現に伴い、ARF-GEP100の発現も増加していた。さらに、P-糖タンパク質に対する抗体を用いて、免疫沈降を行ったところ、ARF-GEP100はP-糖タンパク質とともに共沈した。このことから、P-糖タンパク質の発現にARF-GEP100の関与が示唆された。

白血球の機能発現やEGFRを介したがん細胞の浸潤にARF6などの低分子Gタンパク質の関与が示唆されていることから、これらに対するsiRNAを作成し、P-糖タンパク質とARF-GEP100の発現を検討した。その結果、ARF-GEP100は、2種類作ったsiRNAでノックダウンされなかったが、ARF6およびARF1は、siRNAでノックダウンされた。そして、P-糖タンパク質およびARF-GEP100の発現を検討したところ、それぞれのタンパク質の発現に影響を与えなかった。さらに、DOX処置による細胞毒性を検討したが、いずれの濃度でもDOX処置による細胞毒性は認められなかった。以上のことから、ARF-GEP100は、P-糖タンパク質の発現にともなって増加し、ARF6およびARF1が

関与しない pathway によってP-糖タンパク質の発現や機能発現に影響を与えることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1件)

Kanno S, Maeda N, Tomizawa A, Yomogida S, Katoh T, Ishikawa M, Characterization of cells resistant to the potent histone deacetylase inhibitor spiruchostatin B (SP-B) and effect of overexpressed p21waf1/cip1 on the SP-B resistance or susceptibility of human leukemia cells, International Journal Oncology, 査読有, Vol. 41(3), 2012, 862-868, DOI : 10.3892/ijo.2012.1507

〔学会発表〕(計 4件)

蓬田伸, 染谷明正, 菅野秀一, 富澤亜也子, 長岡功, 石川正明, グアニンヌクレオチド交換タンパク質 (guanine nucleotide-exchange protein;GEP)による Doxorubicin 耐性への関与, 日本薬学会第 132 年会, 2013

Shin Yomogida, Akimasa Someyaa, Syu-ichi Kanno, Ayako Tomizawa, Isao Nagaokaa, Masaaki Ishikawa, Involvement of a guanine nucleotide-exchange protein, ARF-GEP100, on expression of MDR-1 in the doxorubicin resistance of K562 human leukemia cells, 第 86 回日本生化学会大会, 2013

Shin Yomogida, Akimasa Someyaa, Syu-ichi Kanno, Ayako Tomizawa, Isao Nagaokaa, Masaaki Ishikawa, Role of a guanine nucleotide-exchange protein, ARF-GEP100, in the doxorubicin resistance of K562 human leukemia cells, 第 36 回日本分子生物学会年会, 2013

蓬田伸, 染谷明正, 菅野秀一, 富澤亜也子, 長岡功, 石川正明, Doxorubicin 耐性 K562 細胞を用いたグアニンヌクレオチド交換タンパク質 (guanine nucleotide-exchange protein;GEP) の P-糖タンパク質発現における役割の検討, 日本生化学会東北支部第 80 回例会・シンポジウム, 2014

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tohoku-pharm.ac.jp/laboratory/yakuchi/i>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

蓬田 伸 (YOMOGIDA, Shin)
東北薬科大学・薬学部・講師
研究者番号：80230845

(2)研究分担者

染谷 明正 (SOMEYA, Akimasa)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：9 0 1 6 7 4 7 9