

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：31305

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460231

研究課題名(和文) 多剤耐性に寄与するP-糖タンパク質の発現の速さと量を規定する因子の同定

研究課題名(英文) Identification of new pathway on expression of P-glycoprotein in the doxorubicin resistance of K562 human leukemia cells

研究代表者

蓬田 伸 (YOMOGIDA, Shin)

東北医科薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：80230845

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：P-糖タンパク質(Pgp)の発現に差がある細胞を用いて、DNAマイクロアレイやタンパク質の網羅的解析を行い、がんの悪性化に関与しているNrf2及びKeap1について調べた。その結果、Pgpの発現が強いと、Keap1の発現は減少していた。Nrf2は、膜・オルガネラにおいてKeap1と同様に減少し、核では増加していた。一方、Pgpの発現が弱いと顕著にKeap1の発現が増加した。一般的にNrf2はKeap1と細胞質に共存しているが、K562細胞においては、Nrf2の細胞質での存在が確認されなかった。このことから、Pgpの発現にはKeap1-Nrf2制御系と新たな因子が存在する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Keap1-Nrf2 pathway plays a critical role in the protection of cells against several stresses. P-glycoprotein (Pgp) transports a broad range of anticancer drugs out of the cells. We examined whether Keap1-Nrf2 pathway may affect the expression of Pgp using the Doxorubicin-resistant K562 cells. Keap1 level in the cytosolic fraction decreased in the abundantly expressing Pgp cell. Interestingly, Keap1 level in the cytosolic fraction was increased in the weakly expressing Pgp cell. Whereas, the expression of Nrf2 in the cytosolic fraction was not detected, Nrf2 level in the membrane-bound organellar fraction was alike in Keap1. The resistant cells treated with MG-132 were investigated for Keap1 and Nrf2 level. Keap1 level in the cytosolic fraction was not changed. However, Keap1 level in the membrane-bound organellar fraction increased. Collectively, these observations suggest that Keap1-Nrf2 pathway may be involved in the expression of Pgp.

研究分野：生化学、タンパク質の機能解析

キーワード：がん細胞 抗がん剤耐性 Keap1 Nrf2 プロテオソーム P-糖タンパク質

### 1. 研究開始当初の背景

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能の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。がん細胞の薬剤耐性化に関与する糖タンパク質として、P-糖タンパク質は広く認知されており、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。170kDaのP-糖タンパク質は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。また、がん細胞がある抗がん剤に対して耐性を示すようになると、構造も作用機序もまったく異なる数種の抗がん剤に対しても耐性となる現象が古くから知られている。このがん細胞の多剤耐性化は現在でも、がん化学療法における障害となっている。多剤耐性についても、P-糖タンパク質が、抗がん剤多剤耐性がん細胞の細胞膜上に発現し、抗がん剤を細胞外へ排出し、多剤耐性の実体であることが、これまでの研究で明らかにされている。申請者は、平成23-25年度の科学研究補助金によって、P-糖タンパク質の発現にグアニンヌクレオチド交換タンパク質 (guanine nucleotide exchange protein; GEP) である ARF-GEP100 が、関与しているか否かを Doxorubicin 耐性細胞や Spiruchostatin B 耐性細胞を作成し検討した。その結果、P-糖タンパク質の発現が確認されると、ARF-GEP100 の発現の増加が見られ、細胞膜画分においても ARF-GEP100 の増加が確認された。耐性細胞を作り P-糖タンパク質の発現を確認していた過程で、ヒト由来骨髄性白血病細胞株である K562 細胞に Doxorubicin を処置した時、同じ抗がん剤を同じ細胞株を用いているにも関わらず、P-糖タンパク質の発現に要する時間や発現量に違いがあることに気付いた (図1)。

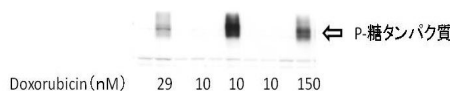


図1 P-糖タンパク質の発現の違い

### 2. 研究の目的

我が国の死亡原因第1は1981年から「がん」であり、2006年には死因の30%を占め、働き盛りの年齢層における最大の死因

でもある。がんの予後を左右する因子としては、転移能と薬剤耐性があげられる。この2つの問題をいかにコントロールするかが患者のQOLの向上と余命につながるが、いずれもそのメカニズム解明が色々に行われているものの、基礎研究の成果が十分に臨床の現場に反映されていないのが実情である。

そこで今回我々は、抗がん剤の耐性をがん細胞のストレス応答のひとつと考え、P-糖タンパク質の発現における速さと量の違いに着目し、P-糖タンパク質の発現する速さと量を規定する因子を分子生物学的手法や免疫学的手法を用いて明らかにする。

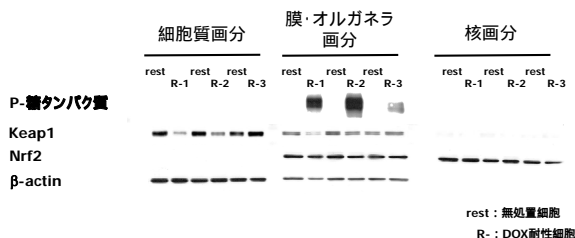
### 3. 研究の方法

すでに、P-糖タンパク質の発現の違いが見られている K562 細胞を用いて、DNA マイクロアレイを行い解析する。また、P-糖タンパク質の発現の違いが見られている K562 細胞を用いて、細胞可溶性画分を作成し、iTRAQ 法および SWATH 法により、網羅的プロテオミクス解析を行う。そして、候補となる因子を Western blotting で解析する。

### 4. 研究成果

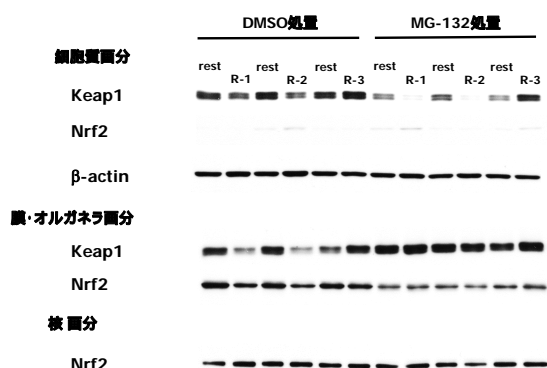
P-糖タンパク質の発現量や期間に差がある K562 細胞を用いて、DNA マイクロアレイやタンパク質の網羅的解析 (iTRAQ 試薬と SWATH) を行った。その結果、ユビキチン関連酵素などが候補として上がってきた。そこで、生体の酸化ストレス防御機構において注目されている Keap1-Nrf2 制御系について検討した。恒常的な Nrf2 の安定化は、がんの悪性化に関係していることが報告されていることから、Nrf2 の変動を P-糖タンパク質の発現量違う K562 細胞を用いて Western blotting で検討した。その結果、P-糖タンパク質の発現が強い細胞においては、Nrf2 のタンパク質の発現が減少していた。一般的に、がん細胞において、がんの悪性化を担う因子である Nrf2 は、Keap1 と細胞質に共存しており、酸化ストレスによって、Keap1 が不活化され、Keap1 から Nrf2 が離れて核へ移行し、抗酸化酵素や解毒酵素などを合成し、細胞内の恒常性を維持している。そこで、P-糖タンパク質の発現量の違う K562 細胞を用いてプロテオーム分析細胞成分分画キットを使い、細胞分画を行った。そして、細胞質画分、膜・オルガネラ画分および核画分における Keap1 および Nrf2 の発現を Western blotting で検討した。その結果、図2に示すように、P-糖タンパク質が強く発現している細胞においては、細胞質画分と膜・オルガネラ画分の Keap1 の発現は低下していた。さらに興味深いことに、P-糖タンパク質の発現が弱いと細胞質画分の Keap1 の発現が増加していることが確認された。さらに、細胞質画分には、Keap1 だけが存在し、膜・オルガネラ画分に

Keap1 と Nrf2 の存在が確認され、Nrf2 の発現は Whole cell lysate を用いた時と同じ結果を示し、核画分への移行が認められた。



**図 2 細胞成分分画の違いによる Keap1 および Nrf2 の変動**

最近、HepG2 細胞において、Keap1 の分解が p62 を介したオートファジーによることが報告されている。そこで、p62 の関与について抗体を用いて検討した。その結果、p62 のタンパク質の増加は、P-糖タンパク質の発現の強弱に関わらず大きな変動は認められなかった。さらに、p62 のリン酸化についても検討したところ、いずれの細胞においても、変化は認められなかった。



**図 3 MG-132 処置による Keap1 および Nrf2 の変動**

そこで、P-糖タンパク質の発現が強い細胞において、Keap1 や Nrf2 の発現が減少したことから、プロテオソームの関与を検討するために、プロテオソームの代表的な阻害剤である MG-132 を処置し、それらタンパク質の変動について検討した。

その結果、図 3 に示すように、細胞質画分での Keap1 の大きな変動は認められなかったが、膜・オルガネラ画分においては、MG-132 処置によって、Keap1 の分解は抑えられ、増加する傾向が認められた。一方、Nrf2 においては、MG-132 処置によっても、細胞質の Nrf2 は確認されなかった。そして、膜・オルガネラ画分においては、MG-132 処置により、その発現の減少が抑えられ、核への移行も減少した。

これらのことから、P-糖タンパク質の発現量には、細胞質および膜・オルガネラ画分における Keap1 の減少が、関与している可能性が示唆された。そのメカニズムは、細胞質画分とオルガネラ画分で異なること、

さらには、p62 を介したオートファジーによるものではないことが明らかとなった。今後、さらに詳細なメカニズムを検討して行く予定である。

#### 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 3 件)

Kanno SI, Yomogida S, Tomizawa A, Yamazaki H, Ukai k, Mangindaan RE, Namikoshi M, Ishikawa M, Combined effect of papuamine and doxorubicin in human breast cancer MCF-7 cells. *Oncol Lett.* 査読あり、Vol. 8(2)、2014、p547-550、DOI: 10.1016/j.toxlet.2014.11.016

Kanno SI, Kurauchi K, Tomizawa A, Yomogida S, Ishikawa M, Pifithrin-alpha has a p53-independent cytoprotective effect on docosahexaenoic acid-induced cytotoxicity in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Toxicol Lett.* 査読あり、Vol. 22;232(2)、2015、p547-550、DOI: 10.1248/bpb.b15-00734

Kanno SI, Tomizawa A, Yomogida S, Detecting mRNA Predictors of Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity in Mouse Blood Using Quantitative Real-Time PCR. *Biol Pharm Bull.* 査読あり、Vol. 39(3)、2016、p440-445、DOI: 10.1248/bpb.b15-00734

[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、抗がん剤耐性細胞におけるグアニンヌクレオチド交換タンパク質 (guanine nucleotide-exchange protein;GEP)の役割、第 87 回日本生化学会、国立京都国際会館・グランドプリンスホテル京都(京都府・京都市)、2014

藤村務、渡部彩佳、猪俣明日香、久保田雅史、蓬田伸、セサミンの K562 細胞に対する抗腫瘍効果の検討、第 89 回日本生化学会、仙台国際センター・東北大学川内北キャンパス(宮城県・仙台市) 2016

蓬田伸、染谷明正、数野彩子、上野隆、三浦芳樹、菅野秀一、富澤亜也子、原明義、藤村務、P-糖タンパク質の発現における Keap1-Nrf2 pathway の関与、日本薬学会第 137 年会、仙台国際センター・東北大学川内地区(宮城県・仙台市) 2017

藤村務、渡部彩佳、猪俣明日香、久保田雅史、数野彩子、三浦芳樹、上野隆、蓬田伸、ゴマリグナン類の K562 細胞に対する抗腫瘍効果の解析、日本薬学会第 137 年会、仙台国際センター・東北大学川内地区(宮城県・仙台市) 2017

[その他]

ホームページ等

<http://www.tohoku-mpu.ac.jp/laboratory/>

yakuchi/i

6. 研究組織

(1) 研究代表者

蓬田 伸 (YOMOGIDA, Shin)

東北医科薬科大学・薬学部・准教授

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：90167479