

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 6 月 15 日現在

機関番号：23102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21790530

研究課題名（和文） 機能未知輸送体群の抗癌剤輸送への関与を中心とした機能解析

研究課題名（英文） Identification of novel transporter genes involved in transport of nucleotide anticancer drugs

研究代表者

神山伸（KAMIYAMA SHIN）

新潟県立大学・人間生活学部・助教

研究者番号：70525401

研究成果の概要（和文）：核酸型抗癌剤の輸送に関与している可能性が示唆される機能未知の輸送体ファミリー（SLC35F）遺伝子群に関して遺伝子の取得を行い、遺伝子の過剰発現と発現抑制による機能解析を行った。メンバーのいくつかが癌細胞の増殖に影響している可能性はみられたものの、核酸型抗癌剤への感受性に関しては明確な関与を示すことができなかった。従って、癌細胞の抗癌剤耐性獲得にこれらの輸送体は大きな役割を果たしてはいないことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：SLC35F transporter family contains 6 member genes of unknown function. This study aimed to determine whether these genes are involved in sensitivity of cancer cells to nucleotide anticancer drugs. Silencing of these genes decreased cell growth of colon cancer cells; however, that did not affect the sensitivity to 5-fluorouracil. These results indicate that SLC35F members have no function on transport of nucleotide anticancer drugs in cancer cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：輸送体、SLC35、抗癌剤耐性、癌、増殖

1. 研究開始当初の背景

本研究課題「機能未知輸送体群の抗癌剤輸送への関与を中心とした機能解析」は、新たに見いだした輸送体関連遺伝子群について、その基本的な機能を明らかにするとともに、抗癌剤輸送との関わりを解明することにより、その医療応用を目指して行った。

糖鎖修飾に用いられる核酸結合糖（糖ヌク

レオチド）輸送体を含む SLC35 ファミリーは、その相同性により現在 A から F のグループに分類されている（図 1）。A から D までのサブファミリーには輸送基質の異なる糖ヌクレオチド輸送体と PAPS 輸送体が属している。一方、E グループと F グループにはそれぞれ 4 つと 6 つの遺伝子が含まれているが、その機能については、輸送基質を含め全

く明らかにされていない。F グループについては、植物の核酸輸送体の近縁であることが示唆されており、薬剤代謝輸送体に含まれることが示唆されている。また、メンバーの一つである F5 は、核酸類似構造をもつ抗癌剤である 5-フルオロウラシル (5-FU) に耐性がある大腸癌において、5-FU の代謝酵素とともに発現が低下しているとの報告がある。

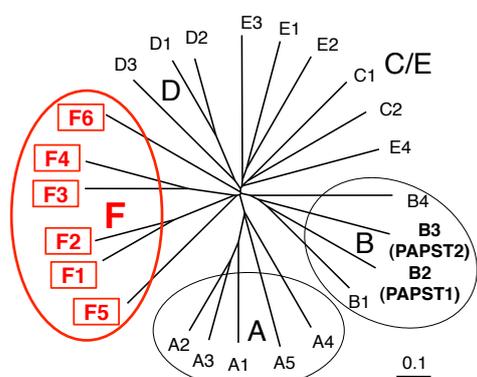


図1 SLC35 ファミリーの系統樹

2. 研究の目的

上記の知見から、これらの遺伝子群は 5-FU のような核酸型の抗癌剤を含む核酸類似化合物を中心に輸送することにより、癌細胞の薬剤耐性に関係する新規遺伝子群であることが示唆される。

本研究はこれらの遺伝子群の機能を明らかにすることにより、これらの遺伝子群が癌細胞の抗癌剤耐性にどのような役割を果たしているかを明らかにすることを目的として行った。

3. 研究の方法

1) SLC35F 輸送体遺伝子群の取得

SLC35F 各遺伝子は PCR によって増幅することによって取得した。

増幅の鋳型となる cDNA は、大腸癌由来細胞である DLD-1、胚性腎臓癌細胞の HEK293、肝臓癌由来細胞の HepG2、子宮癌由来細胞の Hela より Trizol reagent (Invitrogen 社) を用いて RNA を抽出し、SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix

(Invitrogen 社) を用いて逆転写反応によって調製した。これらの cDNA とそれぞれの遺伝子に特異的なプライマーを用いて、Takara Ex Taq (Takara 社) を用いた PCR によって各メンバー遺伝子を増幅し、哺乳類細胞発現用ベクターに組み込んだ。PCR 産物の配列の確認は、dye-terminator 法によるシーケンスによって確認した。

2) 過剰発現細胞の作成と、細胞内局在の検討
目的遺伝子を組み込んだ発現コンストラクトは、大腸癌由来細胞である DLD-1 細胞に一過性発現させ、タグに対する抗体で細胞内免疫染色を行うことにより細胞内における局在を確認した。

細胞への遺伝子導入は、Lipofectamine 2000 を利用したリポフェクションによって行った。安定発現細胞は、発現コンストラクトを導入した細胞を 600 μ g/ml の geneticin (G418) を含む培地で培養し、ベクター上の neomycin 耐性遺伝子を発現しているコロニーをピックアップすることにより、目的遺伝子がゲノム上で安定発現している単一クローン細胞を分離した。

目的遺伝子の発現は、付加されているタグに対する細胞内免疫染色によって確認した。HA タグの染色は、チャンバースライド上の発現細胞を 4% の paraformaldehyde を含む PBS で 30 分間氷冷下固定した後、0.05% Triton X を含む PBS で室温下 90 分処理することにより細胞膜透過処理を行い、その後 anti-HA-Fruorescein antibody (3F10, FITC conjugated; Roche 社) を用いて室温で 1 時間反応させることにより、細胞内染色した。細胞内局在は共焦点顕微鏡を用いて検出した。

3) RNA 干渉法 (RNAi) と抗癌剤感受性の解析

SLC35F5 をターゲットとする siRNA は、Invitrogen の stealth RNA として 3 種類の配列をデザインした。100 μ M の SLC35F5 に対するそれぞれの siRNA あるいはコントロール siRNA を DLD-1 細胞に Lipofectamin 2000 を用いて導入し、0, 0.5, 1, 5, 10, 50, 100 mM の 5-FU を含む培地で培養して 6 日後まで細胞増殖を測定した。また、短期間処理の影響として、同様に siRNA を導入した細胞について 4 日後に 0, 5, 10, 50, 100, 500, 1000 mM の 5-FU で 2 時間処理し、その後通常の培地に交換し、10 日後まで細胞増殖を測定した。

4. 研究成果

1) SLC35F 輸送体遺伝子群の取得

SLC35F グループの遺伝子と、C2orf18 遺伝子の配列は NCBI データベースにおける reference sequence を参照にした。全体として、F サブファミリーメンバー全体の相同性は低く、SLC35F1 と SLC35F2、SLC35F3 と SLC35F4、SLC35F5、SLC35F6 の 4 つのサブグループに分けられた。

SLC35F2、SLC35F5、SLC35F6 遺伝子については、HEK293 細胞から調製した cDNA を鋳型とした PCR によってアミノ酸コード領域の全長が増幅された。シーケンスにより取得した cDNA の配列を確認したところ、いずれも

PCR エラー以外の変異は認められず、GenBank reference sequence における配列と合致していた。これらの取得した cDNA は、N 末端に HA タグを融合させるための発現ベクターである pCDNA3.1(+)-HA に組み込んだコンストラクトを作成した。SLC35F1 遺伝子に関しては、使用した cDNA とプライマーでは増幅されなかったため、上流プライマーおよび pGEM-T Easy ベクター (Promega 社) を用いた nested PCR によって増幅したが、DLD-1 細胞由来 cDNA からは nonsense deletion を持つ splicing variant のみが増幅された。一方、SLC35F3, SLC35F4 遺伝子については、いずれの細胞由来 cDNA を用いても増幅されなかった。

このうち、SLC35F4 (NM_001080455) はクローニング開始時、ゲノム配列から推定された配列しか得られなかったことから、EST 配列を含めた断片配列をもとにその配列を推定した。さらに、マウスの mRNA 由来 cDNA クローン配列を参考に配列を推定し、再度 PCR を試みたが、いずれにしても目的の遺伝子配列は得られなかった。2011 年 12 月現在、上記 reference sequence はアミノ酸コード領域に関する情報の少なさ故に削除されていることから、ヒトでは偽遺伝子化している可能性も考えられ、RACE 法などによる検討が必要であるものと思われる。

2) SLC35F 輸送体遺伝子群の細胞内局在

pCDNA3.1(+)-HA に組み込んだ遺伝子は、DLD-1 細胞に一過性発現させ、HA タグに対する免疫染色を行うことにより、その発現状態と細胞内局在を検討した。

SLC35F2 は、細胞形質膜様の発現と、ゴルジ装置の染色像と類似した細胞内小器官様の発現の両方が確認された。(図 2 A-B、それぞれ矢頭と矢印部分)。細胞膜を界面活性剤で透過処理せず染色した場合でも発現が確認されたことから、少なくとも一部は形質膜上に発現しているものと考えられる。

一方、SLC35F5 に関しては、N 末端に HA タグを付加したコンストラクトを DLD-1 細胞に発現させた場合では、明確な細胞内発現は認められなかった。タグを含む配列がプロセシングにより切断された可能性を考慮し、C 末端に HA タグを付加したコンストラクトと、EGFP との融合タンパク質を発現させる pEGFP-N1 ベクターに組み込んだコンストラクトも作成し、同様に発現させて細胞内局在を検討したが、非常に弱い細胞表面の発現のみが認められた (図 2 C-D)。細胞膜を透過処理せずに染色した場合でも同様の染色像が得られたことから、SLC35F5 は細胞形質膜上に弱い発現しか示さないものと推察される。

SLC35F6 に関しては、既にミトコンドリア

膜に局在していることが報告されている。N 末端に HA タグを付加したコンストラクトを DLD-1 細胞に発現させた場合では、SLC35F5 と同様に細胞内での発現は認められなかった。一方、C 末端に HA タグを付加したものを発現させた場合では、糸粒状に散在するミトコンドリア様の細胞内局在が確認されたが、一部ゴルジ装置局在様の発現も確認された (図 E-F、矢印部分)。

3) SLC35F2 および SLC35F6 遺伝子の安定発現細胞の作成とその解析

細胞内の発現が確認された SLC35F2 遺伝子と C2orf18 遺伝子に関しては、取得した遺伝子の機能解析のために、C 末端にタグが付加された遺伝子産物をゲノム上で安定的に発現している単クローンの DLD-1 細胞を作製

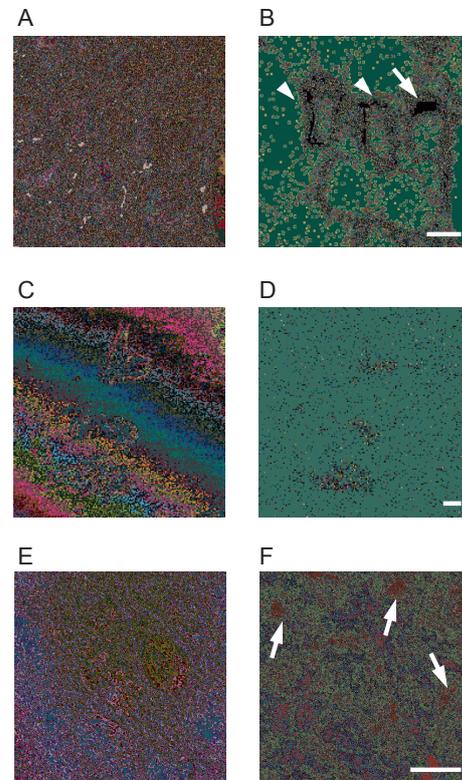


図 2 SLC35F2 および SLC35F5, C2orf18 の細胞内局在

DLD-1 細胞に、N 末端 HA タグ付き SLC35F2 (A, B)、EGFP 融合 SLC35F5 (C, D)、C 末端 HA タグ付き C2orf18 (E, F) のいずれかを発現させ、蛍光抗体法で HA タグを染色するか (B, F)、あるいは EGFP の蛍光 (D) を共焦点顕微鏡で検出した。A, C, E は微分干渉による細胞像。図右下の線は 10 μm を表す。B における矢頭は形質膜様の発現部分、矢印は細胞内小器官様の発現部分を示す。F における矢印は、ゴルジ装置様の発現部分を示す。

した。それぞれの遺伝子を高度に発現している細胞を得るため、得られたクローン細胞について免疫染色を行った。安定発現細胞においても、一過性発現細胞と同様の細胞内局在が確認された。

作製された安定発現細胞をベクターのみを発現しているコントロール細胞と比較した場合で、形態上の明確な変化と、細胞増殖の大きな違いは認められなかった。

4) SLC35F5 遺伝子の抗癌剤耐性に関する影響
SLC35F5 遺伝子に関しては、その発現状態が抗癌剤 5-FU の耐性と関連していることが示唆されていることから、5-FU に耐性を持つ大腸癌由来細胞である DLD-1 細胞を用いて、SLC35F5 が 5-FU 感受性に関与しているかどうかを検討した。

SLC35F5 を安定発現している DLD-1 細胞について、5-FU に対する感受性に変動がみられるかを検討したところ、コントロールの細胞と大きな差異は認められなかった。

さらに、RNA 干渉を用いた SLC35F5 遺伝子の発現抑制細胞を用いて検討するために、SLC35F5 をターゲットとする siRNA を 3 種類デザインし、それぞれを DLD-1 細胞に導入してコントロールの siRNA を導入した細胞と比較検討した。この細胞について、5-FU を長期あるいは一時的に曝露した場合における細胞増殖能を測定することにより、その 5-FU 感受性を検討したところ、いずれの siRNA についても、コントロールの細胞と比べて有意な感受性の差を認められなかった。一方、5-FU で処理しない細胞においては、SLC35F5 発現抑制細胞で細胞増殖能が低下する傾向が認められた (図 3)。

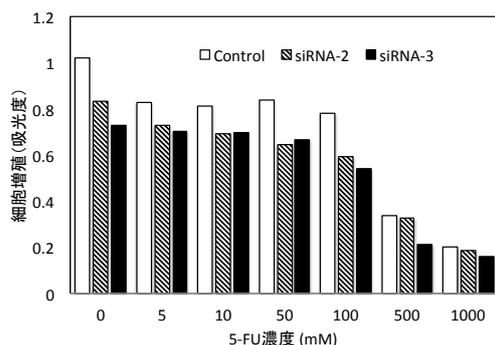


図 3 SLC35F5 発現抑制細胞の 5-FU に対する感受性と細胞増殖

DLD-1 細胞に SLC35F5 に対する 2 種類の siRNA あるいはコントロール siRNA を導入し、4 日後に各濃度の 5-FU で 2 時間処理した。その後通常の培地で 6 日間培養し、その間の細胞増殖を測定した。

これらの研究成果から、SLC35F グループの遺伝子群は核酸型抗癌剤への感受性に関与しておらず、癌細胞の抗癌剤耐性獲得にこれらの輸送体は大きな役割を果たしてはいないことが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 2 件)

神山 伸、曾根英行、榎本秀一「SLC35F ファミリー遺伝子の取得と機能解析」(査読有り) 人間生活学研究誌 3 号 19-25 (2012 年)

Shin Kamiyama, Tomomi Ichimiya, Yuzuru Ikehara, Tomofumi Takase, Izumi Fujimoto, Takeshi Suda, Shoji Nakamori, Mitsuru Nakamura, Fumiaki Nakayama, Tatsuro Irimura, Hayao Nakanishi, Masahiko Watanabe, Hisashi Narimatsu, Shoko Nishihara

“Expression and role of 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate transporters in human colorectal carcinoma” (査読有り) Glycobiology 21(2): 235-246 (2011).

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕 なし

〔その他〕 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神山 伸 (KAMIYAMA SHIN)

新潟県立大学・人間生活学部・助教

研究者番号: 70525401

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし