

平成21年5月11日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590314

研究課題名（和文） Vault の生理機能の解析

研究課題名（英文） Analysis of physiological function of vaults

研究代表者

秋山 伸一（AKIYAMA SHINICHI）

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：60117413

研究成果の概要：

Vault は、細胞内で一番大きなリボ核蛋白体であるが、その生理機能は現在まで不明である。今回の研究で、大腸癌細胞に高浸透圧ストレスを加えると、MVP の発現が亢進すること、MVP が発現した細胞は、高浸透圧に対して耐性になることを見出した。

MVP の発現は、腎臓や腸管などの恒常的に浸透圧変化の大きい組織において認められている。腎臓の腎髄質細胞は、高濃度の NaCl にさらされ、500mM 以上の塩濃度になることもある。高い塩濃度はアポトーシスを誘導するが、細胞は vault の発現を亢進することにより、高浸透圧によって誘導されるアポトーシスを回避している可能性がある。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2004年度			
2005年度			
2006年度			
2007年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：分子腫瘍学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医科学

キーワード：MVP、Vault、LRP、osmotic stress、PI3K/Akt

1. 研究開始当初の背景

1. 20年ほど前、ラットの vault が coated vesicle に結合した細胞質オルガネラとして単離された。その電子顕微鏡による解析から、形態がゴシック様式の大聖堂のアーチ型に似ているため vault (アーチ型天井) と名付けられた。八角形をした樽状の中心部があり、その両端からキャップ状構造物が突出している (Figures 1 and 2) (Suprenant, KA, *Biochemistry*, 41: 14447-14454, 2002)。

Vault は中空になっており、その中に 70S 大腸菌リボソームを数個取り込めるほど大きく、今日まで報告されている中で最大のリボ核蛋白体を形成している。

Vault は、その 70% 以上を占める 100kDa の major vault protein (MVP) のほかに、240kDa (p240)、193kDa (p193) の蛋白質と 1 種類の vault RNA (vRNA) から構成されている。

p240 はテロメラーゼの構成分子と考えら

れているTEP1と同一であることが最近示された。TEP1は vRNAと特異的に結合できるが、精製したvaultにはテロメラーゼ活性が検出されていない。p240は、vRNAの安定化とvault粒子への結合に関与していると考えられており、vaultのキャップの先端部分に vRNAとともに位置している。p193はpoly(ADP-ribose) polymerase (PARP)の触媒領域と28%の相同性を示す~350アミノ酸の領域を有し、自己とMVPをポリADP-リボシル化する。p193はPARP酵素ファミリーの新しい一員であり、V- PARPと命名された。我々は、MVPのみを大腸菌(vaultを有していない)に発現させるとvaultの様の構造物が形成されることを見出し、MVPがvaultの特徴的な形態に関与していることを示した(Zheng *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun*, 326: 100-107, 2005)。

MVPのノックアウトマウスが作製されたが、明らかな病態は観察されず、vaultが細胞内で一番大きなリボ核蛋白体であるにもかかわらず、その生理機能は現在まで不明である(Mossink, MH *et al.*, *Cancer Res*, 62: 7298-7304, 2002)。

一方、P-糖蛋白質を発現していない多剤耐性ヒト肺癌細胞株に110kDaの蛋白質が発現していることがわかり、この蛋白質はLRPと名付けられた(Scheper, RJ *et al.*, *Cancer Res*, 53: 1475-1479, 1993)。

LRPの遺伝子座位は16p13.2で、同じ染色体に存在するMRP1遺伝子の近傍にある。LRPはABCトランスポーターではないが、核膜や細胞質内小胞に局在しているため膜輸送に関与していることが予想された。LRPは多剤耐性に関与していると考えられているが、LRPcDNAをトランスフェクトした細胞は多剤耐性にはならなかった。

LRPはラットのvaultのMVPと88%のアミノ酸相同性を有していることなどから、ヒトのMVPであることがわかった。LRP/MVPだけでは多剤耐性形質を賦与するのに不十分であり、vault粒子の数の増加が耐性の獲得に必要であることが推測された。

2. 研究の目的

我々は、LRP/MVPの抗癌剤耐性への関与について研究を行ってきた(Kitazono *et al.*, *J Natl Cancer Inst*, 91: 1647-1653, 1999; Ohno *et al.*, *Blood*, 98: 1160-1165, 2001)。この過程で、DNA傷害性抗癌剤が、LRP/MVPの発現を誘導することを見出し(Shimamoto *et al.*, *Oncol Rep*, 15: 645-652, 2006)。この結果から、vaultの生理的機能が、様々なストレスが、細胞に加わった時に細胞を防御することにあるので

ないかと考え始めた。DNA傷害薬剤、UV、高浸透圧などの様々なストレスを細胞に負荷するとMVPの発現が亢進した。これらのストレスによるMVP発現亢進のメカニズム、その際に、vaultを発現した細胞がこれらのストレスに対し耐性になるのかを調べ、耐性獲得の機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)高浸透圧ストレスによりMVPの発現が亢進するメカニズムおよびMVPが亢進した細胞は、このストレスに耐性になるのかを解析する。

①培地にsucroseまたNaClを加えることによりSW620細胞に高浸透圧ストレスを加え、MVPの発現誘導が、加えた化合物に関係なく浸透圧依存性に、時間依存性に増加するかをイムノブロット法で調べる。また、高浸透圧により、MVPの細胞内局在が変化するかを免疫組織化学染色法で観察する。

②高浸透圧によるMVPの発現の亢進が転写の活性化によるのかを調べるためreal time PCRでMVPmRNA量を測定する。また、MVPのプロモーターをルシフェラーゼ遺伝子の5'上流に挿入したベクターをSW620細胞にトランスフェクトし、デュアルルシフェラーゼレポーターアッセイを正常浸透圧下、高浸透圧下で行い、高浸透圧ストレスがMVPプロモーター活性を亢進させるかを解析する。

③高浸透圧がMVPプロモーター活性を上昇させた場合には、様々な欠損部位や変異を有するMVPプロモーターを作製して上記レポーターアッセイを行うことにより、どの領域がMVPプロモーターの発現に重要で、どの部位が高浸透ストレスに必要なかを明らかにする。高浸透圧ストレス下でのMVPプロモーター活性上昇に必要なプロモーター領域に結合する蛋白質をゲルシフトアッセイにより探索する。また、クロマチン免疫沈降(ChIP)法により、高浸透圧下の細胞内でこれらの蛋白質のMVPプロモーターへの結合が増加するかを調べる。

④SW620細胞のMVP遺伝子をRNA干渉(shRNA)によりノックダウン(KD)する。

wt細胞とMVP-KD細胞を高浸透圧ストレス下に置いた時のMVPの発現の差異を確認し、高浸透圧下でMVPが発現する細胞としない細胞で、ストレスに対する感受性の差があるかを、MTTアッセイやコロニフォーメーションアッセイで生存細胞を測定し、フローサイトメーターでアポトーシス細胞の比率やアネキシンVの発現を測定することにより明らかにする。

(2)高浸透圧ストレスがどのような情報

伝達経路でMVP発現を上昇させ、MVPの発現上昇がどのようなメカニズムで細胞をストレスに対して耐性にしていくのかを分子レベルで解明する。

①高浸透圧ストレスの情報伝達経路としては、P38MAPKを介した経路が知られている。P38MAPKの阻害剤であるSB203580でP38MAPKの活性を阻害した細胞をストレス下においた時、MVPの発現の亢進が生じなくなるか調べる。

②アポトーシスを抑制する経路としては、PI3K-Aktの経路がよく知られている。また、MVPがPTENと結合し、核に輸送されることが報告されている。そこで、MVP遺伝子をノックダウンした細胞とwt細胞に高浸透圧ストレスをかけた時に、Aktの活性化に差異があるのかを調べる。

③wt細胞の方がストレス下でのAkt活性化が高い時、どのようなメカニズムで高浸透圧ストレスがAktを活性化するのか、その時、どのような情報伝達経路のステップでMVPまたはvaultが関与しているのかを明らかにする。具体的には、

1) wt細胞とMVP-KD細胞でPTENの細胞内分布に変化が見られるかを共焦点レーザー顕微鏡

(FLUOVIEW FV500、オリンパス光学工業KK)で調べる。

2) EGF、IGFでPI3K-Akt経路を活性化させたとき、wt細胞とMVP-KD細胞での情報伝達量とスピードの差異を下流の遺伝子の発現の量と時間の差異により解析する。また、細胞の増殖速度や抗癌剤を作用させた時のアポトーシス細胞の比率を測定し両細胞で比較する。

4. 研究成果

我々はMVPのノックアウトマウスが明らかな病態を示さなかったことから、通常とは異なるストレス環境下でvaultが必要とされているのではないかと考えて、様々なストレスを細胞に加えMVP発現を調べることにより、DNAを傷害する薬剤やUVがMVPの発現を亢進すること、高浸透圧がMVP発現を誘導することをいち早く見出した。今回の研究では、高浸透圧ストレス下でのMVPの発現亢進のメカニズム、MVP発現亢進が細胞をストレスから防御するのではないかと考えて、その分子機序を調べた。培地にsucroseまたはNaClを添加してヒト大腸癌SW620細胞に高浸透圧ストレスを加えると、加えた化合物に関係なく浸透圧依存性に、時間依存性にMVP mRNA、MVP蛋白質が増加した。高浸透圧によりMVPプロモーターの活性が上昇した。P38MAPKの特異的な阻害剤SB203580で細胞を処理すると、高浸透圧によるMVPの誘導が阻止された。このことは高浸透圧ストレスによるMVPの発現亢進がp38を介して行われていることを示唆している。高浸透下でのMVPの役割を明らかにするためにSW620細胞のMVP遺伝子をRNA干渉(shRNA)によりノックダウン(KD)すると、細胞は高浸透圧に対してより感受性になり、アポトーシスが亢進した。さらにMVP遺伝子をノックダウンすることにより、高浸透圧によるリン酸化Aktの増加が妨げられることを見出し

た。vault/MVPがPI3K/Akt経路を活性化することにより、高浸透圧刺激によって誘導されるアポトーシスから細胞を防御することが示唆された。

MVPの発現は、腎臓や腸管などの恒常的に浸透圧変化の大きい組織において認められている。腎臓の腎髄質細胞は、高濃度のNaClにさらされ、500mM以上の塩濃度になることもある。高い塩濃度はアポトーシスを誘導するが、細胞はvaultの発現を亢進することにより、高浸透圧によって誘導されるアポトーシスを回避している可能性がある。

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 16 件)

①Zhao H-Y, Che X-F, Akiyama S. (他12名15番) Molecular basis for the induction of an angiogenesis inhibitor, thrombospondin-1, by 5-FU. *Cancer Res.*, 68: 7035-7041, 2008. (査読有)

②Ikeda R, Che X-F, Akiyama S. (他 16 名 19 番目) Hyperosmotic Stress Up-regulates the Expression of Major Vault Protein in SW620 Human Colon Cancer Cells. *Exp. Cell Res.* 314: 3017-3026, 2008. (査読有)

③Zhao H-Y, Che X-F, Akiyama S. (他 12 名 15 番目) Down regulation of c-Myc and induction of an angiogenesis inhibitor, thrombospondin-1, by 5-FU in KM12C cells. *Cancer Lett.*, 270: 156-163, 2008. (査読有)

④Furukawa T, Akiyama S. (他 3 名 5 番目) Copper Transport Systems are Involved in Multidrug Resistance and Drug Transport. *Curr Med Chem.* 15: 3268-3278, 2008. (査読有)

⑤Che X-F, Akiyama S., Tomoda A. Suppression of the proliferation of cancer cell lines, KB-3-1 and K562 cells preceded by a decrease in intracellular pH caused by phenoxazine derivatives. *Oncol Rep.* 19: 1253-1258, 2008. (査読有)

⑥Ikeda R, Che X-F, Akiyama S. (他 13 名 15 番目) Thymidine phosphorylase inhibits the expression of proapoptotic protein BNIP3. *Biochem Biophys Res Commun.* 370: 220-224, 2008. (査読有)

- ⑦Ooyama A, Akiyama S. (他 4 人 5 番)
Anti-angiogenic effect of 5-Fluorouracil-based drugs against human colon cancer xenografts. *Cancer Lett.*, 267: 26-36, 2008. (査読有)
- ⑧Shirato K, Che X-F, Akiyama S. (他5人7番)
Apoptosis induction preceded by mitochondrial depolarization in multiple myeloma cell line U266 by 2-aminophenoxazine-3-one. *Biol Pharm Bull.* 31: 62-67, 2008 (査読有)
- ⑨Nakagawa H, Akiyama S. (他11人11番) .
Alterations in the glycoform of cisplatin-resistant human carcinoma cells are caused by defects in the endoplasmic reticulum-associated degradation system. *Cancer lett.* 270(2): 295-301, 2008. (査読有)
- ⑩Ying Zhou, Shin-ichi Akiyama, (他11人8番) .
Cepharanthine is a potent reversal agent for MRP7 (ABGG10)-mediated multidrug resistance. *Biochem Pharmacol* (in press). (査読有)
- ⑪Owatari S, Che X-F, Akiyama S. (他12人中14番) .
Copper-Transporting P-Type ATPase, ATP7A, Confers Multidrug Resistance and Its Expression Is Related to Resistance to SN-38 in Clinical Colon Cancer. *Cancer Res.*, 67: 4860-4868, 2007. (査読有)
- ⑫Jain S, Akiyama S. (他 6 人 4 番) .Reversal of P-Glycoprotein-Mediated Multidrug Resistance by Siphonane Triterpenoids.J. *Nat. Prod.*, 70:928-931, 2007. (査読有)
- ⑬Komatsu M, Akiyama S. (他 6 人 7 番)
Involvement of Mitogen-activated protein kinase signaling pathways in microcystin-LR-induced apoptosis after its selective uptake mediated by OATP1B1 and OATP1B3: microcystin-Lr induces the apoptosis via mapk. *Toxicol. Sci.*, 97: 407-416, 2007. (査読有)
- ⑭Jill K. Paterson, Akiyama S. (他 11 人 12 番)
ABCB6 Localizes to both the outer mitochondrial membrane and the plasma membrane. *Biochemistry*, 33: 9443-9452, 2007. (査読有)
- ⑮Wang L, Akiyama S. (他 4 人 5 番) Reversal effect of BM-cyclin 1 on multidrug resistance in C-A120 cells. *Anti-cancer Drug*, 18: 1015-1021, 2007. (査読有)
- ⑯Tachiwada T, Che X-F, Akiyama S. (他 10 人 13 番) Isolation and characterization of arsenite-resistant human epidermoid carcinoma KB cells. *Oncol Rep*, 18: 721-727, 2007. (査読有)
- [学会発表] (計 20 件)
- 古川龍彦
Gemcitabine の耐性と核酸輸送蛋白質
第 31 回日本分子生物学会年会第 81 回日本生化学大会合同大会 2008 年 12 月 神戸ポートアイランド
 - 田畑 祥
チンホスホラゼン発現腫瘍細胞における NF- κ B を介した IL-8 の発現亢進機 第 6 7 回日本癌学会学術総会 2008 年 10 月 29 日名古屋国際会議
 - 趙 紅業
ヒト大腸癌における 5-FU による血管新生阻害因子 TSP-1 の誘導 第 6 7 回日本癌学会学術総会 2008 年 10 月 29 日名古屋国際会議場
 - 古川龍彦
膀胱癌細胞株 MIAPaCa-2 由来 Gemcitabine 耐性細胞の耐性機構の解析 第 6 7 回日本癌学会学術総会 2008 年 10 月 29 日名古屋国際会議場
 - 車 暁芳
survivin ペプチド(89-104 アミノ酸)による ATL 細胞のアポトーシス誘導 第 6 7 回日本癌学会学術総会 2008 年 10 月 29 日名古屋国際会議場
 - 王 嘉
低酸素によるヒト線維芽細胞での PGIS の高発現 第 6 7 回日本癌学会学術総会 2008 年 10 月 29 日名古屋国際会議場
 - 秋山伸一
腫瘍微小血管に対する 5-FU とその活性化酵素の作用 第 6 7 回日本癌学会学術総会 2008 年 10 月 28 日名古屋国際会議場
 - 松下茂人
p53R2 標的 siRNA は悪性黒色の腫瘍増殖を抑制して抗癌剤感受性を高める 第 6 7 回日本癌学会学術総会 2008 年 10 月 28 日名古屋国際会議場
 - 古川龍彦
膀胱癌細胞株 MIAPaCa-2 由来 Gemcitabine 耐性細胞の耐性機構の解析 第 12 回がん分子標的治療研究会総会 2008 年 6 月 27 日学術総合センター (東京)
 - 秋山伸一
第 29 回癌免疫外科研究会 2008 年 6 月 19 日ホテル日航東京

11. 小松正治
藍藻毒マイクロシスチンLRの肝臓特異的毒性
の発現機構 第30回日本分子生物学学会年会・
第80回日本生化学大会 合同大会 2007年12
月14日パシフィコ横浜 ヨコハマグランドインターコンチネ
ンタルホテル

12. 古川龍彦
銅輸送体ATP7A発現による抗癌剤耐性の機構
第30回日本分子生物学学会年会・第80回日本
生化学大会 合同大会 2007年12月11日 パ
シフィコ横浜ヨコハマグランドインターコンチネ
ンタルホテル

13. Akio Ooyama
Anti-angiogenic effect of 5-fluorouacil
based drug against human colon cancer
xenograft. 第66回 日本癌学会学術総会 2007
年10月5日パシフィコ横浜

14. Ryuji Ikeda
Thymidine phosphorylase suppresses the
expression of proapoptotic protein BNIP3. 第
66回 日本癌学会学術総会 2007年10月5日
パシフィコ横浜

15. Shin-chi Akiyama
The effect of thymidine phosphorylase, 5-FU
and hypoxia on tumor microenvironments. (シ
ンポジウム) 第66回 日本癌学会学術総会 2007
年10月4日パシフィコ横浜

16. Tatsuhiko Furukawa
A copper transporter ATP7A mediate multidrug
resistance and the vesicle transport system.
第66回日本癌学会学術総会 2007年10月4日
パシフィコ横浜

17. Hong-Ye Zhao
Induction of angiogenesis inhibitor
thrombospondin-1 by 5-FU in human colon
cancer cells. 第66回 日本癌学会学術総会
2007年10月3日パシフィコ横浜

18. Jia Wang
Increased expression of PGIS in two human
fibroblast cell lines under hypoxic
condition. 第66回 日本癌学会学術総会
2007年10月3日 パシフィコ横浜

19. Sho Tabata
Molecular basis for the induction of
interleukin-8 by thymidine phosphorylase.
第66回 日本癌学会学術総会 2007年10月3
日 パシフィコ横浜

20. Xiao-Fang Che
The effect of hypoxia on gene expression in
human fibroblast WI-38 cells. 第66回 日

本癌学会学術総会 2007年10月3日 パ
シフィコ横浜

〔図書〕(計 2件)

①秋山伸一
日本臨床 がん薬物療法学 増刊号
2009 5

②秋山伸一
日本メディカルセンター 消化器がん化
学療法 2008 7

6. 研究組織

(1) 研究代表者

秋山 伸一 (AKIYAMA SHINICHI)
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教
授

研究者番号：60117413

(2) 研究分担者

車 曉芳 (CHE XIAO-FANG)
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・助
教

研究者番号：10437973