

# 金沢大学がん研究所共同研究成果報告書

平成 21 年 4 月 1 日提出

対象研究テーマ：幹細胞あるいはがん幹細胞の特定・可視化に関する研究

研究期間： 2008 年 11 月 1 日～2009 年 3 月 31 日

研究題目 がん幹細胞の機能および抗がん剤耐性に関する ABC 輸送体に関する研究

研究代表者 慶應義塾大学薬学部 杉本芳一

研究成果の概要：

ヒト ABCB5 の全長である ABCB5-1257 の発現ベクターおよび遺伝子導入細胞の作成を行った。ABCB5-1257 は、160 kDa、>300 kDa のタンパク質として細胞に発現した。また、ABCB5-EGFP は細胞膜上に局在した。組織由来 cDNA library を用いた PCR により、prostate、testis で、ABCB5-1257 cDNA の 5' 側 (-117-457) の発現が確認された。また、heart、placenta、lung、liver、pancreas、spleen、thymus、prostate、testis、ovary、small intestine、colon で、ABCB5 の 3' 側 (2543-3026) の発現が確認された。よって、ABCB5-1257 は、特に prostate と testis に高発現する ABC 輸送体と考えられる。

研究分野：がん分子標的治療、がん幹細胞

キーワード：がん幹細胞、抗がん剤耐性、ABC 輸送体、ABCB1、ABCB5、ABCG2

## 1. 研究開始当初の背景

近年、がん幹細胞が存在することが知られ、この分野の研究が活性化している。また、幹細胞における ABC 輸送体 (ATP-binding cassette transporter) の発現について、興味ある知見が得られている。

P-糖タンパク質 (P-gp、ABCB1) は、細胞膜を 6 回貫通する膜貫通領域と細胞内の ATP 結合領域をそれぞれ 2 個ずつ持つ、ABC 輸送体である。P-gp は、ATP の加水分解のエネルギーを利用して種々の抗がん剤を細胞外に排出するポンプとして働く。また、BCRP (breast cancer resistance protein、ABCG2) は、細胞膜を 6 回貫通する膜貫通領域と細胞内の ATP 結合領域をそれぞれ 1 個ずつ、すなわち P-gp の半分の構造を持つ ABC 輸送体であり、2 量体として機能する。BCRP は、irinotecan、gefitinib などの抗がん剤を細胞外に排出するポンプであるが、Hoechst 33342 を細胞外に排出する能力も持つ。

造血幹細胞は Hoechst 33342 で染色されない side population cell 中にある。この Hoechst 33342 排出活性が BCRP そのものであることが明らかになったことより、BCRP は造血幹細胞のマーカーそのものと位置づけられている。また、造血幹細胞以外の種々の幹細胞においても、Hoechst 33342 で染色されない性質、すなわち BCRP 発現が、幹細胞の

重要なマーカーとなっていることが多い。

また、造血幹細胞より少し分化の進んだ造血前駆細胞は、Rhodamine 123 で染色されない細胞であるが、この Rhodamine 123 排出活性は、P-gp が担う。

こうした研究結果より、ABC 輸送体の発現は、幹細胞機能維持と密接に関わっていると考えられている。

2003 年に Harvard 大のグループによりクローニングされたヒトの ABCB5 cDNA は、2906 nucleotides よりなり、812 アミノ酸のタンパク質をコードしていた。この ABCB5 を、ABCB5-812 と呼ぶ。ヒト乳がん細胞 MCF-7 に ABCB5-812 cDNA を導入したところ、Rhodamine 123 の細胞内蓄積が低下した。また、同じグループは、ABCB5-812 発現細胞を抗 ABCB5 抗体で処理すると doxorubicin の排出が低下することから、ABCB5 は doxorubicin の排出に関与していると報告した。

一方、2008 年になって、ABCB5 が melanoma stem cell に発現しているという論文が出された。これにより、ABCB5 は、幹細胞研究と抗がん剤耐性の研究の両方において、非常に注目される遺伝子となった。

しかし、この ABCB5-812 の N 末付近には、P-gp の N 末側の ATP 結合部位にある Walker B motif と相同性のある配列が認められた。これは、この ABCB5-812 が partial peptide であることを示唆する。我々は、こうした背景

のもとに、ヒト精巢の cDNA ライブラリーより、ABCB5 の cDNA をクローニングした。得られたヒトの ABCB5 cDNA は、5184 nucleotides からなり、1257 アミノ酸のタンパク質をコードしていると推定された (GenBank 登録番号 AB353947)。

## 2. 研究の目的

本研究では、ABCB5 の遺伝子導入細胞を作成し、その生理機能を明らかにすることを目的とする。また、ABCB5 のレトロウイルス発現系を構築し、幹細胞研究に応用する。

## 3. 研究の方法

### (1) HEK293/Myc-ABCB5 細胞の作成

ABCB5-1257 の N 末側に c-Myc-tag を付けた Myc-ABCB5-1257 cDNA を作成した。この cDNA を発現ベクターである pCAL-IRES-ZEO に組み込んだ。pCAL-Myc-ABCB5-IRES-ZEO をヒト胎児腎由来 HEK293 細胞に遺伝子導入した。Zeocin で選択して得られた細胞を HEK293/Myc-ABCB5-mix とした。さらに、限界希釈法により ABCB5-1257 高発現クローンを得た。

### (2) HEK293/ABCB5-EGFP 細胞の作成

ABCB5-1257 cDNA の 3' 側の終止コドンを除いた cDNA を pEGFP-N2 に組み込むことにより、ABCB5-EGFP cDNA を作成した。pEGFP-N2-ABCB5 を HEK293 細胞に遺伝子導入した。

### (3) 細胞における ABCB5-1257 タンパク質の発現確認

Myc-ABCB5-1257 の発現は、抗 c-Myc 抗体を用いた Western blot により確認した。ABCB5-EGFP の発現は、FACS 及び抗 EGFP 抗体を用いた Western blot により確認した。

### (4) ABCB5-EGFP タンパク質の局在

チャンバースライドに HEK293 細胞を巻き、翌日 pEGFP-N2-ABCB5 あるいは pEGFP-N2 を遺伝子導入した。48 時間後に、EGFP による蛍光を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

### (5) ABCB5 cDNA の組織発現

MTC Multiple Tissue cDNA Panels を用いて、ABCB5-1257 cDNA の 5' 側 (-117-457) および 3' 側 (2543-3026) を PCR で増幅させた。得られた PCR 産物で 2nd PCR を行い、各組織における発現を確認した。

## 4. 研究成果

ABCB5-1257 遺伝子導入細胞の Western blot の結果、Myc-ABCB5-1257 は 160 kDa、>300 kDa のタンパク質として検出された。また、ABCB5-EGFP は、200 kDa、>300 kDa のタンパク質として検出された。

pEGFP-N2-ABCB5 を導入した細胞では、細胞膜上に蛍光が観察された。よって、ABCB5-EGFP は細胞膜タンパク質と結論された。一方、pEGFP-N2 を導入して EGFP 単独を発現させた細胞では、細胞全体に蛍光がみられた。

ABCB5-1257 cDNA の 5' 側 (-117-457) の発現は prostate、testis で確認された。3' 側 (2543-3026) の発現は heart、placenta、lung、liver、pancreas、spleen、thymus、prostate、testis、ovary、small intestine、colon で確認された。よって、ABCB5-1257 は、特に prostate と testis に高発現する ABC 輸送体と考えられる。また、ABCB5-812 は、種々の組織で広く発現していると考えられる。

今回の研究で作成した ABCB5-1257 発現ベクターおよび ABCB5-1257 発現細胞を用いて、今後、ABCB5-1257 による抗がん剤耐性の検討や輸送基質の探索などを行う予定である。

## 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 5 件)

・Mashima T, Sato S, Sugimoto Y, Tsuruo T, Seimiya, H. Promotion of glioma cell survival by acyl-CoA synthetase 5 under extracellular acidosis conditions. *Oncogene*, 28: 9-19, 2009.

・Noguchi K, Katayama K, Mitsuhashi J, Sugimoto Y. Functions of BCRP in cancer chemotherapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61: 26-33, 2009.

・Katayama K, Shibata K, Mitsuhashi J, Noguchi K, Sugimoto Y. Pharmacological Interplay between breast cancer resistance protein and gefitinib in epidermal growth factor receptor signaling. *Anticancer Res*, 2009, in press.

・Kato, N, Suzuki H, Takagi H, Asami Y, Kakeya H, Uramoto M, Usui T, Takahashi S, Sugimoto Y, Osada H. Identification of cytochrome P450s required for fumitremorgin biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*. *Chembiochem*, 2009, Feb 18. [Epub ahead to print]

・Takeshita A, Shinjo K, Yamakage N, Ono T, Hirano I, Nakamura S, Shigeno K, Tobita T, Maekawa M, Ohnishi K, Sugimoto Y, Ohno R. Cell cycle features and quantitative alteration of target molecules of malignant B cells treated with inotuzumab ozogamicin (CMC544) alone or in combination with rituximab. *Leukemia*, 2009, in press.

〔学会発表〕（計 3 件）

・河原はる香，野口耕司，片山和浩，三橋純子，杉本芳一．Sunitinib が薬剤排出トランスポーターの活性に及ぼす影響．日本薬学会第 129 年会（京都），要旨集 4，p173，2009/03.

・俵夕奈，河村容子，片山和浩，三橋純子，野口耕司，杉本芳一．P-糖タンパク質の発現を制御する遺伝子の探索．日本薬学会第 129 年会（京都），要旨集 4，p173，2009/03.

・初谷香織，大石智一，杉本芳一，鶴尾隆，清宮啓之．ポリ (ADP-リボシル) 化酵素タンキラーゼ 1 の自己多量体化によるテロメア機能の調節．日本薬学会第 129 年会 (京都)，要旨集 3，p123，2009/03.

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 2 件）

- ・ABCトランスポーター蛋白質発現抑制剤  
（国際出願中）
- ・癌の予防及び治療剤  
（国際出願中）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

特になし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

慶應義塾大学薬学部 教授 杉本芳一

### (2) 研究分担者

### (3) 本研究所担当者

金沢大学がん研究所 教授 矢野聖二