

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：34204

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670083

研究課題名(和文) 薬剤耐性に伴う抗がん剤ドキシソルビシン排出におけるオートファジーの関与

研究課題名(英文) Autophagy is involved in a clearance of anti-cancer agent doxorubicin in the multidrug resistant cancer cell line.

研究代表者

奈良 篤樹 (Nara, Atsuki)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・講師

研究者番号：60387959

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：抗がん剤排除などの薬剤耐性は、処方した抗がん剤の無力化に直結する、重大な問題である。抗がん剤がどのような経路で細胞外へ排除されるかという謎に対しては、ほとんど分かっていない。本研究課題では、抗がん剤ドキシソルビシンを用いてオートファジーによる薬剤排除機構を解明することを目指した。本研究によって、核に蓄積したドキシソルビシンを直接オートファジーによって排出することが判明した。本研究の成果は、単に抗がん剤をリソソームに隔離して薬効を無力にするだけでなく、核内の物質の排除に細胞質側から積極的に関与する新規のシステムの存在が明らかとなったことである。

研究成果の概要(英文)：Release of drug from the cancer cells contributes reduction of its cytotoxicity. How are the chemotherapeutic agents that accumulated in the cells released to the extracellular space? In my study, I tried to examine about a direct involvement of autophagy in anti-cancer drug doxorubicin delivery. The study provides a novel insight for an autophagic delivery of doxorubicin from the nucleus to the lysosomes in multidrug resistant cancer cell line.

研究分野：細胞生物学

キーワード：薬剤耐性 オートファジー ドキシソルビシン

## 1. 研究開始当初の背景

抗がん剤排除による薬剤耐性は、がん化学療法の最重要課題である。薬剤耐性がん細胞における抗がん剤の排出を担う主要因子として、ATP 結合型ドメインを持つ ABC トランスポーターが知られる。P-糖タンパク質は、アントラサイクリン系抗がん剤ドキシソルピシンを輸送基質とする ABC トランスポーターである (Szakacs et al. 2006 *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 219)。P-糖タンパク質を含め ABC トランスポーターの多くは、細胞膜カリソソームに局在する (Rajagopal and Simon 2003 *Mol. Biol. Cell* 14, 3389)。抗がん剤は、排出の際、エネルギーを必要としない拡散によってトランスポーターへ向かうと言われている。しかし、細胞質に拡散したドキシソルピシンが膜区画のリソソームにどのように運ばれ、集積するのか、謎は残されている。

薬剤耐性となった骨髄性白血病 K562 細胞株にドキシソルピシンを 1 時間程取り込ませた後、蛍光顕微鏡で観察すると、はじめは核のみに局在するものの、ドキシソルピシン自身の蛍光の粒子が輝点として細胞質に速やかに出現し、リソソームにも分布するようになる (Chen et al. 2007 *Pham. Res.* 24, 2156)。研究代表者は、この現象を試験管内再構成することに成功した (特許出願 2010-186470)。この系において、オートファジー制御因子 Beclin1 を抗体で除去すると、蛍光の輝点形成が阻害されることも突き止めた。オートファジーは、細胞質や老朽化したオルガネラ、細胞に侵入した細菌などをオートファゴソームと呼ばれるオルガネラで取り囲み、その後リソソームと融合して内容を分解する輸送経路である。本研究では、オートファジーの関連因子が薬剤耐性に伴うドキシソルピシンのリソソームへの輸送・隔離に如何に働くのかを詳細に検討する。

## 2. 研究の目的

本研究では、トランスポーターへの輸送が拡散であるという通説に挑戦し、薬剤耐性がん細胞におけるオートファジーによる抗がん剤排出の分子機構解明を目指す。

## 3. 研究の方法

薬剤耐性 K562 白血病がん細胞をドキシソルピシン存在下で 1 時間培養すると、ドキシソルピシンは細胞核のみに局在する。洗浄の後にドキシソルピシンなしで 30 分培養し、これを蛍光顕微鏡観察すると、ドキシソルピシン自身の蛍光の輝点が細胞質に認められ、リソソームマーカーと共局在するようになる。この輝点がどう動いてリソソームへ向かうのか解明するため、タイムラプス解析する。蛍光顕微鏡及び電子顕微鏡を駆使した細胞生物学的および生化学的な解析をすることで、ドキシソルピシンの分布する微細構造を特定する。

### (a) 細胞質に出現するドキシソルピシン蛍光輝点のタイムラプス解析

セミインタクト細胞を用いた *in vitro* ドキシソルピシン排出再構成系による予備的な研究から、オートファジー制御因子である Beclin1 や hVps34 が必要であることを見出した。そこで、核から排出されるドキシソルピシンがまずオートファゴソームに分布するのかどうか検討するため、オートファゴソームのマーカーである LC3 と GFP との融合遺伝子を K562 細胞に遺伝子導入し、安定発現細胞株を取得した。この細胞を用いて、GFP-LC3 と細胞質に現れるドキシソルピシン蛍光の輝点のそれぞれの分布を、既設のライカ蛍光顕微鏡を用いてタイムラプス解析をした。オートファゴソーム形成に必要な Atg5 や Atg14 などのノックダウン細胞を作製して同様にタイムラプス解析した。以上により、細胞質に排出されたドキシソルピシンのリソソームに至るまでの継時的分

布変化の詳細を明らかにした。

#### (b) ドキソルビシンが蓄積する核の形態解析

ドキソルビシンは DNA などと結合して核に蓄積するが、その後どのように核から細胞質に排出されるのか、わかっていない。核から排除の際、核がソラマメ状に変形し、その窪み部分にドキソルビシンの蛍光粒が認められることがこれまでに分かっているが、ソラマメ状の構造の詳細について、ほとんどわかっていない。そこで、電子顕微鏡を用いてこの構造の詳細を解析した。窪み部分にオートファジー因子が存在するののかも抗 LC3 抗体や抗 Atg16L 抗体など免疫電顕や蛍光抗体染色法などを駆使して、検討した。Atg14 ノックダウン細胞におけるソラマメ状構造についても検討を加えた。

### 4. 研究成果

#### (1) 細胞質に出現するドキソルビシン蛍光輝点のタイムラプス解析

細胞質に排出されるドキソルビシンがオートファゴソームに取り込まれるのか明らかにするため、オートファジーマーカー LC3 と GFP 融合遺伝子の安定発現細胞株を取得し、この細胞株を用いて蛍光顕微鏡を駆使してタイムラプス解析し、核から排出されたドキソルビシンと LC3-GFP が頻繁に共局在することが分かった。Atg14 ノックダウン細胞ではこれがほとんど見られないことも分かり、従来提唱されている薬剤トランスポーターを介する薬剤排出の定説に疑義を提案することができた。

#### (2) ドキソルビシンが蓄積する核の形態解析

核から排除されたドキソルビシンはオートファジーによってリソソームに運ばれることが示されたが、核に蓄積したドキソルビシンがどのように細胞質へ排出されるのか、

大きな謎であった。本研究ではまず、ドキソルビシンの核からの排除の際に核膜が核内部に陥入して管状の構造体を形成し、この管を介してドキソルビシンが細胞質に排出されていることが分かった。このことは、抗 LC3 抗体による免疫電子顕微鏡解析によって、核内に陥入する管状構造の膜近傍に LC3 が多数認められたことや、管内に GFP-LC3 が生まれては動く様子をタイムラプス解析により撮影することで証明した。では、どのように核膜からドキソルビシンが排出されるのかという分子メカニズムではあるが、オートファジーによって分解される分子を運ぶ受容体である p62 タンパク質が核膜近傍に特異的に存在することが分かった。飢餓によるオートファジーの場合、p62 は細胞質に集積するが、ドキソルビシン排出時には核膜近傍に p62 が特異的に集積することが間接蛍光抗体法により明らかとなった。さらに生化学的解析から、ドキソルビシン排除に伴う p62 の分解も判明し、ドキソルビシンと相互作用する核内タンパク質と p62 との結合によってオートファゴソームに取り込まれることが推察された。現在、ドキソルビシン排出に伴って生じる p62 と相互作用する因子を検索しており、近い将来成果を発表できる予定である。

### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

(1) 「オートファジーは、核に蓄積した抗がん剤ドキソルビシンの速やかな排除に関わる」第 72 回日本癌学会学術総会、2013 年 10 月 3 日～5 日、パシフィコ横浜

(2) 「Autophagy is involved in the rapid clearance of anti-cancer Doxorubicin in the drug resistant cells」新学術「オートファジー」第 1 回班会議 2013 年 12 月 19 日

～21日、ヤマハリゾートつま恋

(3) 「Atg14 は、薬剤耐性に伴う抗がん剤ドキシソルピシンの細胞核からの速やかな排除に必要である」第73回日本癌学会学術総会、2014年9月25日～27日、パシフィコ横浜〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ

[http://b-lab.nagahama-i-bio.ac.jp/?page\\_id=70](http://b-lab.nagahama-i-bio.ac.jp/?page_id=70)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

奈良 篤樹 (NARA Atsuki)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・  
講師

研究者番号：60387959

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし