

論 文 要 旨

Copper-transporting P-type ATPase, ATP7A, Confers Multidrug Resistance and its Expression is Related to Resistance to SN-38 in Clinical Colon Cancer

〔銅トランスポーターATP7Aの発現で細胞は抗癌剤多剤耐性となる、さらにATP7Aの発現の有無はヒト大腸癌症例のSN-38に対する抵抗性と相関する〕

阿久根 哲

【序論および目的】

癌細胞の抗癌剤に対する耐性は癌治療の大きな障害となっている。臨床的に多くの癌に用いられるシスプラチン(CDDP)とCPT-11に対する耐性は臨床的に重要な問題である。銅輸送体蛋白質ATP7A、ATP7Bはともにゴルジに存在するP型のATPaseで、銅を細胞質からゴルジに取り込む働きをしている。ATP7Aは銅欠乏により重篤な神経症状を呈する小児の疾患であるメンケス病、ATP7Bは銅の異常な蓄積によって肝障害、神経障害をきたすウィルソン病の原因遺伝子である。銅トランスポーターATP7Bを高発現した細胞のCDDPに対する耐性、ATP7Bの類縁タンパク質であるATP7AのCDDPに対する耐性が報告されている。今回、ATP7A高発現細胞の抗癌剤耐性と薬剤輸送の機構について調べ、さらにヒト大腸癌でATP7A、MRP1、BCRPの発現と抗癌剤CDDPとCPT-11の活性型分子SN-38に対する耐性度との相関について検討した。

【材料および方法】

- 1) 細胞は親株CHO-K1細胞とそのATP7Aの高発現細胞CHO/pCMB117細胞、ATP7Aの中程度発現細胞CHO/615Dおよびメンケス病患者由来の線維芽細胞Me32a-T22/2LとそのATP7A発現細胞Me32/pCMB117を用いた。
- 2) 抗癌剤に対する耐性度はMTTアッセイを用いて調べた。細胞の生存率が50%となる薬剤濃度 IC_{50} を親株の IC_{50} と比較して、相対耐性度とした。
- 3) ATP7Aの発現はイムノブロット法で、抗癌剤耐性と関連したトランスポーターP-gp、MRP1、BCRP、MRP4の発現はイムノブロット法とRT-PCRで調べた。
- 4) 赤い蛍光を発するDOXの細胞内局在は、コンフォーカル蛍光顕微鏡を用いて観察し、核はHoechst33342をゴルジはC6-NBD-Ceramidを用いて染色した。ERからゴルジへの輸送を阻害するBrefeldinAあるいは Na^+/H^+ ionophoreであるmonensinを作用させたと時のDOXの細胞内局在についても検討した。
- 5) CHO-K1細胞とCHO/pCMB117細胞を用いて、SN-38, Doxorubicine (DOX), Taxol, Vincristin (VCR)の細胞内の蓄積と排出について、SN-38はHPLCによって定量し、DOX, Taxol, VCRはそれぞれ $[^{14}C]$ -DOX, $[^3H]$ -Taxol, $[^3H]$ -VCRを用いて定量した。
- 6) CHO-K1細胞とCHO/pCMB117細胞の膜小胞を用いて、SN-38の取り込みについて検討した。
- 7) 鹿児島大学で手術を受けた術前の抗癌剤治療のないヒト進行大腸癌症例34例について癌部と非癌部について、免疫組織染色によってATP7A, MRP1, BCRP1の発現を検討した。
- 8) これらの腫瘍について *ex vivo*の抗癌剤耐性アッセイであるHDRA (histocultural drug response assay) によって特に臨床で用いられるCPT-11の活性化型であるSN-38は $0.4 \mu\text{g/mL}$ とCDDPは $20 \mu\text{g/mL}$ による増殖阻害効果を検討した。ATP7A, MRP1, BCRP1の発現と抗癌剤の増殖阻害効果の間に相関があるかどうかを検討した。

【結果】

- 1) ATP7A 高発現細胞の抗癌剤多剤耐性：ATP7A 高発現細胞は SN-38, Taxol, Vincristin, Dox, VP-16 など広範に、また構造的に関連のない抗癌剤について高い耐性を示し、多剤耐性となった。
- 2) 薬剤輸送体蛋白質の発現：ATP7A 高発現細胞では P-gp, MRP1, BCRP の蛋白質の発現は見られなかった。MRP4 は親株と大きな違いはなかった。
- 3) DOX の細胞内局在と BrefeldinA, Monensin の効果：親株細胞では DOX は強く核に局在するが、ATP7A 高発現細胞では DOX の蛍光が全体に弱く、核外に点状に観察された。DOX とゴルジのマーカである NBD-C6-Ceramid の局在はよく一致していた。これらの結果は抗癌剤 DOX と SN-38 がゴルジに取り込まれていることを示唆していた。
- 4) DOX と SN-38 の細胞内蓄積と排出：ATP7A 高発現細胞の DOX と SN-38 の細胞内蓄積は親株細胞と比較して有意に低下し、CHO/pCMB117 細胞の 60 分後では DOX と SN-38 の細胞内濃度は 8% と 52.4% で、CHO-K1 細胞での 78.5% と 72.4% に比較して排出は高まっていた。ATP7A 高発現細胞の膜小胞による SN-38 の取り込みは 15 分後に 1.45 倍と上昇していた。一方、Taxol, VCR は蓄積、排出ともに差がなかった。
- 5) DOX の細胞内局在と BrefeldinA, Monensin の効果：ATP7A 高発現細胞の DOX の局在が小胞輸送機能に依存しているのかどうかを明らかにするために、Brefeldin A, Monensin を作用させて、DOX の局在を観察した。ATP7A 高発現細胞に Brefeldin A を作用させると部分的に、Monensin を作用させるとはほぼ完全に DOX は核に局在するようになった。これらの結果から、ATP7A 高発現細胞での DOX のゴルジへの局在は少なくとも一部は小胞輸送機能に依存しているものと考えられた。
- 6) ヒト大腸癌症例での ATP7A の発現：ヒト大腸癌 34 例で検討した結果、ATP7A は非癌部には発現していなかったが、癌部では 23.5% で発現が見られた。
- 7) ATP7A の発現と抗癌剤増殖促成効果：ATP7A の発現していなかった大腸癌 26 例では HDRA によって CDDP と SN-38 により効果ありと判定された症例はそれぞれ 3 例と 12 例であった。一方、ATP7A の発現していた大腸癌 8 例ではいずれの抗癌剤でも効果ありと判断されたものは一例もなかった。ATP7A の発現は SN-38 に対する耐性と高い相関があったが、CDDP に対する耐性との相関は見られなかった。MRP1, BCRP の発現はいずれの抗癌剤の耐性に有意な相関はなかった。

【結論及び考察】

ATP7A 高発現細胞では多くの種類の抗癌剤に耐性となり、多剤耐性を示した。また、その耐性度は P-gp, MRP1, BCRP などの他の輸送体蛋白質で報告されている耐性のスペクトラムとは異なっていた。CHO-K1 細胞と CHO/pCMB117 細胞、CHO/615D 細胞の耐性度と ATP7A の発現量を比較すると、それぞれの抗癌剤に対する耐性度は ATP7A の発現量と相関がみられた。銅およびシスプラチンに対する耐性度は他の抗癌剤と比較して高くなかった。銅は ROS の産生による膜障害性を起こすと予想されるので耐性度が高くないものと考えられる。

細胞内の DOX の局在変化と小胞への取り込み実験の結果から、SN-38 と DOX が ATP7A 依存的にゴルジに取り込まれ隔離されることで、ATP7A は抗癌剤耐性になるものと考えられた。SN-38 と DOX は排出が亢進しており、小胞輸送を介して排出されていると考えられたが、Taxol, VCR は蓄積と排出に差がなく、排出の亢進が耐性に果たす役割は今後の検討を有する。Brefeldin A と Monensin によって ATP7A 発現細胞の DOX の細胞内局在を変化させることができた。Monensin が小胞の酸性化を阻害して抗癌剤耐性を克服する作用があることが報告されている。小胞の酸性化は弱塩基性の抗癌剤の小胞内への保持に重要であると考えられるが、その詳細な機構は不明である。ATP7A はゴルジへの薬剤輸送ポンプである可能性がある。

大腸癌症例で臨床的によく用いられる CDDP と SN-38 に注目して、これらの *ex vivo* の効果と MRP1, BCRP と ATP7A の発現との関連を調べた。ATP7A の発現している症例は SN-38, CDDP ともに有効な症例は一例もなかった。また、ATP7A の発現の有無は *ex vivo* の SN-38 に対する抵抗性と関連していた。一方、CDDP に対してはいずれの大腸癌症例も感受性が低く、ATP7A 以外に CDDP に対する耐性因子が多く存在することを示唆している。今回の結果から腫瘍での ATP7A の発現の有無を調べることは抗癌剤選択のための有用な情報となると考えられる。

ATP7A の関与する薬剤輸送は重要な薬剤輸送経路であり、これまで小胞輸送を介する薬剤に輸送系はあまり注目されてこなかったが、広範な薬剤が小胞輸送を介して排出される可能性を示している。膀胱癌と高浸潤性乳癌で ATP7A の高発現が報告されており、ATP7A の発現は多剤耐性以外の悪性度に関連している可能性もある。

論文審査の要旨

報告番号	医研 第 673 号	氏名	阿久根 哲
審査委員	主査	山田 勝士	
	副査	米澤 傑	有馬 直道

Copper-transporting P-type ATPase, ATP7A, Confers Multidrug Resistance and its Expression is Related to Resistance to SN-38 in Clinical Colon Cancer

(銅トランスポーターATP7Aの発現で細胞は抗癌剤多剤耐性となる、さらにATP7Aの発現の有無はヒト大腸癌症例のSN-38に対する抵抗性と相関する)

癌細胞の抗癌剤に対する耐性は癌治療の大きな障害となっている。臨床的に多くの癌に用いられるシスプラチン (CDDP) とイリノテカン (CPT-11) に対する耐性は臨床的に重要な問題である。銅輸送体蛋白質 ATP7A, ATP7Bはともにゴルジに存在するP型のATPaseで、銅を細胞質からゴルジに取り込む働きをしている。銅トランスポーターATP7Bを高発現した細胞のCDDPに対する耐性、ATP7Bの類縁タンパク質であるATP7AのCDDPに対する耐性が報告されている。今回、学位申請者らはATP7A高発現細胞の抗癌剤耐性と薬剤輸送の機構について調べ、さらにヒト大腸癌でATP7A, MRP1, BCRPの発現と抗癌剤CDDPとCPT-11の活性型分子SN-38に対する耐性度との相関について検討した。

CHO細胞とATP7A高発現CHO細胞およびメンケス病患者由来の線維芽細胞Me32a-T22/2LとそのATP7A高発現細胞Me32/pCMB117を用いた。抗癌剤に対する耐性度はMTTアッセイを用いて調べた。抗癌剤耐性と関連した他のトランスポーターの発現はイムノプロットとRT-PCRで調べた。ドキソルビシン (DOX) の細胞内局在は、コンフォーカル蛍光顕微鏡を用いて観察した。SN-38とDOXの蓄積・排出を検討した。さらにヒト大腸癌34例について免疫組織染色によるATP7A, MRP1, BCRPの発現とHDRAによってex vivoの抗癌剤耐性度との関連を検討し、以下の知見を明らかにした。

- 1) ATP7A 高発現細胞は多剤耐性となった。
- 2) ATP7A 高発現細胞では P-gp, MRP1, BCRP の蛋白質の発現は見られなかった。MRP4 は親株と大きな違いはなかった。
- 3) 親株細胞では DOX は強く核に局在するが、ATP7A 高発現細胞では DOX の蛍光が全体に弱く、核外に点状に観察された。DOX とゴルジのマーカである NBD-C6-Ceramid の局在はよく一致していた。これらの結果は抗癌剤 DOX と SN-38 がゴルジに取り込まれていることを示唆していた。
- 4) ATP7A 高発現細胞の DOX と SN-38 の細胞内蓄積は親株細胞と比較して有意に低下し、排出は高まっていた。ATP7A 高発現細胞の膜小胞による SN-38 の取り込みは上昇していた。一方、パクリタキセル (Taxol), ビンクリスチン (VCR) は蓄積、排出ともに差がなかった。
- 5) ATP7A 高発現細胞の DOX の局在が小胞輸送機能に依存しているのかどうかを明らかにするために、Brefeldin A, Monensin を作用させて、DOX の局在を観察した。ATP7A 高発現細胞に Brefeldin A を作用させると部分的に、Monensin を作用させるとほぼ完全に DOX は核に局在するようになった。これらの結果から、ATP7A 高発現細胞での DOX のゴルジへの局在は少なくとも一部は小胞輸送機能に依存しているものと考えられた。
- 6) ヒト大腸癌 34 例で検討した結果、ATP7A は非癌部には発現していなかったが、癌部では 23.5%で発現が見られた。
- 7) ATP7A の発現していなかった大腸癌 26 例では HDRA によって CDDP と SN-38 により効果ありと判定された症例はそれぞれ 3 例と 12 例であった。一方、ATP7A の発現していた大腸癌 8 例ではいずれの抗癌剤でも効果ありと判断されたものは一例もなかった。ATP7A の発現は SN-38 に対する耐性と高い相関があったが、CDDP に対する耐性との相関は見られなかった。MRP1, BCRP の発現はいずれの抗癌剤の耐性に有意な相関はなかった。

ATP7Aの関与する薬剤輸送は重要な薬剤輸送経路であり、また、ATP7Aの発現は抗癌剤選択の有用な情報となると考えられる。ATP7Aは銅の取り込みに関与する蛋白質であるのにSN-38のような金属を含まない薬剤の輸送に関与することを示した点も興味深い。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	医研 第 673 号	氏名	阿久根 哲
審査委員	主査	山田 勝士	
	副査	米澤 傑	有馬 直道

主査および副査の3名は、平成20年8月20日、学位申請者 阿久根 哲君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) この細胞株は自分たちで樹立したのか？大腸癌あるいは人のがん細胞由来のATP7A発現細胞株を用いなかったのはなぜか？

(回答) これらの細胞株はすべて共著者であるオーストラリアの研究者から提供されたものある。今回は人のがん細胞では検討を行っていない。

質問2) Cell typeが異なると抗癌剤耐性も異なる可能性があるが、in vitroの実験ではCHO細胞や人線維芽細胞を用いて、臨床検体は大腸癌を用いているのはなぜか？

(回答) すでに共著者によって樹立されていた発現細胞を用いてin vitroの実験を行った。複数のATP7A発現細胞株で抗癌剤耐性になることを見いだしており、細胞株による大きな違いはないものと考えている。少数だが免疫組織学的検討で、前立腺癌、乳癌、肺癌、大腸癌、卵巣癌などでATP7Aの発現が報告されていた。今回はex vivoの実験も計画していたので、外科として検体の入手が比較的容易な大腸癌を用いた。

質問3) ATP7Aは銅の取り込みに関与する蛋白質であるのに、なぜSN-38のような金属を含まない薬剤の輸送に関与するのか？

(回答) 詳細は不明であるが、膜小胞を用いた実験でATP7A 発現細胞由来の膜小胞がより多くのSN-38の輸送を行うことを確認した。ただし、ATP7Aが直接輸送していることは証明できていないので、今後検討したい。

質問4) Taxol, VCRでは蓄積の低下、排泄の上昇が見られなかった。これらの抗癌剤に対する耐性にゴルジとマイクロチューブルが関連しているかもしれないとのことだが、どんなことが関連しているのか？

(回答) Taxol, VCR はマイクロチューブルに作用する薬剤である。ゴルジにあるATP7Aが高発現することで小胞輸送系の活性化が起こり、マイクロチューブルの発現あるいは活性の上昇が起こっていることがこれらの薬剤に対する耐性と関連しているかもしれないと予想している。

質問5) 生存のアッセイに用いられたMTTアッセイの原理は？

(回答) ミトコンドリアの還元酵素によって黄色のMTTは青い不溶性のファオマザンになり、その色を比較することで細胞の生存率を調べている。

質問6) 文献的に大腸癌細胞株のATP7Aの発現細胞を使った研究があるのか？

(回答) 培養系については卵巣癌細胞のATP7Aの発現細胞を用いて、CDDPなど白金誘導体について調べた論文はあるが、大腸癌細胞株について調べた報告、種々の抗癌剤について調べた報告はない。

質問7) 3割弱の腫瘍がATP7A抗体で染まるなら、染まらない腫瘍は抗癌剤が効くと考えて良いのか？

(回答) 今回の結果からSN-38については、発現のない症例では有意に効果があると考えられるが、耐性になる他の原因分子もあると考えられる。従って、他の抗癌剤についてはATP7Aが発現していないだけでは効果があると断定することはできない。

質問8) 胃の壁細胞、腎の近位尿細管、睾丸のライデッヒ細胞などはいろいろな抗体で染まることを経験しているが、そういった部位の染色性はどうか？また、正常で染まる部位は抗癌剤の副作用を受けにくいと考えてよいのか？

(回答) 正常組織については小腸、脾、肺について検討したが、小腸は染色された。脾は細胞質の染色性から非特異的と考えている。肺は染色されなかった。その他の臓器の染色は今回行っていないので、今後検討したい。副作用に関しては、直接の証拠はないが、理論上はそうのように考えて良いと思われる。

質問9) ATP7Aの発現していなかった大腸癌26例の中でHDRAによってCDDPとSN-38で抑制効果がなかった症例があるが、その理由はなぜか？

(回答) SN-38についてはMRP1, BCRPなど、CDDPについてはDNA損傷修復機構やチオレドキシニンなど、他の耐性因子が関与している可能性があると考えられる。

質問10) ATP7Aの抗体で染まる部分と染まらない部分があるとすると抗癌剤を使用した時にはどうなるのか？

(回答) 抗癌剤治療によってATP7Aの発現部分が拡大していく可能性がある。

質問11) 免疫染色でどのくらいの細胞が染まったら、陽性と判断したのか？

(回答) 50%染まったものを陽性と判断した。

質問12) たとえば10%陽性の場合には腫瘍として陰性とされるわけだが、この線引きをどう判断するかで影響してくるのではないか？

(回答) 免疫染色でどの程度の細胞にATP7Aの染色がみられれば耐性に差が出るのかは、今後検討を行なう必要がある。

質問13) 原発巣と転移巣で染色性に違いはあったか？

(回答) 原発巣と転移巣を染色できた症例は2例しかないが、染色性に差がなかった。

質問14) 抗癌剤を与えていなくても、大腸癌で発現のあるものとないものがあるのはなぜか？

(回答) 肺癌ではATP7Aの発現は悪性度と関連があると報告されている。また、銅含有蛋白質でATP7Aの発現に依存して発現するlysyl oxidaseは、低酸素下での転移と関係があると報告されている。本来ATP7Aは大腸では発現していないので、ATP7Aが発現することが癌にとって優位性があるものと考えられる。

質問15) 抗癌剤を入れて培養するとATP7Aの発現が誘導されてくるのか？

(回答) 銅の濃度を上げて培養するとATP7Aの発現が誘導されてくることは報告されているが、抗癌剤では報告はない、今後検討してみたい。

質問16) CPT-11とその活性型のSN-38で相対耐性度が異なるのはなぜか？

(回答) 用いた細胞株ではCPT-11の活性酵素であるカルボキシラーゼ活性が低いためであると思われる。また、CPT-11とSN-38の取り込みに関与する輸送体は違っていることが報告されているので、このことも影響している可能性がある。

質問17) 耐性機構として排泄の亢進が主と考えて良いのか？

(回答) DOX, SN-38では排泄の亢進と蓄積の低下が見られたが、Taxol, VCRではこの変化は見られなかった。抗癌剤のターゲットは主に核内に有り、ATP7A発現細胞では抗癌剤がゴルジに閉じこめられて、標的分子に作用しないことが耐性の第一の理由と考えられるので、排泄の亢進がなくても耐性になると考えられる。

質問18) ATP7BではCDDP以外の抗癌剤には耐性にならないのか？

(回答) SN-38, DOXに対し耐性度は低いですが、耐性になることを見いだしている。

質問19) ATP7Aは他の亜鉛などの重金属のトランスポートにも関与するのか？

(回答) in vitroの実験において水銀、カドミウム、亜鉛などはATP7AのATPaseをほとんど活性化しないことが報告されており、他の金属の輸送はしないものとされている。

質問20) BCRPはSN-38を輸送するが、その発現とSN-38の効果に差がないのはなぜか？

(回答) 今回の結果ではBCRPの陽性群のほうが、わずかながらSN-38による抑制率は低い結果になったが、統計的有意差は見られなかった。SN-38の耐性に関する分子が複数あるためにBCRPの発現の単独の解析では差がでなかったと考えられる。

質問21) ATP7Aの発現が耐性に関与することが分かったが、この結果をどう臨床的に生かせるか？

(回答) ATP7Aの発現のない症例についてはCPT-11による治療効果が期待され、CPT-11による治療は勧められる。ATP7Aの発現のある症例については、効果が期待できない抗癌剤の使用を控えるべきであると考えられる。今後ATP7Aが発現しても耐性にならない抗癌剤を検討し、さらにATP7Aの発現による耐性を克服できる薬剤の探索を行いたい。

質問22) いくつかの図表がサプリメントデータとなった理由はなぜか？

(回答) Cancer Researchから図表の制限を指導されたため、文章で説明可能なものはサプリメントデータとした。

以上の結果から、3名の審査委員は本人が大学院博士課程修了者としての学力と識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。