

乳癌薬剤耐性分子 ABCG2 の高発現細胞から学んだ機能

Functions of Breast Cancer Resistant Protein/ABCG2 in Cancer Cells

牟安峰、川添麻子、堀千尋、足立有香、清水梨奈
大西景子、笹井麻千子、坂口直哉、武田貴成、竹谷 茂
Anfeng Mu, Asako Kawazoe, Chihiro Hori, Yuka Adachi, Rina Shimizu,
Keiko Ohnishi Machiko Sasai, Naoya Sakaguchi, Taka-aki Takeda, Shigeru Taketani

京都工芸繊維大学 応用生物学部門
Department of Biotechnology
Kyoto Institute of Technology

E-mail: taketani@kit.ac.jp

(2015年3月26日原稿受理、2016年2月3日採用決定)

要 約

ABCG2は乳癌を始めとする、数種類の癌細胞で増加して、細胞の薬剤耐性の獲得に働く膜輸送を担うポンプ蛋白質として知られている。ABCG2の輸送物質としては、種々の化合物が知られているが、それらにポルフィリンが含まれるのではないかと考えられている。ABCG2のポルフィリン代謝や輸送への役割を調べるために、ヘム要求変異酵母のABCG2株を作製した。Protoporphyrin依存性のABCG2発現株の増殖はコントロール株よりも優れていた。つぎにヒト癌細胞HeLaにABCG2高発現させると薬剤耐性を獲得したが、ALA依存性のprotoporphyrinの蓄積は増加した。Protoporphyrinの増加は、ABCG2発現細胞でのprotoporphyrinの排泄増加よりもROSの低下によるmitochondria機能の改善によるヘム合成系の亢進にあることが示唆された。これらは、ヘム要求性の酵母でのABCG2は発現による生育の向上を支持した。

キーワード : ABCG2, heme, ALA, protoporphyrin, 癌細胞

はじめに

5-Aminolevulinic acid (ALA)を癌患者に投与すると protoporphyrin が癌組織に特異的に蓄積するが、これを光照射して癌部位の特定や組織の破壊する光力学治療が広く用いられている (ALA-PDT)(1-3)。我々は、癌細胞特異的な ALA-由来の protoporphyrin の蓄積の機構に関する研究を種々の角度から検討を加えてきた。まず第一にヘム合成の終末酵素の ferrochelatase の活性や量の低下と ALA の細胞への取り込みの増加が protoporphyrin の蓄積の大きな要因であることを明らかにしてきた。さらに ferrochelatase の活性低下は一酸化窒素産生によって起こることや抗菌剤のキノロン化合物が protoporphyrin の蓄積を増加させることを見出した (4-6)。 heme oxygenase (HO)によるヘム鉄の鉄イオンの再利用の変化が protoporphyrin の蓄積を増減させたので、癌化による鉄利用の多面的な影響が ALA 由来の protoporphyrin の蓄積をもたらすことが分かった (7)。また、ミトコンドリアの鉄利用に関与する frataxin などの鉄輸送分子の発現量の変化に伴って、protoporphyrin の蓄積と光感受性の変化が認められた。特に、frataxin 高発現株を作製したところミトコンドリア機能の増加と protoporphyrin の低下が認められた(8)。そこで、癌化による p53 の変異と frataxin の発現レベルの減少傾向に関係があったので、p53 変異が frataxin の発現量の低下が関連すると考えられた。そこで、マウス frataxin 遺伝子のプロモーター活性測定や CHIP assay を行って p53 応答配列を同定して p53 正常細胞での frataxin 高発現を示した。また、p53 siRNA 処理した細胞では p53 量の低下に伴う frataxin 発現の低下と protoporphyrin の増加が認められた。これらの結果は、p53 変異による frataxin 発現低下やミトコンドリア機能低下が癌細胞特異的な ALA-PDT を引き起こす要因であることを強く示唆した (9)。

一方、ヘムや protoporphyrin は細胞から排出されるシステムがあることが知られるようになった。そのなかでも ABC 型ポンプの一種である ABCG2 の knockout マウスを作製したところ、クロロフィルの分解物である porphyrin 誘導体が蓄積することが報告された (10)。これに伴って、ABCG2 が protoporphyrin を細胞外に輸送する機能を有すると考えられるようになって、ALA-PDT の亢進には ABCG2 阻害剤が有効であるとの報告がなされた(11,12)。一方、ABCG2 は癌細胞が薬剤耐性を獲得するのに寄与するポンプ蛋白質であり、癌化に伴って発現の増加する細胞があることが知られている (13)。従って、癌細胞での protoporphyrin の蓄積には、一見、矛盾する知見であるとも考えられる。しかし ABCG2 がミトコンドリアに局在してポルフィリンを細胞質に積極的に輸送するので protoporphyrin の蓄積をもたらすという報告もある (14)。また、ヒトの ABCG2 は赤血球などの表面抗原であり、種々のバリエーション抗原が個体差をもたらすことが報告された(15)。ABCG2 の機能の詳細については不明であるが、痛風患者にバリエーション抗原が多いことから、ABCG2 は尿酸の輸送蛋白質であると考えられるようになった。さらに痛風患者には protoporphyrin の蓄積がまったく認められないことも報告されている (16)。以上のように ABCG2 のヘム合成への関与については、結論が出ていない状況である。

材料と方法

酵母の培養：ヘム要求核株(Δ hem1) は京都大学医学部の岩井和宏先生から供与された。これに pTEF-ABCG2, pTEF-ABCG2 (O147K)を ampicillin 存在下で導入した。

Immunoblotting：細胞内蛋白質は SDS-PAGE で分析した後、anti-actin, anti-ABCG2, anti-myc を用いて行った (4,5)。

ALA-PDT：HeLa 細胞に pEF-ABCG2 を導入して、neomycin 選択を用いてクローニングして ABCG2 高発現株を樹立した。細胞を DMEM 培地に ALA を添加して、7 時間インキュベートして、培地交換を行って、

8 2ルクス/m² の白色光を照射した。さらに1時間インキュベートした後、MTT assay を行って細胞生存率を求めた (8)。

protoporphyrin と heme ヘムの定量：細胞は1% SDS で破壊した後、9 倍容のエタノールを添加して、攪拌後、日立蛍光分光光度計を用いて蛍光強度を測定した (excitation 400 nm; emission 580-650 nm)。ヘムは細胞に飽和オキザロ酢酸を加えてオートクレーブ処理して、protoporphyrin に変換して蛍光強度を測定した (7,8)。

結果と考察

我々はヘム、protoporphyrin もしくは ALA 要求株の酵母を用いて ABCG2 の protoporphyrin 輸送を調べた。酵母ヘム要求株(Δ hem1)に酵母発現ベクターに組み込んだヒト ABCG2 をトランスフォーメーションして、ALA (50 μ M)やhemin (10-30 μ M) 存在下で生育させたところ、mock DNA を導入した酵母とでは生育に違いは見られなかった (図1)。protoporphyrin 存在下では ABCG2 発現株の生育はコントロールよりも良好であった。ABCG2 バリエント (Q147K) を発現させて同様に protoporphyrin 添加で生育させたところ、コントロール株と同じであった (図1)。これらの結果は ABCG2 が protoporphyrin の取り込みもしくはヘム合成への利用に関与することを示唆した。ALA 存在下でのポルフィリンの蓄積を比べた結果、ほとんど差はなかった。また、ヘム含量は ABCG2 発現株のほうが多いことがわかった。

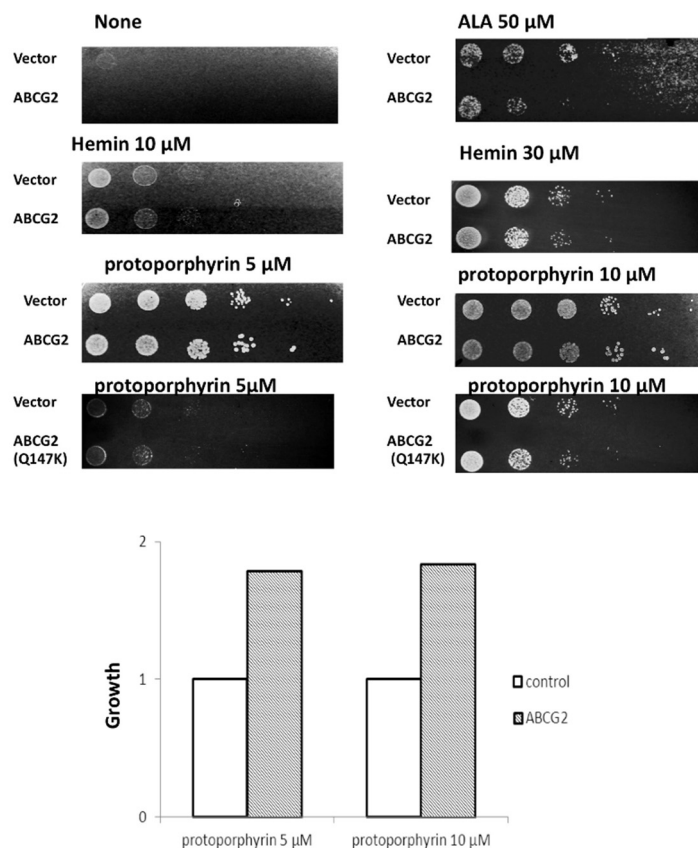


図1. ABCG2 発現酵母の増殖のprotoporphyrin 依存性 pTEF427 およびpTEF-human ABCG2 を酵母ヘム要求株 Δ hem1 に導入した。ALA, protoporphyrin やhemin 添加培地での酵母の生長を調べた。variant ABCG2 (Q147K) を同時に導入して増殖を調べた。Protoporphyrin添加によるABCG2発現株の増加の亢進を示した (下図)。

次に HeLa 細胞の ABCG2 高発現株を作製して、ALA 誘導性の protoporphyrin の蓄積を親株と比較した。ABCG2 の発現を immunoblotting で調べた結果、糖蛋白質特有のブロードな複数のバンドを示した (図 2 A)。また、細胞表面と細胞内小胞に局在していることがわかった (図 2 B)。ABCG2 高発現株の薬剤耐性を調べるために、抗癌剤 MTX や Ko143 で細胞を 24 時間処理して細胞死を調べた。その結果、ABCG2 高発現株は対照群と比較して、明らかな薬剤耐性を示した (図 3)。そこで、ABCG2 高発現株を一定時 ALA 処理したあと、光照射して細胞破壊を試みたところ、対照群と比較して ABCG2 発現株の光障害に抵抗性を示した (図 4)。SDS でを用いて細胞を破壊して、エタノール抽出して細胞内の protoporphyrin の蓄積を調べた。対照群と比較して低下したが培地中への排泄も同様に低下した (図 5)。ABCG2 のポルフィリンの関係を明らかにするために ABCG2 の阻害剤の protoporphyrin 蓄積の影響を調べた。その結果、阻害剤 Ko143 処理で protoporphyrin の蓄積が増加した。FTC も同様に濃度に依存して増加させたが、培地への排出は低下した (図 5)。protoporphyrin の蓄積の低下はヘム合成の上昇によるのではないかと考えられたので ferrochelatase 活性を調べた結果 ABCG2 高発現株の活性が少し増加した。

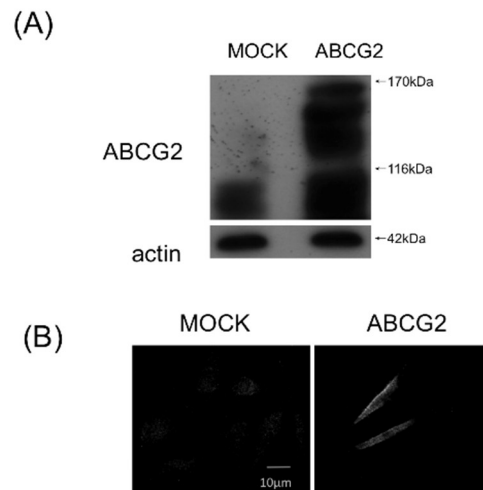


図 2. ABCG2高発現HeLa 細胞. (A) Immunoblot analysis. HeLa 細胞に pcDNA3.1-ABCG2を導入して、G418 選択を行って細胞株を樹立した。細胞蛋白質はSDS-PAGEで分析のち、anti-ABCG2 抗体を用いて immunoblotting を行った。(B) Immunofluorescence. 細胞を anti-ABCG2 抗体で処理して抗原の局在を Zeiss confocal 蛍光顕微鏡で調べた。

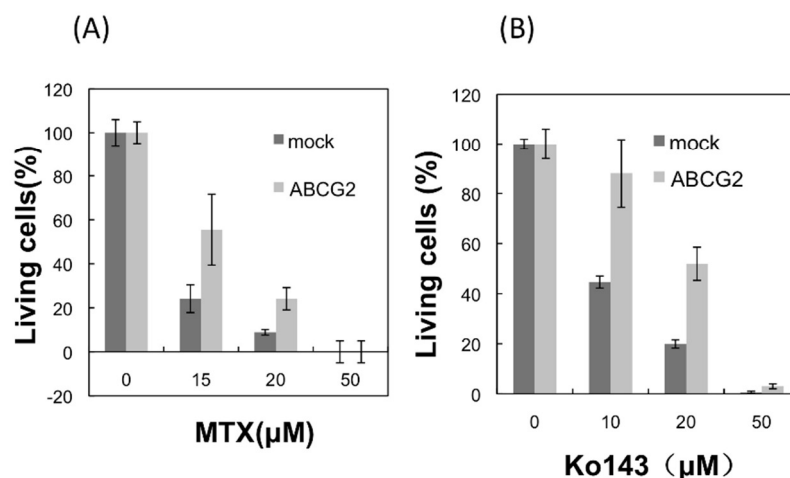


図 3. ABCG2-高発現 HeLa 細胞の MTX (A) と Ko143 (B) に対する細胞障害性 Control と ABCG2-高発現 HeLa 細胞を 24 時間 MTX および Ko143 処理した。MTT assay を行って細胞生存率を調べた。mean ± S. D.

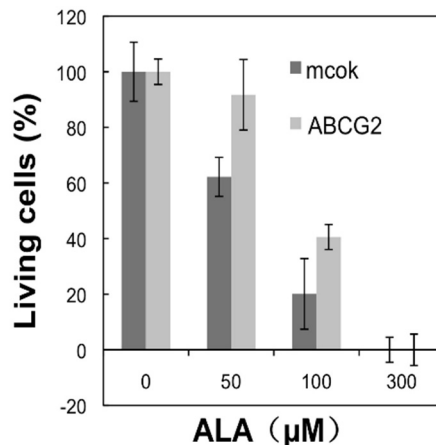


図4. ABCG2-発現 HeLa 細胞のALA-PDTへの効果. Controlと ABCG2-発現 HeLa 細胞をALA で7時間処理した。細胞は15分間光暴露したのち、細胞の生存は、MTT を行った。the mean \pm S.D. (n=3).

(A)

(B)

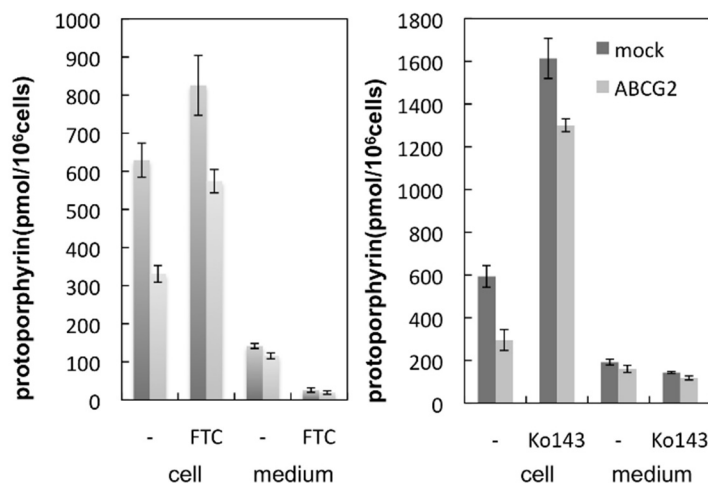


図5. ABCG2-発現 HeLa 細胞でのALA-誘導性 protoporphyrinの蓄積. 細胞は500 μ MALA と 10 μ M FTC (A)や10 μ M Ko143 (B) 存在下で7j時間処理した、細胞内外のprotoporphyrin量を測定した。the mean \pm S.D (n=3).

しかしヘム量を比較したところ、ABCG2 高発現株では10%程度細胞内のヘム含量が低下した。これに伴い細胞のヘム合成量を示す HO-1 の発現量を調べたところ、ABCG2 高発現株での低下が認められた。したがって、ヘム合成の低下が示唆された。酵母での変異株と同様に、バリエーション ABCG2 の高発現株を作製して、ALA 由来の protoporphyrin の蓄積を調べたが、ABCG2 高発現株とは異なって対照群と変わらなかった。以上のように、ABCG2 が protoporphyrin 輸送に働いている役割については、否定的であるが、何らかの機構でヘム合成に関与する可能性があることがわかった。例えば、ALA の排出に働いている可能性が考えられる。しかし、酵母の ABCG2 発現による protoporphyrin 依存性の生育の増加をもたらした事を説明することができない。そこで ABCG2 高発現株への hematoporphyrin の取り込みを調べたが、コントロール細胞とほとんど変化しなかった (図6)。むしろ ABCG2 によって細胞のヘム利用が上昇するのではないかと考えられた。

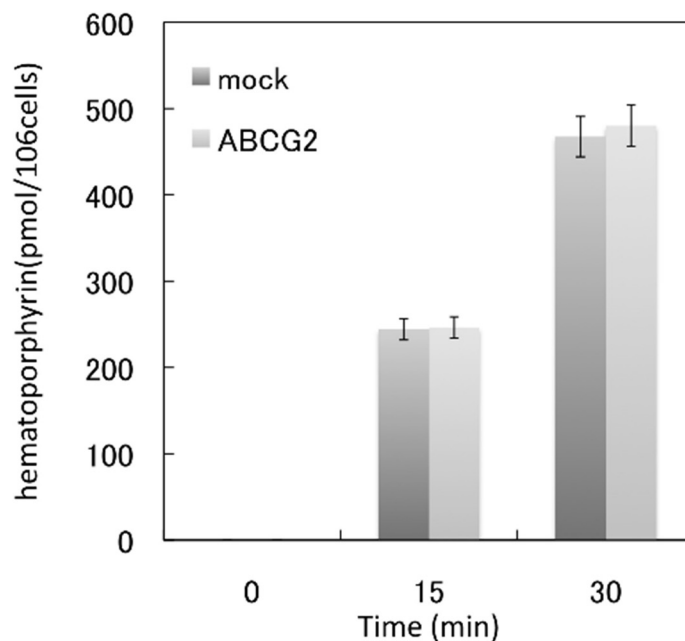


図6. ABCG2-発現 HeLa 細胞へのhematoporphyrin の取り込み. 細胞は 10 μ M hematoporphyrin 存在下で 30分間処理して, hematoporphyrin量を測定した. the mean \pm S.D (n=3).

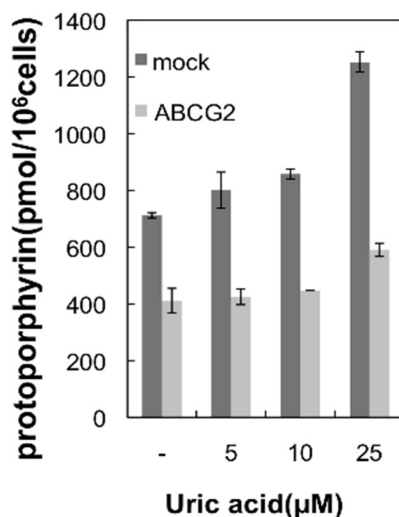


図7. ABCG2-発現 HeLa 細胞でのALA-誘導性 ,protoporphyrinの蓄積への尿酸の影響. 細胞は24時間尿酸処理した. 細胞は500 μ M ALA と尿酸でさらに 7時間処理して, protoporphyrin量を測定した. the mean \pm S.D. (n=3).

次に ABCG2 が尿酸輸送に関係している報告があるので (16)、ALA 誘導性 protoporphyrin の蓄積に対する尿酸の影響を調べた。コントロール群では尿酸の濃度の増加に従って、protoporphyrin の蓄積が増加したが、ABCG2 高発現株の蓄積量はほとんど変わらなかった (図7)。同時に尿酸による細胞ストレスの増加を調べた所 ABCG2 高発現株での ROS の発生は低く (図8)、ABCG2 が尿酸によるストレスの上昇の排除に働き、ROS 産生量の低下が ALA-PDT に対する軽減に繋がっているとも考えられた。尿酸はプリン誘導体の分解産物であり、ABCG2 の基質と考えられている (16)。尿酸はミトコンドリアの NADH oxidase 機能低下をもたらして酸化ストレスをおこす。還元剤 Ascorbic acid と同じように尿酸も prooxidant として働く。尿酸

の蓄積が発症の原因なのか防御物質なのかは今の所不明である。本研究から、尿酸は protoporphyrin の蓄積を高めることから、protoporphyrin の蓄積は酸化ストレスによる ROS の産生によることかもしれない。一方、ABCG2 は尿酸などの不純物を除くことができるので、Protoporphyrin の蓄積の低下を招くのかかもしれない。同様に ABCG2 の酸化ストレスの軽減が protoporphyrin の低下をもたらすことがわかった。

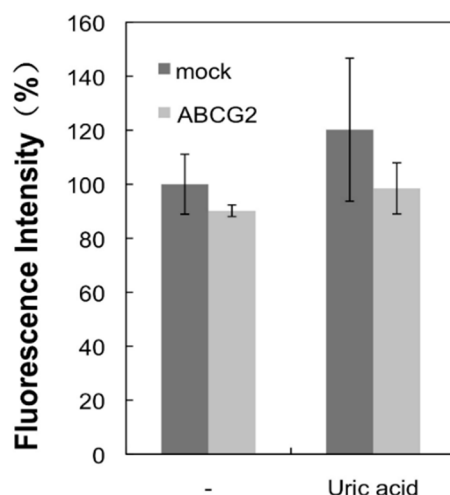


図 8. ABCG2-発現HeLa 細胞でのROS産生. 細胞は250 μ M 尿酸で 72時間処理して、5 μ M CM-H₂DCFDAで30分間反応させた。酸化蛍光 (ROS) を測定した。the mean \pm S.D. (n=3).

参考論文

1. Hinnen P, de Rooij FW, van Velthuisen ML, Edixhoven A, van Hillegersberg R, Tilanus HW, Wilson JH, Siersema PD. (1998) Biochemical basis of 5-aminolaevulinic acid-induced protoporphyrin IX accumulation: a study in patients with (pre)malignant lesions of the oesophagus. *Br J Cancer*. 78, 679-82.
2. Krieg RC, Fickweiler S, Wolfbeis OS, Knuechel R. (2000) Cell-type specific protoporphyrin IX metabolism in human bladder cancer in vitro. *Photochem Photobiol*. 72, 226-33.
3. Hefti M, Hostenstein F, Albert I, Looser H, Luginbuehl V. (2011) Susceptibility to 5-aminolevulinic acid based photodynamic therapy in WHO I meningioma cells corresponds to ferrochelatase activity. *Photochem Photobiol*. 87, 235-41.
4. Ohgari Y, Nakayasu Y, Kitajima S, Sawamoto M, Mori H, Shimokawa O, Matsui H, Taketani S. (2005) Mechanisms involved in delta-aminolevulinic acid (ALA)-induced photosensitivity of tumor cells: relation of ferrochelatase and uptake of ALA to the accumulation of protoporphyrin. *Biochem Pharmacol*. 71, 42-9.

5. Ohgari Y, Miyata Y, Chau TT, Kitajima S, Adachi Y, Taketani S. (2011) Quinolone compounds enhance delta-aminolevulinic acid-induced accumulation of protoporphyrin IX and photosensitivity of tumour cells. *J. Biochem.* 149, 153-160.
6. Ohgari K, Miyata Y, Miyagi T, Gotoh S, Ohta, T, Kataoka T, Furuyama K, Taketani S (2011) Roles of porphyrin and iron metabolisms in the d-aminolevulinic acid (ALA)-induced accumulation of protoporphyrin and photo-damage of tumor cells *Photochem. Photobiophys.* 87(5): 1138-1145.M.
7. Sawamoto M, Imai T, Umeda M, Fukuda K, Kataoka T, Taketani S. (2013) The p53-dependent expression of frataxin controls 5-aminolevulinic acid (ALA)-induced accumulation of protoporphyrin IX and photo-damage in cancerous cells. *Photochem. Photobiol.* 89(1): 163-172.
8. Shimizu R, Lan, NN, Tai TT, Y Adachi Y, A KawazoeA Mu A, Taketani S. (2014) p53 directly regulates the transcription of the human frataxin gene and its lack of regulation in tumor cells decreases the utilization of mitochondrial iron *Gene* 551, 79–85.
9. Jonker JW, Buitelaar M, Wagenaar E, Van Der Valk MA, Scheffer GL, Scheper RJ, Plosch T, Kuipers F, Elferink RP, Rosing H, Beijnen JH, Schinkel AH. (2002) The breast cancer resistance protein protects against a major chlorophyll-derived dietary phototoxin and protoporphyria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99, 15649-54.
10. Zhou S, Zong Y, Ney PA, Nair G, Stewart CF, Sorrentino BP. (2005) Increased expression of the Abcg2 transporter during erythroid maturation plays a role in decreasing cellular protoporphyrin IX levels. *Blood.* 105, 2571-6.
11. Wakabayashi K, Nakagawa H, Tamura A, Koshiha S, Hoshijima K, Komada M, Ishikawa T. (2007) Intramolecular disulfide bond is a critical check point determining degradative fates of ATP-binding cassette (ABC) transporter ABCG2 protein. *J Biol Chem.* 282, 27841-6.
12. Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, Krogmann T, Gao Y, Rishi AK, Ross DD. (1998) A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95, 15665-70.
13. Ogino T, Kobuchi H, Munetomo K, Fujita H, Yamamoto M, Utsumi T, Inoue K, Shuin T, Sasaki J, Inoue M, Utsumi K. (2011) Serum-dependent export of protoporphyrin IX by ATP-binding cassette transporter G2 in T24 cells. *Mol Cell Biochem.* 358, 297-307.
14. Saison C, Helias V, Ballif BA, Peyrard T, Puy H, Miyazaki T, Perrot S, Vayssier-Taussat M, Waldner M, Le Pennec PY, Cartron JP, Arnaud L. (2012) Null alleles of ABCG2 encoding the breast cancer resistance protein define the new blood group system Junior. *Nat Genet.* 44, 174-7.
15. Woodward OM, Köttgen A, Coresh J, Boerwinkle E, Guggino WB, Köttgen M. (2009) Identification of a urate transporter, ABCG2, with a common functional polymorphism causing gout. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106, 10338-42.
16. Lanasa MA, Sanchez-Lozada LG, Choi YJ, Cicerchi C, Kanbay M, Roncal-Jimenez CA, Ishimoto T, Li N, Marek G, Duranay M, Schreiner G, Rodriguez-Iturbe B, Nakagawa T, Kang DH, Sautin YY, Johnson RJ. (2012) Uric acid induces hepatic steatosis by generation of mitochondrial oxidative stress: potential role in fructose-dependent and -independent fatty liver. *J Biol Chem.* 287, 40732-44.

SUMMARY

ABCG2, a member of ABC-type pump protein functions in the export of anti-cancer drugs. To examine whether ABCG2 is involved in the metabolisms of porphyrin and heme, we examined the utilization of porphyrin using yeast mutant lacking heme biosynthesis. When ABCG2 was expressed in the mutant, the growth was improved by supplement with protoporphyrin. Then we next examined drug resistance of human cancer HeLa cells highly expressing-ABCG2. ABCG2 transfectants became resistant to anticancer drugs. When they were incubated with 5-aminolevulinic acid, and then exposed to light, cell death was lowered by decreases of the accumulation of protoporphyrin inside and outside of cells, as compared with those of control. Based on the decrease of ROS production by uric acid in the ABCG2 transfectants, ABCG2-induced improvement of the mitochondrial functions led to the decrease in porphyrin accumulation.

Key words: ABCG2, heme, ALA, protoporphyrin, cancerous cells