

平成 24 年 6 月 25 日現在

機関番号：37303

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590323

研究課題名（和文） 生体フロントラインの防御機構とその破綻による疾病

研究課題名（英文） Host-defense by excretion and its failure generating diseases.

研究代表者

和田 守正（WADA MORIMASA）

長崎国際大学・薬学部

研究者番号：20220965

研究成果の概要（和文）：

外界に接している腸などの臓器では、異物の進入を先ず阻む生体フロントラインの防御機能が存在し、その機能破綻によりがん、炎症性腸疾患などが発症する。従って、その全容解明が当該疾患に対する新しい予防、診断と治療法開発のために必要不可欠である。肝臓における異物排出活性を担う実体の同定と、その類似タンパク質の腸管腫瘍形成や炎症性腸疾患への関与に加え、本研究ではさらに、(1) その分子的背景を明らかにして、新しいがん治療の標的として提示すること、(2) 異物排出活性の機能阻害によるがんの化学予防が可能なること、を示す成果を得た。

研究成果の概要（英文）：

Excretion at the tissue and organs bordering on external side of the body has a role as a host-defense function against xenobiotics and, then, its failure could cause diseases. Identification of the corresponding molecular factors and elucidation of the underlying molecular mechanisms is indispensable for diagnosis and treatment of the diseases. In this study, (1) we identified some of the molecular factors which could be a target for cancer treatment, and (2) found that inhibitor of the xenobiotics transporter could be useful as a chemoprevention agent.

交付決定額

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：膜輸送、輸送タンパク質、生体防御、分子間相互作用、腸管腫瘍形成、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. et. Al., *Cancer Research*, 56: 4124-4129, 1996; 2. Wada, M. et. al., *Human Molecular Genetics*, 7: 203-207, 1998; 3. Toh, S. et. al., *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. et. al., *Carcinogenesis*, 24: 1219-1224, 2003)。さらに、(3) 分子疫学解析により、ABCB1 タンパク質は小児白血病の発症にも関与する他(Hattori, H. et. al., *Leukemia Research*, 31: 1633-1640, 2007)、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た。

2. 研究の目的

本研究ではこれをさらに発展させ、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ことを目的とする。そのために、以下の研究を行う。

(1) ABCB1 欠損マウスの分子病理解析と疾患発症メカニズムの解明: ABCB1 欠損マウスの消化管組織について、遺伝子発現プロファイルと粘膜上皮細胞の *in vitro* 解析の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21年度

(1) ABCB1 欠損マウスの分子病理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こと、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遺伝子発現プロファイルを、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「粘膜上皮細胞の *in vitro* 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解析には適用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ある。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 (Fetchko, M. and StagIiar, I., *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. 図のように bait および prey を酵母菌内で共発現させ、再構成ユビキチンの特異的なプロテアーゼによって切断された転写因子 LexA-VP16 に依存的な転写活性を指標に、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深刻化した場合には、a) 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., et. al., *Nat. Biotechnol.*, 21: 287-293, 2003)、b) 発現量を厳密に制御するために、bait 構築体をゲノム上に挿入した後 prey を導入する方法 (Paumi, C., et. al., *Mol. Cell*, 26: 15-25, 2007) を検討する。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

検討課題とする。

平成22年度以降

(1) ABCB1 欠損マウスの分子病理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., 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による接着依存的細胞死誘導条件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 阻害薬のベラパミル投与による腸管腫瘍形成阻害を明らかにし、ABCB1 阻害薬による化学予防の実現可能性を探る。さらに、より特異性の高い阻害剤の効果を検証する。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が、本計画に関しては、がんの耐性克服を目的として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多くなされ、また多数の新規阻害剤も開発され、現在第三世代の薬剤が Phase II 臨床試験を終えているので、阻害薬候補としては豊富な薬剤が期待できる。

4. 研究成果

(1) ABCB1 欠損マウスの分子病理解析に

よる疾患発症メカニズムの解明：ABCB1 欠損マウスでは、一定のサイズ以上の腫瘍が激減することから、ABCB1 の機能欠損によりがん細胞は特定のサイズ段階に留まり、先に進めないことが明らかになった。網羅的遺伝子発現プロファイルの解析から、TGF- β 、TIMP1 やセラミド合成経路の発現亢進が示唆された。しかしながら、個体ごとに腫瘍をプールして個体間比較を行ったために、腫瘍間の発現差異が混在している懸念があった。そこで、再度腫瘍を採取し、個々の腫瘍を2分割し、一方を詳細な病理学的評価に、他方を発現解析に用いることとした。その結果、①腫瘍とともに筋層の混入した検体が3割で見られ、②1割の検体で病理学的悪性度が異なる例が確認されたので、この2点をそろえて個体間比較を行うことにより、信頼性の高い解析が可能となった。このようなサンプルを用いて再度、網羅的遺伝子発現プロファイル解析を行った結果、③筋層混入によるバイアスが解決され、④特定のサイズ段階で ERBB2 と unspecific monooxygenase を中心としたパスウェイの発現亢進が明らかになった。

さらに、定量PCRによる発現変化の確認と、候補遺伝子の導入・機能解析により、ABCB1 の欠損による増殖停止の作用点を探ることを試みた。その結果、マイクロアレイにおける発現量比は、CyBR Green を用いたリアルタイムRT-PCRによって、定量的にも大変よく再現されていることが確認された。また、候補遺伝子のうち発現変化が大きい6遺伝子について 完全長 cDNA を単離し、pEGFP-N3 ベクターを用いた発現構築体を作製して大腸がん細胞株に導入したところ、腫瘍サイズの増大に伴って発現が低下する遺伝子群のいくつかについては安定形質転換細胞株が樹立できないことが分かり、がん抑制的な作用が想定された。

以上のように、ABCB1 の腫瘍形成における作用点の解析から、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、各サイズ段階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。すなわち、このサイズ段階を制御している因子は、新しいがん治療の標的として提示できると期待される。

(2) 相互作用タンパク質の同定と機能修飾の解明：相互作用検出のためにスプリット・ユビキチン法を開始したが、①高分子膜タンパク質であるABCトランスポーターの酵母における発現を検出することが予想以上に難しいこと、②陽性クローンの出現頻度が極端に低いこと、が問題となった。しかしなが

ら、③培養と酵母の破碎・溶解条件の検討により発現検出の困難を克服し、④bait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ことでヒトABCC2発現の難しさを克服した。さらに、⑤形質転換効率が低いサブクローンをスクリーニングにて選別することにより陽性クローンの出現頻度を上昇させることに成功し、⑥cDNAライブラリー導入後、段階的に選択マーカーを増やすことにより、一段階では得られない「弱い相互作用」を検出できることを明らかにした。

以上により、スクリーニングを本格化できる系が整った。

(3) 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、餌に練りこみ、経口により継続投与する方法が良いと結論された。10, 25, 50 mg/kg/dayの濃度群を設定し、一年後腸内に形成された腫瘍数を計測した結果、①腫瘍数はベラパミルの投与なしの対照群に比較して1/3程度に減少すること、②わずかに濃度依存性が見られたことが明らかになった(表1)。加えて、③1年後の生存率も、投与群では濃度依存的に生存率が上昇していた(図1)。以上から、ABCB1阻害薬による、新しい化学予防の実現性が示された。

表 1

Table 1 The number of intestinal polyps in each mouse

Mice strain	Dosage of verapamil (mg/kg/day)	Small intestine			Large intestine	Total	
		Distal	Middle	Proximal			
<i>Mdrla</i> ^{-/-} <i>Apc</i> ^{Min/+}	0	39.8±5.1	20.4±4.3	6.0±1.5	66.4±9.8	3.0±0.8	69.2±9.7
	10	16.2±2.5*	7.4±1.4*	3.3±0.8	26.8±3.9*	1.6±0.6	28.4±4.2*
	25	15.5±2.1*	8.5±1.5*	3.2±0.8	27.1±3.3*	2.2±0.5	29.3±3.3*
	50	14.2±2.0*	6.9±1.1*	3.2±0.8	24.3±3.3*	2.9±0.7	27.2±3.3*
<i>Mdrla</i> ^{-/-} <i>Apc</i> ^{Min/+}	0	11.2±2.7*	4.4±1.1*	2.1±0.6	17.8±4.0*	1.6±0.6	19.4±4.4*

Values are mean±SEM.

*P<0.001 Dunnett's multiple comparison test.

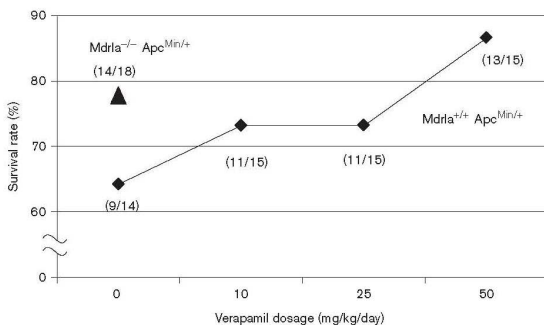


図 1. ベラパミル投与の生存率に及ぼす効果

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4件)

①Kyoko Fujimoto, Gen Fujii, Michihiro Mutoh, Masa, Yasunaga, Hiromitsu Tanaka, Morimasa Wada, Suppression of

intestinal polyp development in *Apc*^{Min/+} mice through inhibition of P-glycoprotein using verapamil, *European Journal of Cancer Prevention*, 査読あり, in press, 2012.

②Kato Y, Kubo Y, Iwata D, Kato S, Sudo T, Sugiura T, Kagaya T, Wakayama T, Hirayama A, Sugimoto M, Sugihara K, Kaneko S, Soga T, Asano M, Tomita M, Matsui T, Wada M, Tsuji A., Gene knockout and metabolome analysis of carnitine/organic cation transporter OCTN1., *Pharm Res*, 査読あり, 27: 832-840, 2010.

③Tokuhiro K, Isotani A, Yokota S, Yano Y, Oshio S, Hirose M, Wada M, Fujita K, Ogawa Y, Okabe M, Nishimune Y, Tanaka H., OAZ-t/OAZ3 is essential for rigid connection of sperm tails to heads in mouse., *PLoS, Genet.* 査読あり, 5: e1000712, 2009.

④Ueda T, Manabe H, Keizo T, Hirose M, Matsuoka Y, Miyagawa Y, Tsujimura A, Fujita K, Wada M, Okuyama A, Tanaka H., Unique expression of encoding an acrosomal protein (ACPIN1) and salivary-specific protein (SAGSIN1) alternatively translated from two open reading frames on *Acpin1* mRNA., *Int. J. Urol.*, 査読あり, 16: 639-646, 2009.

[学会発表] (計3件)

①南恵美、藤本京子、榎田陽介、横田貞記、和田守正、多剤耐性タンパク質の細胞内局在化におけるリシン・リッチ領域の役割、第34回日本分子生物学会年会、2011.12.15、横浜

②藤本京子、仲西定祐、田口健一、田中宏光、安田香央里、田代康介、久原哲、和田守正、*Apc*^{Min/+}マウスにおける腫瘍サイズ依存的遺伝子の同定と機能解析、第33回日本分子生物学会年会、2010.12.8、神戸

③藤田京子、田口健一、安田香央里、田中宏光、田代康介、久原哲、和田守正、*Apc*^{Min/+}マウスにおける腫瘍サイズ別遺伝子発現パターンの解析、第32回日本分子生物学会年会、2009.12.10、横浜

[図書] (計1件)

和田守正 (共著)、南江堂、コンパスシリーズ「分子生物学・創薬・テーラーメイド医療に向けて」2010、189-207 (総ページ数: 238)

[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