

## 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 6 月 7 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790196

研究課題名（和文） ABC 輸送体活性・発現制御機構の解明と創薬基盤の構築

研究課題名（英文） Basic research for development of new drugs based on the regulation of ABC transporters activity and expression

研究代表者

片山 和浩 (KATAYAMA KAZUHIRO)

慶應義塾大学・薬学部・講師

研究者番号：40406963

研究成果の概要（和文）：P-糖タンパク質（P-gp）は ABC 輸送体に属する抗がん剤排出ポンプである。がん細胞における P-gp の発現増加は抗がん剤耐性の一因とされる。本研究では、P-gp の活性や発現の制御方法を調べ、P-gp 阻害薬の開発基盤を構築することを目的として遂行した。本研究では、(1) P-gp は SCF<sup>FBX15</sup> で認識され、Ube2r1/Cdc34/Ubc3 によるユビキチン化を受けてプロテアソームで分解されること、(2) タンパク質脱リン酸化酵素複合体 PP5/PPP2R3C は P-gp 発現を低下させることを見出した。

研究成果の概要（英文）：P-glycoprotein (P-gp) is a member of the ABC transporters and transports several anticancer drugs. Overexpression of P-gp in cancer cells contributes resistance to the anticancer agents. This study aimed to clarify the mechanisms of P-gp expression and activation, and the following mechanisms were found: (1) P-gp was recognized by SCFFBX15, ubiquitinated by Ube2r1/Cdc34/Ubc3 and then degraded by the proteasome; (2) expression of the protein dephosphorylation complex PP5/PPP2R3C lowered P-gp expression.

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：薬物動態・代謝学、ABC 輸送体

## 1. 研究開始当初の背景

P-糖タンパク質（P-gp/ABCB1; *MDR1* 遺伝子産物）や BCRP（Breast cancer resistance protein; ABCG2）は ABC 輸送体に属するトランスポーターである。ABC 輸送体は、肝臓・腎臓・消化管などの様々な正常部位の細胞膜表面に発現しており、種々の生理活性物質や生体異物の組織外移行・排泄という重要な役割を担っている。さらに、血液-脳関門、血液-胎盤関門、血液-精巣関門、造血幹細胞などでも ABC 輸送体は発現しており、生体の恒常性維持と、生体にとって重要な臓器・組織を異物や生理活性物質から守

る生体防御因子として機能している。一方で、がん細胞でもしばしば ABC 輸送体の高発現が認められており、抗がん剤耐性の一因となっている。ABC 輸送体が高発現しているがん細胞において抗がん剤耐性を克服するには、(1) ABC 輸送体の機能を阻害する、あるいは (2) ABC 輸送体の発現を抑制する必要がある。

(1)に関する研究は広く行われており、様々な生理活性物質や薬物が ABC 輸送体の機能に阻害することが報告されている。本研究室においてもフラボノイド類が BCRP の機能を阻害することを報告してきた。また、EGFR 阻害薬ゲフィチニブやエルロチニブ、

VEGFR/PDGFR 阻害薬スニチニブが BCRP や P-gp の機能を阻害することを報告してきた。また、他の研究グループからも、多くの低分子キナーゼ阻害薬が ABC 輸送体に対する阻害活性を有することが報告された。

一方、(2)に関する報告は乏しいのが現状であった。前述の生理活性物質の研究を進めていく中で、本研究室では、エストロゲン受容体陽性乳がん細胞株においてエストロゲンが P-gp や BCRP の発現を低下させることを見出していた。これをきっかけとして、他のシグナル分子による P-gp の発現制御を探索したところ、mitogen-activated protein kinase (MAPK)シグナル系が P-gp 発現を正に制御していることを見出した。実際に MAPK シグナル系を阻害薬や siRNA で阻害すると P-gp の発現低下が認められた。この P-gp 発現低下の原因として P-gp の分解亢進が示唆されたが、P-gp の分解メカニズムについては明らかになっておらず、本研究を遂行するに至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、P-gp の分解メカニズムを明らかにすることを目的とした。また、P-gp の発現制御に関する新しい知見を得るために、P-gp 結合タンパク質のスクリーニングで得られた分子について、P-gp の発現や活性への影響を調べることにした。以上から得られた知見を基として、P-gp を制御するシグナル系についてその全容を明らかにし、P-gp に対する新たな阻害薬の開発基盤を構築することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 使用した細胞株と細胞の樹立

内因性 P-gp を発現する細胞として、ヒト大腸がん細胞株 HCT-15 と SW620-14、ヒト卵巣がん細胞株 OVCAR-8、ヒト胎児腎細胞株 HEK293 細胞を使用した。恒常的な外因性 P-gp 発現細胞として、MDR1 遺伝子をレトロウイルスで導入した 293/MDR 細胞を樹立した。また、MDR1 遺伝子の 3'-末端に 6xHis タグを付加した MDR1 遺伝子をヒト繊維肉腫細胞 HT1080 にレトロウイルスで導入し、恒常的な外因性 P-gp 発現細胞 HT1080/3HisMDR 細胞も樹立した。

### (2) P-gp 結合タンパク質のスクリーニング

Yeast Two Hybrid (Y2H) スクリーニングおよび免疫沈降-MALDI/TOF MS 解析により、P-gp の C-末端に存在する細胞内領域 (P-gp C-ter) に結合するタンパク質を探索した。Y2H においては P-gp C-ter を bait として、一般的な方法によりスクリーニングを

行った。免疫沈降-MALDI/TOF MS 解析では、FLAG-HA タグを付加した P-gp C-ter を HEK293 細胞に一過性発現させ、その cell lysate より抗 FLAG 抗体、抗 HA 抗体で順次精製した。精製したタンパク質を SDS-PAGE し、CBB 染色により P-gp C-ter および共沈タンパク質を確認した。各バンドを切り出してトリプシン消化後、MALDI/TOF MS による質量分析を行った。

### (3) 免疫沈降-ウエスタンブロット

スクリーニングで得られた候補タンパク質が細胞内で実際に全長 P-gp (野生型) と結合するか、免疫沈降-ウエスタンブロット法により確認した。薬剤処理や siRNA/cDNA 導入による細胞内 P-gp の発現量変化はウエスタンブロットにより検討した。また、P-gp のユビキチン化の検討は免疫沈降-ウエスタンブロット法により調べた。

### (4) フローサイトメトリー

細胞膜表面の P-gp 発現量はフローサイトメトリーにより調べた。また、P-gp の蛍光基質である rhodamine 123 を細胞に取り込ませ、細胞内に残存する rhodamine 123 量をフローサイトメトリーで解析することにより、P-gp のトランスポート活性の変化を調べた。

### (5) 抗がん剤感受性試験

siRNA 導入による P-gp のトランスポート活性の変化について、抗がん剤感受性試験により検討した。細胞に siRNA を導入して 24 時間培養した後に、24-well plate に細胞を播種しなおした。細胞が接着後、vincristine や doxorubicin を添加して 3 日間培養し、生存細胞を WST-8 assay により調べた。有意差検定は、Student's t-test を行った。

## 4. 研究成果

### (1) P-gp 結合タンパク質のスクリーニング

Y2H スクリーニングでは 8 遺伝子を同定した。しかし、この中にはタンパク質分解に関連する分子はなかった。

免疫沈降-MALDI/TOF MS 解析では独立した 2 回の実験により 22 種類の候補タンパク質を同定した。このうち、F-box protein FBXO15、ubiquitin-specific peptidase 16 (USP16)、calpain 7 の 3 種類がタンパク質分解に関与する候補として同定できた。このうち、細胞内において FBXO15 は P-gp と結合したが、USP16 と calpain 7 は P-gp との結合しなかった。

protein phosphatase 2, regulatory subunit B, gamma (PPP2R3C)は、Y2H および免疫沈降-MALDI/TOF MS の両スクリーニングにおいて同定された。

## (2) P-gp の分解メカニズムの解析

P-gp の分解におけるユビキチン-プロテアソーム系とオートファジーの関与について検討した。プロテアソーム阻害剤 MG132、lactacystin、bortezomib は、HCT-15、SW620-14 の内因性 P-gp 発現を増加させた。また、HT1080/3HisMDR において、MG132、lactacystin、bortezomib 処理は外因性 P-gp 発現を増加させた。一方で、オートファジーを阻害する bafilomycin A1 処理は内因性および外因性 P-gp の発現量に影響を与えなかった。

P-gp のユビキチン化を調べたところ、ポリユビキチン化 P-gp を検出した。また、タンパク質合成阻害剤シクロヘキシミド単独処理とシクロヘキシミドと MG132 の同時処理における P-gp の発現消失を検討したところ、MG132 存在下では非存在下と比較して消失が遅れた。このことから、P-gp はユビキチン-プロテアソーム系で分解されることが示唆された。

P-gp のユビキチン-プロテアソーム系での分解における FBXO15 の関与について調べたところ、FBXO15 を siRNA によりノックダウンすると MG132 存在下でユビキチン化 P-gp は減少し、FBXO15 を一過性発現させるとユビキチン化 P-gp は増加した。また、FBXO15 をノックダウンするとプロテアソーム阻害剤非存在下では *MDR1* mRNA 量に影響を与えることなく、細胞膜上の P-gp および P-gp の全タンパク質の発現量が増加した。

一般的にタンパク質のユビキチン化において、E-box タンパク質を含むユビキチン E3 リガーゼが基質タンパク質とユビキチン結合タンパク質 E2 との橋渡しをし、E2 が基質タンパク質をユビキチン化する。このことから、P-gp のユビキチン化における E2 タンパク質を同定するために P-gp および FBXO15 の両方と共沈する E2 タンパク質を免疫沈降-ウエスタンブロット法によりスクリーニングしたところ、Ube2r1/Cdc34/Ubc3 を同定した。Ube2r1 をノックダウンした際の MG132 存在下でのユビキチン化 P-gp について調べた結果、FBXO15 と同様に Ube2r1 の発現減少に伴ってユビキチン化 P-gp 量も減少した。さらに、MG132 非存在下では Ube2r1 のノックダウンにより P-gp の発現量が増加した。

P-gp のトランスポート活性について、rhodamine 123 を用いたフローサイトメトリー解析を行ったところ、FBXO15 をノックダウンすることにより細胞内 rhodamine 123 量が減少した。また、抗がん剤感受性試験を行った結果、FBXO15 をノックダウンすることにより vincristine に対する感受性が有意に低下した。

以上の結果およびこれまでの知見から、FBXO15 を含む E3 リガーゼ複合体 SCF<sup>FBX15</sup> が P-gp と Ube2r1 を橋渡しし、Ube2r1 が P-gp をユビキチン化することが明らかになった。また、このユビキチン化サイクルを繰り返すことにより P-gp はポリユビキチン化され、プロテアソームで分解を受けることが明らかになった。ABC 輸送体の中では CFTR がユビキチン-プロテアソーム系やオートファジーで分解されることが報告されているが、P-gp の分解メカニズムに関する報告は本研究成果が初めてである。

P-gp は一塩基置換体 (SNP) が多数報告されており、その中にはトランスポート活性ものや発現が低下するようなものもある。SNP 型の P-gp も同じように分解されるのか、今後検討していく必要がある。

## (3) PP5/PPP2R3C による P-gp の発現解析

PPP2R3C は protein phosphatase (PP) 2A や PP5 の活性制御サブユニットであり、PP2A や PP5 とヘテロダイマーあるいはヘテロトリマーを形成して脱リン酸化活性を示す。そこで、P-gp C-ter と PP2A $\alpha$ 、PP2A $\beta$ 、PP5、PPP2R3C の細胞内での結合について、HEK293 細胞を用いた一過性発現系で検討した。PP5 および PPP2R3C は P-gp C-ter と共沈したが、PP2A $\alpha$  と PP2A $\beta$  は P-gp C-ter と共沈しなかった。このことから、PP5/PPP2R3C 複合体が P-gp C-ter と結合していることが示唆された。続いて PP5 と PPP2R3C のどちらが P-gp C-ter と直接結合しているのかを調べるため、それぞれの siRNA 導入細胞での共沈実験を行った。PP5 をノックダウンすると P-gp C-ter と共沈してくる PPP2R3C 量は減少したが、PPP2R3C をノックダウンしても P-gp C-ter と共沈してくる PP5 量は変化しなかった。したがって、P-gp C-ter と PPP2R3C の結合は PP5 が介在していることが明らかになった。

PP5 siRNA あるいは PPP2R3C siRNA を導入した細胞での P-gp の発現量についてフローサイトメトリーで解析したところ、内因性 P-gp を発現する HCT-15、SW620-14、OVCAR-8、HEK293 細胞のいずれの細胞株でも細胞膜表面の P-gp 発現量は増加した。また、ウエスタンブロットにおいて HCT-15 および HEK293 細胞で PP5 あるいは PPP2R3C をノックダウンすると P-gp の発現量は増加し、両者を同時にノックダウンするとさらに P-gp 発現量が増加した。それに伴い、細胞内の rhodamine 123 量は低下した。さらに、vincristine および doxorubicin に対する感受性も PP5/PPP2R3C をノックダウンすることにより有意に低下した。

以上より、PP5/PPP2R3C は P-gp の発現を負に制御することが明らかになった。P-gp

はある種のキナーゼによってリン酸化を受け、分解が抑制されることにより安定化していることが報告されている。今後、PP5/PPP2R3C による P-gp の脱リン酸化により安定化を解除されるのか、脱リン酸化された P-gp はユビキチン-プロテアソームで分解されるのかを検討する。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- (1) Katayama K, Noguchi K, Sugimoto Y. FBXO15 regulates P-glycoprotein/ABCB1 expression through the ubiquitin-proteasome pathway in cancer cells. *Cancer Sci*, 104: 694-702, 2013. DOI: 10.1111/cas.12145. 査読あり
- (2) Kawanobe T, Kogure S, Nakamura S, Sato M, Katayama K, Mitsuhashi J, Noguchi K, Sugimoto Y. Expression of human ABCB5 confers resistance to taxanes and anthracyclines. *Biochem Biophys Res Commun*, 418: 736-741, 2012. DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.01.090. 査読あり
- (3) Masuda Y, Noguchi K, Segawa H, Tanaka N, Katayama K, Mitsuhashi J, Sugimoto Y. Novel regulatory role for Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded vFLIP in chemosensitization to bleomycin. *Biochem Biophys Res Commun*, 415: 305-312, 2011. DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.10.050. 査読あり
- (4) Yasuda A, Noguchi K, Minoshima M, Kashiwazaki G, Kanda T, Katayama K, Mitsuhashi J, Bando T, Sugiyama H, Sugimoto Y. A DNA ligand designed to antagonize EBNA1 represses Epstein-Barr virus-induced immortalization. *Cancer Sci*, 102: 2221-2230, 2011. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2011.02098.x. 査読あり

[学会発表] (計 21 件)

- (1) 片山和浩、野口耕司、杉本芳一. PP5/PPP2R3C による P-糖タンパク質/ABCB1 の発現と活性制御、日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月 27~30 日、横浜
- (2) 片山和浩、野口耕司、杉本芳一. FBXO15 による P-糖タンパク質/ABCB1 の分解制御、第 71 回日本癌学会学術総会、2012 年 9 月 19~21 日、札幌
- (3) 片山和浩、野口耕司、杉本芳一. P-糖タンパク質に対するユビキチン E3 リガーゼ FBXO15 の同定と機能解析、第 16 回日本がん分子標的治療学会、2012 年 6 月 27~29 日、北九州

- (4) Katayama K, Noguchi K, Sugimoto Y. FBXO15 is an F-box protein in E3 ligase complex for P-glycoprotein. AACR Annual Meeting 2012, 2012. 3. 31-2012. 4. 4, Chicago, IL, USA.
- (5) 片山和浩、野口耕司、杉本芳一. P-糖タンパク質/ABCB1 結合タンパク質の同定、第 70 回日本癌学会学術総会、2011 年 10 月 3~5 日、名古屋

## 6. 研究組織

- (1) 研究代表者  
片山 和浩 (KATAYAMA KAZUHIRO)  
慶應義塾大学・薬学部・講師  
研究者番号：40406963
- (2) 研究分担者  
なし
- (3) 連携研究者  
なし