

平成 21 年 6 月 26 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590293

研究課題名（和文） 生体フロントラインの防御機構：異物排出機能の破綻と疾病

研究課題名（英文） Host-defense through excretion of xenobiotics and related diseases.

研究代表者

和田 守正 (WADA MORIMASA)

長崎国際大学・薬学部・教授

研究者番号：20220965

研究成果の概要：

生体には、外界に接している臓器で異物の進入を先ず阻むという防御機能が備わっている。その実体の把握は、生体の理解とより有効な医療のために必須であるが、その分子機構は良く分かっていない。研究代表者はすでにその実体の一つを明らかにし、遺伝性黄疸の原因となっていることをつきとめたが、本研究ではさらに、異物排出タンパク質が腸管や血球の腫瘍形成に関与すること、異物排出タンパク質の機能阻害により腫瘍の発生を予防できることを見出した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：分子医化学、分子細胞生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：生体分子、輸送タンパク質、膜輸送、生体防御、分子医薬学、トランスポーター、発がん、薬物治療抵抗性

1. 研究開始当初の背景

生体には、外界に接している臓器で異物の進入を先ず阻むという防御機能が備わっていると思われる。このような生体フロントラインの防御機能研究は、生体の理解とより有効な医療のために必須であるが、その分子機構は良く分かっていない。研究代表者はこれまでに、

(1)分子クローニングと遺伝病患者の遺伝子解析から、ABCC2 タンパク質が肝臓における異物排出活性を担う実体の1つであること

を明らかにし (1. Taniguchi, K., Wada, M. 他 8 名 ., A human canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) gene is overexpressed in cisplatin resistant human cancer cell lines with decreased drug accumulation. **Cancer Research**, 56: 4124-4129, 1996; 2. Wada, M., Toh, S. 他 11 名, Mutations in the canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) gene, a novel ABC transporter, in patients with

hyperbilirubinemia II/Dubin-Johnson syndrome. **Human Molecular Genetics**, 7: 203-207, 1998; 3. Toh, S., Wada, M. 他 7 名, Genomic structure of the canalicular multispecific organic anion-transporter gene (MRP2/cMOAT) and mutations in the ATP-binding-cassette region in Dubin-Johnson syndrome. **American Journal of Human Genetics**, 64: 739-746, 1999).

(2) 遺伝子欠損マウスモデルの構築と病態解析、および九州北部コホートを対象とした大腸がんの症例対照研究によって、ABCB1 タンパク質は抗がん剤多剤耐性だけでなく腸管腫瘍形成にも関与することを明らかにした (Mochida, Y. 他 6 名 and Wada, M. The role of P-glycoprotein in intestinal tumorigenesis: disruption of *mdr1a* suppresses polyp formation in *Apc*^{Min/+} mice. **Carcinogenesis**, 24: 1219-1224, 2003)。

さらに、
(3) 分子疫学解析により ABCB1 タンパク質は潰瘍性大腸炎やクローン病などの炎症性腸疾患にも関与しているという結果を得ている。

本研究では、これらの成果をさらに発展させ、上記疾患は生体フロントラインの防御機構が破綻したことにより発症する疾患であるというコンセプトのもとに、その実体である異物排出タンパク質と局所の微細環境における制御因子との相互作用を解析して、これら疾患の新しい予防、診断と治療へ繋げる。そのために、以下の研究を行うことを目的とする。

2. 研究の目的

(1) 異物排出機能欠損マウスの分子病態解析と疾患発症メカニズムの解明

異物排出タンパク質 ABCB1 欠損マウスの消化管組織について、病理組織解析と遺伝子発現プロファイルの 2 点を野生型マウスと比較検討しながら進め、ABCB1 の細胞死、組織構築、腫瘍発生および炎症性病変における作用点とその機序を明らかにする。

(2) 相互作用タンパク質の同定と機能修飾の解明

生体膜上微細環境において ABC トランスポーターと協調して細胞死や組織構築に関与、実行しているタンパク質群を同定・単離し、結合膜タンパク質による細胞内局在制御と機能修飾の実体を把握する。

(3) マウスモデルを用いた化学予防、治療研究

ABCB1 欠損マウスを用いて、ABCB1 阻害剤による化学予防・治療のモデル実験を行い、研究成果の社会還元を目指す。

3. 研究の方法

平成 19 年度

(1) 異物排出タンパク質 ABCB1 欠損マウスの分子病態解析による疾患発症メカニズムの解明

これまでに、ABCB1 欠損マウスを用いた解析から、ABCB1 が癌の出来やすさに関与するという結果を得た。また、分子疫学解析により、ABCB1 は炎症性腸疾患にも関与することを明らかにした。本計画では、細胞死、組織構築、腫瘍発生、炎症性病変における ABCB1 の機序と作用点を明らかにして、化学予防、治療研究につなげる。そのために初年度は、ABCB1 欠損マウスの消化管組織について病理組織解析と遺伝子発現プロファイルの 2 点を、野生型マウスと比較検討しながら進める。

予想と異なり、両遺伝子型マウスの間で網羅的遺伝子発現プロファイルに差異が見られない時は、次年度計画の「焦点を絞った解析」を前倒しする。

(2) 相互作用タンパク質の同定と機能修飾の解明

生体膜上微細環境において、ABC トランスポーターと協調して細胞死や組織構築を実行しているタンパク質群を同定・単離する。タンパク質間相互作用の検出系として、酵母ツーハイブリッド法や免役沈降法が用いられているが、前者は生体膜上の相互作用を直接解析出来ないという問題点、後者は、タンパク質制御系に特有の、一過性で弱い相互作用を検出できないという問題点が予期される。本計画ではこの限界を克服するために、スプリット・ユビキチン法 (Application of the split-ubiquitin membrane yeast two-hybrid (MbYTH) system to investigate membrane protein interactions. **Methods**, 32: 349 - 362, 2004) を導入して細胞膜上での相互作用を検出する。

具体的には、

① ABCC2 または ABCB1 タンパク質の N 端または C 端に、ユビキチンの C 端部分が結合した形で発現するように bait 構築体を作製する。

② ユビキチンの N 端部分が結合した prey cDNA ライブラリーを作製する。mRNA ソースとしては、ABCC2 と ABCB1 の発現と機能が顕著な肝臓をまず対象とし、候補タンパク質が計画どおり得られない場合には、同じく発現と機能が確認されている小腸、腎臓および複雑なタンパク質間相互作用が予想される脳を対象とする。

③ 前ページ、図のように bait および prey を酵母菌内で共発現させ、再構成ユビキチンに特異的なプロテアーゼによって切断された転写因子依存的転写活性を指標に相互作用タンパク質候補をスクリーニングする。

④ 得られたクローンは塩基配列を決定し、相同性や、膜タンパク質か否かなどによりグループ化して、以後の解析の効率化を図る。
⑤ 疑似陽性や疑似陰性の問題が予想されるので、ユビキチンの代わりにルシフェラーゼをスプリットした方法 (Ozawa, T. 他 4 名., A genetic approach to identifying mitochondrial proteins. *Nat. Biotechnol.*, 21: 287-293, 2003) も検討課題とする。また、相互作用の豊富なファミリーメンバーの存在可能性も検討する。

平成 20 年度

(1) ABCB1 欠損マウスの分子病態解析による疾患発症メカニズムの解明

初年度の病理組織解析と遺伝子発現プロファイル解析により、野生型と ABCB1 欠損マウスの間で差異の見られた因子につき、培養細胞へ遺伝子 (抗体) を導入し、細胞増殖やアポトーシス誘導活性を指標に、ABCB1 機能との因果関係を明らかにする。

一方、野生型と ABCB1 欠損マウスから腸管粘膜細胞を Weiser 法 (Weiser, M. Intestinal epithelial cell surface membrane glycoprotein synthesis. *J. Biol. Chem.*, 248: 2536-2511, 1973) により単離し、アポトーシスやアノキス誘導能を指標に比較検討することによって腫瘍発生における ABCB1 の作用点を明らかにする。標準培養条件下ではアポトーシス等活性が見られない場合には、さらに薬剤、放射線によるアポトーシス誘導刺激や細胞外マトリクスのコーティング下で差異を検討する。

(2) 相互作用タンパク質の同定と機能修飾の解明

前年度に同定・単離された候補タンパク質と ABCB1、ABCC2 タンパク質との結合様式および相互作用モチーフをプルダウン・アッセイ、免疫沈降法により解析し、また、候補タンパク質による ABCB1、ABCC2 の機能修飾の特異性を、ATPase 活性、膜ベシクル輸送活性、およびアポトーシス誘導活性で比較検討する。

また、RNAi により候補タンパク質の発現を抑制した場合に ABCB1、ABCC2 の機能がどのように変化するかを同様のアッセイ法で解析することにより、機能修飾の様式を明らかにする。

(3) マウスモデルを用いた化学予防、治療研究

ABCB1 欠損マウスを用いて、ABCB1 阻害剤による化学予防・治療のモデル実験を行い、研究成果の社会還元を目指す。ABCB1 欠損マウスでは腫瘍の発生と増大が抑制されるので、ABCB1 の機能や遺伝子発現を抑制するこ

とにより腫瘍の発生と増大の抑制が期待できる。ABCB1 阻害薬を野生型マウスに投与し、腫瘍抑制の有無と抑制様式を解析すると共に、投与プロトコルの最適化を図る。一方、対照実験として、ABCB1 欠損マウスでは効果が無いことを確認する。

阻害剤の開発と選択は大きな問題である。しかしながら、幅広い薬剤が ABCB1 の基質になるので、ABCB1 阻害薬候補としては豊富な拮抗阻害薬が期待できる。一方、ヒトを対象にした場合には、安全性と効果の検討のために膨大な臨床試験が必要であり、この段階でドロップオフしてゆく薬剤は多い。この点に関しても ABCB1 を標的にした場合には、抗がん剤耐性克服を目的として、カルシウム拮抗剤などのような既に臨床応用されている薬剤を拮抗阻害薬として利用する試みがこれまでに多くなされて来たことから、ヒトの化学予防・治療は極めて現実的な戦略といえる。

4. 研究成果

生体フロントラインの防御機能の全容を明らかにして、その機能破綻により発症するがん、炎症性腸疾患などに対する新しい予防、診断と治療法開発へ繋げる事を目的として、4 項目について下記の成果を上げた。

(1) 異物排出タンパク質 ABCB1 の機能と分子疫学解析: ABCB1 欠損マウスを用いた解析から、ABCB1 が癌の出来やすさに関与するという結果を得ていたが、本研究ではこれをさらにヒトに発展させ、小児急性リンパ性白血病の患者 157 人を対象にして遺伝子多型との相関解析を行った。その結果、-2352 G>A、3435C>T、およびハプロタイプのそれぞれが、ABCB1 発現量および白血病の発症と有意に相関する (それぞれ、 $p=0.04$ 、 0.006 、 0.048) ことを明らかにした。

(2) 異物排出機能欠損マウスの分子病態解析による疾患発症メカニズムの解明: ABCB1 欠損マウスを用いた解析から、ABCB1 が腫瘍の出来やすさに関与するという結果をすでに得ていたが、本年度はさらに、発生腫瘍のサイズは不連続な 3 段階に分類されることを明らかにした。そのメカニズムを探るために、マイクロアレイ解析により 3 グループ間での遺伝子群発現パターンを調べ、パスウェイ解析を行なった結果、ミトコンドリアにおける酸化還元関連酵素遺伝子群や増殖関連遺伝子群の発現の有無がグループ間で異なることが分かり (図 1)、がんの増殖過程では関連遺伝子群が恒常的に発現しているのではないし、また連続的に活性化の程度が強まっていくのでもなく、各ステージで特有の遺伝子群の活性化・不活性化が起こって、不連

続に発現パターンが変化していることが明らかになった。このことは、各段階を制御している因子が存在することを示唆しているため、この因子を分子標的とした有効な腫瘍増殖の阻害につながる可能性があり、臨床的にも意義がある結果と評価できる。

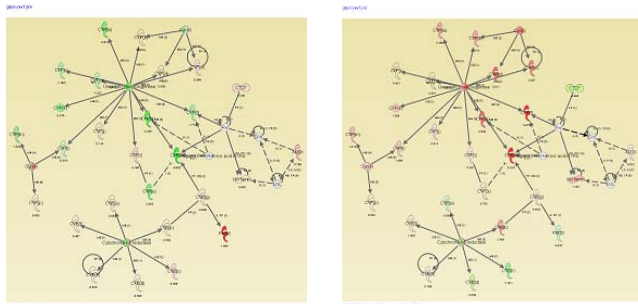


図1. 腫瘍サイズと遺伝子発現パターン
パスウェイ解析の結果抽出された遺伝子ネットワークの一例で、この図は酸化還元関連酵素遺伝子群の発現ネットワークを示す。左図は腫瘍サイズ2-3mmから4-5mmへの発現パターン変化を、右図は4-5mmから5mm以上への発現パターン変化を示す。緑が発現減少、赤は発現亢進を示すことから、腫瘍のサイズが増加することに伴って連続的に発現変化しているわけではないことが理解される。

(3) 相互作用タンパク質の同定と機能修飾の解明: 生体膜上微細環境において、ABC膜輸送体と協調して細胞死や組織構築を実行しているタンパク質群を同定・単離するために、細胞膜上での相互作用を検出できるスプリット・ユビキチン法の導入を計画し、ABCB1およびABCC2cDNAにユビキチンC端cDNAを結合してbait構築体を完成させた。一方、ABC膜輸送体を酵母菌内で強制発現させることはきわめて難しいことが分かったので、まずbait構築体の安定発現株を樹立したのちpreyライブラリーを導入する戦略に切り替えた。

(4) マウスモデルを用いた化学予防、治療研究: ABCB1阻害薬ベラパミルの投与プロトコルを検討した結果、強制的に経口投与方法ではストレスにより死亡する例が避けられないのに対し、餌に練りこみ、経口により一年間継続投与方法が良いと結論付けられた。腸内に形成された腫瘍数を計測した結果、①予想に反して、ベラパミルには腸管腫瘍形成を促進する効果があること、②この促進効果はABCB1に依存しないこと、③促進効果分を補正してベラパミルのABCB1阻害を介する効果のみを抽出すると、顕著な腸管腫瘍形成阻害が認められること、が明らかになり、ABCB1阻害薬による化学予防の実現性が示された。

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)

- ① Yasunaga, M., Takemura, M., Fujita, K., Yabuuchi, H., and Wada, M., Molecular cloning and functional characterization of cynomolgus monkey multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2)., *Eur. J. Pharm. Sciences*, 査読有, 35: 326-334, 2008.
- ② Hattori, H., Suminoe, A., Wada, M., Koga, Y., Kohno, K., Okamura, J., Hara, T., and Matsuzaki, A., Regulatory polymorphisms of multidrug resistance 1 (MDR1) gene are associated with the development of childhood acute lymphoblastic leukemia, *Leukemia Research*, 査読有, 31: 1633-1640, 2007.
- ③ 和田守正、藤田京子、ATP加水分解共役型排出ポンプの構造、生理機能と疾病、*生化学*、*依頼*、79、557-568、2007.

[学会発表] (計6件)

- ① Kyoko Fujita and Masa Yasunaga, Morimasa Wada, Chemoprevention of intestinal cancer by P-gp inhibitors, Gordon Research Conference, Multi-Drug Efflux Systems, 2009/3/23, Galveston, Texas, USA.
- ② 藤田京子、安永真沙、安田香央里、富永由紀、田代康介、久原哲、和田守正、ApcMin/+マウスにおける腫瘍サイズの不連続分布、第31回日本分子生物学会年会、第81回日本生化学会大会、合同大会、2008/12/10、神戸
- ③ 和田守正、耐性克服薬による腸管腫瘍の化学予防戦略、第12回がん分子標的治療研究会総会、2008/6/27、東京
- ④ 藤田京子、安永真沙、和田守正、P糖タンパク質 (P-gp) 阻害剤による腸管腫瘍の化学予防効果、日本分子生物学会、日本生化学会、合同大会、2007年12月14日、横浜
- ⑤ Morimasa WADA, ATP-binding cassette (ABC) transporter family as a risk factor of life-style related diseases, The 21st century COE Program, International Symposium, 2007/11/6, Fukuoka
- ⑥ Morimasa Wada, Kyoko Fujita and Masa Yasunaga, Relevance of ABC proteins in drug discovery, Asian Symposium for Pharmaceutical Science in JSPS Asian Core Program in Huis Ten Bosch,

2007/10/16, Sasebo

[その他]

ホームページ

http://210.191.85.3/~pharm1/lab/molecular_biology/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和田 守正 (WADA MORIMASA)

長崎国際大学・薬学部・教授

研究者番号：20220965

(2) 研究分担者

藤田 京子 (FUJITA KYOKO)

長崎国際大学・薬学部・助手

研究者番号：50435137

(3) 連携研究者

なし