

論文要旨

Direct activation of the human major vault protein gene by DNA-damaging agents

【 DNA 傷害薬剤によるヒト major vault protein 遺伝子の直接活性化 】

島元裕一

【序論および目的】

Vault は樽形をした細胞質のリボ核蛋白質で, major vault protein (MVP), vault poly (ADP-ribose) polymerase (VPAAP), telomerase associated protein (TEP1) と vRNA で構成される. MVP と Lung resistance-related protein (LRP) は同一の蛋白質であり, MVP の発現は, 化学療法抵抗性や予後不良と相関することが報告されている. 我々は, ヒト大腸ガン細胞株 SW-620 を, 分化誘導剤である酪酸ナトリウムで処理すると MVP の発現が亢進することを報告しており, 今回 DNA 傷害を引き起こす抗癌剤と, MVP の発現との関連について調べた.

【材料および方法】

細胞は, ヒト大腸ガン細胞株 SW-620 を使用した. 抗癌剤は, doxorubicin (Adr), etoposide (VP-16), *cis*-diamminedichloroplatinum (CDDP), SN-38, vincristine (VCR) および paclitaxel (Taxol) を使用した. MTT assay で抗癌剤感受性を決定した. MVP 蛋白質の発現解析には, 細胞を抗癌剤, 紫外線照射およびエチジウムブロマイドに 72 時間曝露した後, 抗 MVP ポリクローナル抗体を使用してイムノブロット解析を行った. 転写レベルの解析は, 細胞を抗癌剤で 48 時間処理した後, total RNA を抽出し, 逆転写反応で cDNA を合成し, real-time PCR (Prism 7900HT; Applied Biosystems, Foster City, CA) を行った. 標準化はヒト GAPDH を用いた. MVP プロモーター活性の解析は, ヒト MVP プロモーター領域を種々の長さにしてルシフェラーゼ遺伝子の 5' -上流に組み込んだ, pMVP407, pMVP 315, pMVP 263, pMVP 102 と pMVP 78 と名付けた 5 種類のリポーターベクターを作製して行った. リポーターベクターを細胞にトランスフェクトし, Adr で 48 時間処理した後, ルシフェラーゼアッセイを行った. MVP mRNA の安定性は, 細胞を RNA ポリメラーゼ II 阻害剤の α -amanitin で処理し, Adr で 24 時間処理した後, total RNA を抽出し, real-time PCR を行い解析した.

【結果】

- ①DNA 傷害を起こす Adr・VP-16・CDDP および SN-38 では、72 時間後に蛋白質レベルで著明な MVP の発現亢進を認めたが、細胞分裂を阻害する VCR と Taxol では、MVP の発現亢進は認められなかった。また、濃度および時間依存性に発現増加することが示された。
- ②100 nM の Adr で処理後 24 時間では、有意な MVP mRNA レベルの増加は認められないが、処理 48 時間後には有意な増加を認めた ($p < 0.01$)。また、 IC_{50} 濃度の Adr・VP-16・SN-38・VCR および Taxol で、各々 48 時間処理した後の MVP mRNA レベルは、Adr・VP-16 および SN-38 では有意に増加を認め ($p < 0.0001$)、VCR と Taxol では、 p 値が各々 $p = 0.9236$ と $p = 0.8085$ であり、有意な結果は得られなかった。
- ③ IC_{50} 濃度の Adr で 48 時間処理した後の MVP プロモーター活性は、未処理のものと比較して、pMVP407, pMVP 315, pMVP 263, pMVP 102 と pMVP 78 で、各々 1.7, 1.4, 1.4, 1.6, 2.6 倍であり、②の結果と併せると、MVP mRNA レベルの増加は抗癌剤により引き起こされる転写活性の亢進によるものであることを示している。
- ④Adr に、MVP mRNA を安定化する効果があるかを調べた。MVP mRNA そのものが安定であり、Adr による安定性の増加を見出せなかった。
- ⑤紫外線照射およびエチジウムブロマイドに 72 時間曝露することにより、MVP の明らかな発現亢進が観察された。

【結論及び考察】

細胞分裂を阻害する VCR と Taxol では MVP の発現亢進は認められなかったが、DNA 傷害を引き起こす抗癌剤である、Adr・VP-16・SN-38 および CDDP では MVP の発現が亢進し、紫外線照射やエチジウムブロマイド処理でも亢進した。このことから、DNA 傷害は MVP プロモーター活性を増強することが示唆され、MVP の発現は DNA 傷害を引き起こす因子により誘導されることが明らかとなった。また、MVP mRNA そのものが 30 時間安定であることから、プロモーター活性の増加が、MVP mRNA・蛋白質の有意な発現増加に寄与していることが示唆された。ヒト MVP プロモーターは、Y-box を含んでおり、Y-box は、抗癌剤・紫外線照射および高熱といったストレスに反応すると報告されている。また、核の Y-box binding transcription factor (YB-1) が、ヒト癌や骨肉腫で本来見られる多剤耐性遺伝子 *MDR1* の発現と関連していることや、5-FU 誘導性の MVP プロモーター活性に YB-1 が直接関連しているとの報告もある。本研究では、Y-box を削除しても MVP プロモーター活性には影響がなく、むしろ E-box を削除した時に MVP プロモーター活性の低下が観察された。ヒト腫瘍における MVP 発現に YB-1 が直接関わるのかどうか、MVP 発現と E-box との関連、については今後の検討課題である。

論 文 審 査 の 要 旨

| | | | |
|------|------------------|-------|-------|
| 報告番号 | 医研第 631 号 | 氏名 | 島元 裕一 |
| 審査委員 | 主 査 | 中川 昌之 | |
| | 副 査 | 山田 勝士 | 宮田 篤郎 |

Direct activation of the human major vault protein gene by DNA-damaging agents

(DNA 傷害薬剤によるヒト major vault protein 遺伝子の直接活性化)

Major vault protein (MVP)の発現は、化学療法抵抗性や予後不良と関連することが報告されている。MVPは、lung resistance-related protein (LRP)と名付けられたヒト蛋白質と同一のものである。MVPは、樽形をした大きさ13 MDaの vaultを構成する蛋白質で、vaultの70%を占めている。Vaultは、最大の細胞質リボ核蛋白質複合体で、細胞内での生理的機能は分かっていない。我々は、ヒト大腸癌細胞株 SW-620 を酪酸ナトリウムで処理すると MVP の発現が亢進することを報告した。本研究では、SW-620 を使用し、DNA 傷害を起こす抗癌剤と、MVP 発現との関連について調べた。抗癌剤は、doxorubicin (Adr), etoposide (VP-16), cis-diamminedichloroplatinum (CDDP), SN-38, vincristine (VCR)および paclitaxel (Taxol)を使用した。研究方法は、抗癌剤・紫外線照射およびエチジウムブロマイド (EtBr) による MVP 蛋白質発現を immunoblot analysis で調べた。MVP mRNA 発現と安定性を real-time PCR で調べた。Adr による MVP プロモーター活性の変化を luciferase assay で測定した。

本研究で得られた新しい知見は以下の点である。

1. DNA 傷害を起こす Adr・VP-16・SN-38 および CDDP では 72 時間後に MVP 蛋白質の発現亢進を認めたが、細胞分裂を阻害する VCR と Taxol では MVP 蛋白質の発現亢進は観察されなかった。
2. MVP mRNA は、Adr・VP-16 および SN-38 で 48 時間処理後に、有意に増加していた。しかし、VCR と Taxol では有意な増加は観察されなかった。
3. Adr で 48 時間処理すると MVP プロモーター活性は、未処理の活性より最低でも 1.4 倍上昇していた。MVP プロモーター活性上昇の程度と、MVP の蛋白質および mRNA の発現亢進の程度との間に差異があったが、MVP mRNA そのものが長時間 (30 時間)安定であることがその理由と考えられた。
4. DNA 傷害を起こす紫外線照射や EtBr では、72 時間後に MVP 蛋白質の発現亢進が観察された。

本研究は初めて、Adr などの DNA 傷害を起こす抗癌剤により、ヒト大腸癌細胞株 SW-620 の MVP プロモーター活性の上昇が起こり、安定な MVP mRNA が誘導され、MVP の発現が増加することを明らかにしている。

よって本研究は、博士 (医学) の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 631 号 | 氏名 | 島元 裕一 |
| 審査委員 | 主 査 | 中川 昌之 | |
| | 副 査 | 山田 勝士 | 宮田 篤郎 |

主査および副査の3名は、平成18年7月25日、学位請求者 島元 裕一 君に対して、論文の内容について質疑応答を行うと共に、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) MVP の阻害剤はあるのか。

回答 PAK-104P が知られている。

質問 2) Vault の細胞内分布はどうなっているか。核にはないのか。

回答 Vault の 95% は細胞質に分布し、残りが核膜孔複合体近傍に分布している。

質問 3) P-糖蛋白質の発現していない肺癌細胞で MVP(LRP)が発現しているということだが、その時 MRP1 の発現はどうか。

回答 MRP1 については不明であるが、P-糖蛋白質・MRP1 の両方とも発現していない多剤耐性細胞で MVP が発現しているところから MVP と多剤耐性との関連が示唆された。

質問 4) NaB で MVP の発現は亢進するが、P-糖蛋白質や MRP1 の発現はどうか。

回答 P-糖蛋白質は誘導されたが、MRP1 については不明である。

質問 5) 多剤耐性に何が一番寄与するのか。

回答 P-糖蛋白質、MRP1、BCRP などの ABC トランスポーターと考えられている。

質問 6) Adr による MVP の誘導に E-box が重要な役割をしているということか。

回答 E-box は、MVP の転写に重要である。しかしながら、Adr で MVP の転写活性が亢進するのに必要な調節エレメントは、別に存在すると考えられる。

質問 7) Vault は3種類の蛋白質と vRNA の複合体である。Adr によって、MVP 以外の vault を構成する蛋白質 (VPARP, TEP1) の発現は亢進したのか。

回答 NaB で細胞を処理した時は、MVP だけでなく VPARP も TEP1 も誘導されたが、Adr で細胞を処理した時の、VPARP と TEP1 の発現レベルは、今回調べていない。更に文献的にも報告されていない。

質問 8) MVP は発現が亢進するが、vault 複合体は増加するのか。

回答 MVP は vault に特異的な蛋白質であり、VPARP と TEP1 は vault 以外にも分布していることが知られている。MVP が発現すると、VPARP と TEP1 が集合してきて、vault 複合体が形成されるので、MVP の発現亢進により、vault 複合体が増加することになると考えている。

質問 9) Vault に含まれる vRNA の作用については分かっているか。

回答 RNase で処理しても vault の形態が変化しないことから、構造の維持ではなく、機能に関係していると考えられているが、その機能についてはよく分かっていない。

質問 10) IC₅₀ とは何か、何についての IC₅₀ か。

回答 IC₅₀ とは、SW-620 細胞数を 50% 低下させる Adr の濃度である。

質問 11) Adr で 3 日間処理した時の細胞の状態はどうか。

回答 死滅して遊離してくる細胞がみられるが、生存している細胞について実験を行った。

質問 12) MVP を細胞にトランスフェクトすると、どのような抗癌剤に対して耐性になるか。

回答 MVPcDNA を細胞にトランスフェクトしただけでは細胞は薬剤耐性にならない。現在では、vault とともに他の因子の関与が薬剤耐性に必要なのではないかと考えられている。

質問 13) E-box に結合する転写因子にはどのような蛋白質があるか。

回答 Myc, Arnt, Max, MyoD, Mad, upstream stimulatory factor, Mx11, E47, TFE3, TAL1, BMAL1, CLOCK といった 12 種類の因子が知られている。

質問 14) MVP 発現の臨床的意義は何か。

回答 多くの腫瘍で MVP の発現が亢進している。進行卵巣癌と急性骨髄性白血病 (AML) の臨床研究では、MVP の発現が化学療法抵抗性や予後不良と関連していた。

質問 15) Vault の正常組織での発現はあるのか、また vault の生理機能は何か。

回答 正常組織では、気管支・消化管・腎近位尿管管の上皮細胞やケラチノサイト・副腎皮質およびマクロファージに MVP の発現が高い。これらの発現部位から vault は、P-糖蛋白質や MRP1 と同様、体外異物や様々なストレスから生体を防御する働きをしていることが推測される。しかし、vault の生理機能はまだ確定していない。

質問 16) MVP の遺伝子座位は染色体のどこか。

回答 16p13.2 にある。

質問 17) DNA 傷害で MVP が誘導されるメカニズムはわかっているか。

回答 他の研究室の 5-FU に関するデータなどから、Adr 処理により転写因子が誘導され MVP のプロモーターに結合して MVP の発現が誘導されると推測しているが、どの転写因子がプロモーターのどの部位に結合するのかなどは不明である。

質問 18) E-box にも Y-box のような機能があるのか。

回答 E-box は、イムノグロブリン H 鎖の遺伝子プロモーターに存在する調節エレメントとして見出された。actin, myosin, TGF- β といった多くの遺伝子のプロモーターに存在し、発現を調節している。

質問 19) MVP mRNA は非常に安定だが、どうしてか。

回答 コントロールにも用いた TSP-1 mRNA よりもはるかに安定であるが、その理由は、現在のところ不明である。一般的に、動物細胞での mRNA の安定性は、mRNA の PolyA, AU rich element, coding region と、各々に結合する蛋白質により影響されることが知られている。

質問 20) P38MAPK pathway の変化は調べたか。

回答 高浸透圧が MVP の発現を亢進させることを明らかにした実験では、P38MAPK 阻害剤で MVP 発現は低下した。しかし、今回の実験系では調べていない。更に文献的に報告もされていない。

質問 21) SP1, p53, STAT1 の結合部位は、MVP の転写に関係するか。

回答 SP1, p53, STAT1 を含むプロモーター領域はレポーターアッセイで basal level よりもかなり高い活性を示すので、この中のいずれかは MVP の転写に関係すると考えられる。

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十分に具備しているものと判断し、博士 (医学) の学位を与えるに足る資格をもつものと認めた。