

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月17日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790171

研究課題名（和文） 細胞内小胞輸送経路による制がん剤感受性決定機構の解明

研究課題名（英文） Involvement of intracellular vesicular trafficking in toxicity of anticancer drugs

研究代表者

高橋 勉（TAKAHASHI TSUTOMU）

東北大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号：00400474

研究成果の概要（和文）：

制がん剤感受性決定遺伝子として細胞内小胞輸送経路に関わる遺伝子を多数同定しているが、その詳細な作用機構については分かっていない。本研究では、細胞内小胞輸送経路とアドリアマイシン感受性との関係を詳細に検討し、小胞体からゴルジ体への小胞輸送経路（COPII 輸送経路）の抑制がアドリアマイシン感受性を亢進させることを明らかにした。また、カーゴレセプターErv14によって認識されCOPII小胞によって運ばれるGolgi matrix proteinがアドリアマイシン毒性の軽減において重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

We examined the relationship between intracellular transport pathways and adriamycin toxicity, and found that defect of genes for endoplasmic reticulum (ER)-to-golgi transport enhanced adriamycin toxicity. We also found that disruption of Erv14, one of the cargo receptors involved in ER-to-golgi transport, conferred hypersensitivity to adriamycin. Our results suggest that Erv14 dependent ER-to-golgi transport system plays a major role in the defense mechanism against toxicity of adriamycin.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：制がん剤、細胞内小胞輸送経路、エンドサイトーシス

1. 研究開始当初の背景

がんの化学療法において、制がん剤に対する反応性や副作用発現の程度には個人差が認められるが、いまだに制がん剤の選択や投与量の決定は一定のレジメンに従って行われているケースがほとんどである。がんの化学療法の効果を向上させるためには制がん剤の効果に影響を及ぼす個々の遺伝子の違い

に基づいたテーラーメイド治療が有効と考えられる。このテーラーメイド治療を実現させるためには、個々の制がん剤に対する感受性を決定する遺伝子群の全容解明が不可欠と考えられる。本申請者は、真核生物モデルとして生物学的研究に広く利用されている出芽酵母を用いた独創的な制がん剤感受性決定因子の検索方法を確立し、その方法を利

用した網羅的スクリーニングによって、アントラサイクリン系制がん剤であるアドリアマイシンに対する感受性に影響を与える遺伝子を多数同定することに成功したが、その中には細胞内小胞輸送経路に関わる因子が多数含まれていた。アドリアマイシン以外の複数の制がん剤の毒性の軽減にも同輸送経路が関わっていることも明らかとなった。したがって、細胞内小胞輸送経路が制がん剤感受性決定機構において重要な役割を果たしていると考えられる。

2. 研究の目的

細胞内小胞輸送経路が、制がん剤の毒性発現機構に密接に関与していると考えられるが、細胞内小胞輸送経路と薬剤感受性との関係はこれまでほとんど検討されていなかった。そこで、本研究では、細胞内小胞輸送経路による制がん剤感受性決定機構の解明を目指し、遺伝学的解析が容易で、ヒト細胞とほぼ同様の小胞輸送経路を保持している出芽酵母を真核生物モデルとして用いて、制がん剤感受性決定機構における細胞内小胞輸送経路の役割について解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 出芽酵母のアドリアマイシンに対する感受性

酵母（野生型酵母および細胞内小胞輸送経路関連因子欠損酵母）をSD液体培地で一晚振盪培養後、この培養液をSD液体培地で 1×10^7 、 1×10^6 、 1×10^5 、 1×10^4 cells/mLになるように希釈し、制がん剤（アドリアマイシン、シスプラチン、ブレオマイシン、亜ヒ酸など）を含むSD寒天培地に5 μ L スポットした。その後、30°Cで48時間培養し、酵母の制がん剤に対する感受性を調べた。

(2) アドリアマイシンが小胞体-ゴルジ体間輸送活性に与える影響

アドリアマイシンが小胞体-ゴルジ体間輸送活性（COPII輸送活性）に与える影響は、細胞の加水分解酵素であるカルボキシダーゼ

（CPY）のプロセッシングを指標に測定した。

4. 研究成果

(1) アドリアマイシン感受性決定機構に関わる細胞内小胞輸送経路の特定

各オルガネラ間を結ぶ複数の小胞輸送経路のうち、制がん剤感受性決定に関わる輸送経路の特定を試みた。その結果、小胞体からゴルジ体への小胞輸送経路（COPII輸送経路）に関わる因子（Sec12、Sec22、Sec31 および Sar1）の発現抑制がアドリアマイシン感受性を亢進させることが明らかとなった。また、エンドサイトーシス経路の初期過程に関わる因子（End3、Ede1、Rvs161 など）の欠損が酵母にアドリアマイシン耐性を与えることも明らかとなった。また、COPII輸送経路を抑制すると、エンドサイトーシス初期過程の抑制によるアドリアマイシン耐性獲得作用が減弱することも判明した。したがって、エンドサイトーシス初期過程の抑制が何らかの蛋白質の小胞体からゴルジ体への輸送を亢進させ、それによってアドリアマイシン毒性を軽減している可能性が示唆された。

(2) 制がん剤感受性決定機構における COPII 小胞輸送経路の役割

小胞体で合成された蛋白質（カーゴ蛋白質）は特定のカーゴレセプターによって認識され、COPII小胞を介してゴルジ体に運ばれることが知られている。そこで、アドリアマイシン毒性軽減機構に関わり、COPII小胞輸送経路によって運ばれる蛋白質を明らかにするため、これまでに知られている9種のカーゴレセプターとアドリアマイシン感受性との関係を調べた。その結果、アドリアマイシン毒性軽減に関わるカーゴレセプターとして Erv14 が同定された。また、Erv14 が COPII 小胞輸送経路を介してアドリアマイシン毒性を軽減している可能性が示唆された。さらに、Erv14 と結合することが報告されている蛋白質群とアドリアマイシン感受性との関係を調べたところ、Golgi matrix protein の1つを欠損させるとアドリアマイ

シン感受性が亢進することが明らかとなった。したがって、Erv14 によって認識され COPII 小胞によって運ばれる Golgi matrix protein がアドリアマイシン毒性の軽減において重要な役割を果たしている可能性が考えられる。また、アドリアマイシンが COPII 輸送活性を阻害することも明らかになったことから、COPII 輸送経路がアドリアマイシン毒性の標的経路の1つである可能性も示唆された。近年、小胞体ーゴルジ体間輸送の阻害剤に抗腫瘍効果があることが報告され、新規の制がん剤候補として注目されている。本研究によって、アドリアマイシンが小胞体ーゴルジ体間輸送を抑制する可能性が示唆された。また、小胞体ーゴルジ体間輸送の低下はアドリアマイシンのみならず、ブレオマイシンやシスプラチンの毒性も増強することが明らかとなった。したがって、これらの制がん剤と小胞体ーゴルジ体間輸送の阻害剤を併用することによって、より効果の高いがん治療の開発に繋がると考えられる。また、エンドサイトーシス経路や小胞輸送経路の異常が細胞のがん化やがんの悪性化に密接に関与していることが報告されている。今後、エンドサイトーシス経路の抑制によるアドリアマイシン耐性獲得機構の全容を明らかにすることによって、これらの経路に異常が認められるがんに対する治療法の開発に繋がることが期待される。

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下線)

[雑誌論文] (計2件)

- (1) Takahashi T., A screen for genes involved in adriamycin resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *YAKUGAKU ZASSHI*, (2013) 133(3),393-396. (査読有) DOI: 10.1248/yakushi.12-00279

- (2) Takahashi T., Nakashima S., Masuda T., Yoneda S., Hwang G.W., Naganuma A. Overexpression of *CLN1*, *CLN2*, or *ERG13* increases resistance to adriamycin in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Toxicol. Sci.*, (2011) 36(6), 855-7. (査読有) DOI: 10.2131/jts.36.855

[学会発表] (計9件)

- (1) 高橋 勉、晴山聖子、廣瀬健一郎、深澤ちさと、永沼 章、アドリアマイシン毒性軽減機構における小胞体ーゴルジ体間輸送経路の関与、日本薬学会第133年会、2013年3月29日、横浜市
- (2) 高橋 勉、中島伸吾、増田拓朗、米田茂広、永沼 章、Mevalonate pathway plays a major role in adriamycin resistance., 52th Annual Meeting of the Society of Toxicology、2013年3月13日、San Antonio (USA)
- (3) 高橋 勉、佐竹翔平、永沼 章、リボース-5-リン酸による亜ヒ酸の毒性軽減作用、フォーラム2012：衛生薬学・環境トキシコロジー、2012年10月26日、名古屋市
- (4) 高橋 勉、永沼 章、Overexpression of HMG-CoA synthase confers resistance to adriamycin in both yeast cells and mammalian cells., 第71回日本癌学会学術大会、2012年9月21日、札幌市
- (5) 佐竹翔平、高橋 勉、永沼 章、遺伝子ノックダウン酵母を用いた亜ヒ酸感受性に影響を与える遺伝子の検索、第50回日本薬学会東北支部大会、2011年10月30日、仙台市
- (6) 佐竹翔平、高橋 勉、永沼 章、酵母のペントースリン酸経路関連酵素が示す亜ヒ酸毒性軽減作用、フォーラム2011：衛生薬学・環境トキシコロジー、2011年10月28日、金沢市
- (7) 佐竹翔平、高橋 勉、永沼 章、亜ヒ酸毒性和ペントースリン酸経路との関わり、第10回次世代を担うファーマバイオフ

- オーラム 2011 年 10 月 8 日、仙台市
- (8) 高橋 勉、永沼 章、Relationship between Ptc1, a protein phosphatase, and ribosomal proteins in reduction of adriamycin toxicity in yeast., 第 70 回日本癌学会学術大会、2011 年 10 月 4 日、名古屋市
- (9) 深澤ちさと、晴山聖子、廣瀬健一郎、高橋 勉、永沼 章、アドリアマイシン毒性軽減機構における COPII 小胞輸送経路の関与、第 38 回日本トキシコロジー学会学術年会、2011 年 7 月 13 日、横浜市

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 勉 (TAKAHASHI TSUTOMU)
東北大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号：00400474

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：