

令和 3 年 8 月 23 日現在

機関番号：32305

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06793

研究課題名(和文) 肺がんの上皮間葉転換に伴う薬剤耐性の獲得機構の解明と臨床の予測

研究課題名(英文) Mechanism and clinical prediction of drug resistance associated with epithelial mesenchymal transition of lung cancer

研究代表者

荻原 琢男(Ogihara, Takuo)

高崎健康福祉大学・薬学部・教授

研究者番号：80448886

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：がんの転移機構における上皮間葉転換(EMT)を転写調節因子Snailを用いて誘導したときの、排出系トランスポーターの機能変動およびその調節機構を解析したところ、ヒト肺がん由来HCC827細胞では、ERMタンパク質のうちMsnが、ヒト肝がん由来HepG2細胞ではRdxの発現量が増加しており、それぞれP-gpの機能が亢進していた。このとき、P-gpのmRNAは増加せず、膜上発現量のみが増加していた。P-gpとERMタンパク質のうちRdxとの相互作用を免疫沈降法により調べたところ、P-gpと相互作用しているRdxが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果により、がん細胞においてSnail誘発性のEMTが生じる際に、ERMの発現増加に伴って排出系トランスポーター、特にP-gpの細胞膜発現が増加し、その機能が上昇することが確認された。またこのとき、発現が増加するERMタンパク質は臓器毎に異なる可能性が示唆された。今回の検討により、がん多剤耐性は抗がん剤の曝露をきっかけとするだけでなく、がんの転移の際にも起こりえることが示唆され、さらにP-gpを細胞膜上に固定する足場タンパク質は組織ごとに異なることから、組織特異的な抗がん剤の開発に繋がるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the functional changes of efflux transporters such as P-glycoprotein(P-gp) and their scaffold proteins, ERM(Ezrin, Radixin, Moesin) during the induction of epithelial-mesenchymal transition(EMT) in cancer metastasis using the transcriptional regulator, Snail. The protein and mRNA expression levels of Moesin and Radixin were increased in human lung cancer-derived HCC827 and human liver cancer-derived HepG2 cells, respectively, indicating that P-gp function was enhanced. The mRNA level of P-gp was not increased, but only the membrane expression level was increased. The interaction between P-gp and Radixin, an ERM was investigated by immunoprecipitation, and Radixin was found to interact with P-gp. In HCC827, where the Snail gene was introduced, it was suggested that the expression and function of the efflux transporter MRP5 were enhanced.

研究分野：生物薬剤学

キーワード：P-糖タンパク 上皮間葉転換 排出系トランスポーター 転写調節因子 ERMタンパク質 mRNA Snail 免疫沈降法

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

がんは日本における死因第一位の疾患であり、その生存率は他の臓器への浸潤や転移といった悪性化を経ることによりさらに顕著に低下する。特に肺がんは転移に至るまでの期間が短だけでなく、転移後の5年生存率が3.7%と極めて低い、最も死亡率の高いがんである。このがんの浸潤・転移を引き起こすメカニズムとして、原発巣の上皮系がん細胞が高い移動能を有する間葉系がん細胞へと形質変換する現象「Epithelial - Mesenchymal Transition (EMT)」が提唱されている。EMTを介した浸潤・転移時に伴うがんの悪性化による生存率低下の要因には、がん細胞が様々な薬剤耐性機構を亢進させることで、抗がん薬の効果を減弱させることが推察される。したがって、この耐性化およびその亢進のメカニズムを明らかにすることは、浸潤・転移時の生存率を改善するために極めて重要であると考えられる。一方、一般的にはがん耐性化のメカニズムのひとつには、多くの抗がん薬を細胞外へと排出するP-glycoprotein (P-gp)およびBreast Cancer Resistance Protein (BCRP)などのトランスポーターの発現および輸送機能の亢進が考えられる。申請者らはこれまでに、肺がん細胞株に転写因子であるSnailを過剰発現させてEMTを誘導したとき、P-gpのタンパク発現量は変化しないにも関わらず、P-gpの基質である抗がん薬（パクリタキセル）の排出が亢進され細胞が死滅しにくい（毒性が減弱する）ことを見出している。また、これとは独立してezrin, radixin, moesin (ERM)と呼ばれるP-gpを細胞膜上に固定する“足場タンパク”の発現を阻害すると、P-gpのタンパク発現量は変わらずにその機能が抑制されることを明らかにしている。つまりこれらの知見を組み合わせると、EMTによるP-gpの機能亢進にはこれらの足場タンパクの関与が想定される。しかしながら、肺がん細胞において、どの足場タンパクがP-gpの発現を調節しているのか、そのタンパクがEMT誘導時に実際に増加しているかは明らかではない。また、それらの現象が臨床における事象を反映したものであるか否かも明らかではない。

2. 研究の目的

本研究では、Snail誘導性のP-gp機能亢進メカニズムを明らかにし、加えて、患者肺がん組織におけるP-gpおよびその調節因子、Snailの発現量を評価することにより、Snailは肺がんの転移能を亢進させるだけでなく、P-gpの発現や機能の変動を引き起こすかを明らかにすることを目的とした。

具体的には、肺がん細胞を用いてEMT誘導因子とP-gpおよびその機能調節因子の発現を比較解析することにより、EMT誘導時におけるP-gp機能亢進メカニズムを明らかにした。さらに、肺がん患者の腫瘍組織を用いて同様の解析を行うことにより、*in vitro*で確認された現象が*in vivo*およびヒト臨床での現象を説明できるか否かを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

1. 肺がん細胞における EMT による P-gp 機能亢進メカニズムの解明

1-1. Snail による EMT 誘導時における P-gp と足場タンパクの発現変動 (細胞株 in vitro)

ヒト由来肺がん細胞 HCC827 に Snail を導入して EMT を誘導し、細胞全体および抽出した細胞膜画分において P-gp のタンパク発現量が増加しているかを Western blotting により評価した。また、P-gp の機能を亢進させる足場タンパクである ERM に着目し、発現量の変化を同様の方法にて確認した。

1-2. EMT 時の足場タンパクの発現誘導を抑制したときの P-gp の機能変動 (細胞株 in vitro)

1-1.にて確認された足場タンパクの発現亢進を RNAi 法にて抑制したとき、P-gp の輸送機能の亢進が抑制されるか否かを基質薬物である Rhodamine123 の排出能を検討することで評価した。

2. 臨床検体における EMT および P-gp 機能亢進因子の探索

2-1. EMT の確認および Snail と P-gp の発現評価 (臨床検体 in vitro)

群馬県立がんセンターの化学療法未施行患者から提供された肺がん組織を用いて、in vitro において発現および機能変動が確認されている Snail および EMT マーカー、P-gp の mRNA 発現量を解析した。

2-2. EMT の誘導因子および P-gp の機能亢進の因子の発現評価 (臨床検体 in vitro)

1-1 および 1-3 の in vitro 検討にて検討した因子が、ヒト肺がん組織においても同様の発現変動を起こしているかを mRNA 発現量の解析により評価した。

4. 研究成果

1. 肺がん細胞における EMT による P-gp 機能亢進メカニズムの解明

1-1. Snail による EMT 誘導時における P-gp と足場タンパクの発現変動 (細胞株 in vitro)

ヒト由来肺がん細胞 HCC827 に *SNAIL1* 遺伝子を導入し、細胞全体および抽出した細胞膜画分において P-gp のタンパク発現量を評価した。Mock 細胞と比較して、*SNAIL1* 遺伝子を導入した細胞では、P-gp の総発現量は変わらないものの、細胞膜発現量が増加することが確認された ($227.1 \pm 138.1\%$)。

また、P-gp の機能を亢進させる足場タンパクである ERM に着目し、発現量の変化を確認した。*Msn* の mRNA 発現量は Mock 細胞と比較して *SNAIL1* 遺伝子を導入した細胞で 2.3 倍に増加したが、*Ezr* と *Rdx* の発現量は変化しなかった。さらに、*Msn* のタンパク質発現量についても、*SNAIL1* 遺伝子を導入した細胞では、Mock 細胞と比較して 2.7 倍の増加が認められた。

1-2. EMT 時の足場タンパクの発現誘導を抑制したときの P-gp の機能変動 (細胞株 in vitro)

Msn の発現亢進を RNAi 法にて抑制したときの P-gp の輸送機能を、P-gp 基質薬物である Rhodamine123 の排出能を検討することで評価した。*SNAIL* 遺伝子を導入した細胞では、Rhodamine123 の排出率が Mock 細胞と比較して 4.1 倍に増加し、この増加は Msn の knockdown によって 50%抑制された。

2. 臨床検体における EMT および P-gp 機能亢進因子の探索

2-1. EMT の確認および Snail と P-gp の発現評価 (臨床検体 in vitro)

SNAIL および ERM または P-gp の発現量の相関関係の評価するため、肺癌患者の腫瘍および正常組織の mRNA 発現量を測定した。腫瘍組織における *SNAIL* の mRNA 発現量は、*Ezr* ($r=0.769$)、*Rdx* ($r=0.831$)、*Msn* ($r=0.803$) および *ABCB1* ($r=0.776$) と有意に正の相関を示した。一方、正常組織ではこれらの相関は得られなかった。

2-2. EMT の誘導因子および P-gp の機能亢進の因子の発現評価 (臨床検体 in vitro)

各患者の発現量の個体差やがん化に伴う発現量の増減を考慮するために、正常およびがん組織における *SNAIL* および ERM の発現量あるいは発現量比の比較をおこなった。正常およびがん組織における *SNAIL* と ERM の mRNA 発現量の平均に有意な差は認められなかった。一方、正常およびがん組織における発現量比の相関を評価したところ、*SNAIL* と *Msn* に正の相関が認められた。

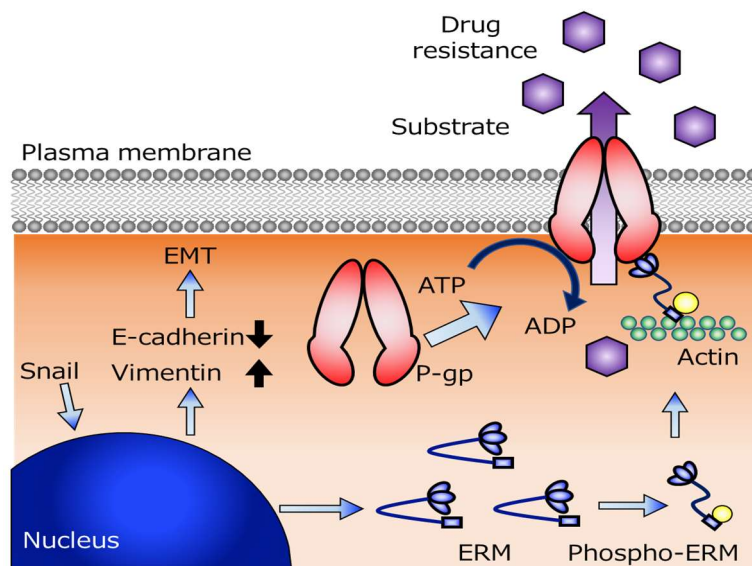


Figure Presumed mechanisms of P-glycoprotein (P-gp)-mediated drug resistance during Snail induce epithelial-mesenchymal transition (EMT).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Yano Kentaro, Seto Saeka, Kamioka Hiroki, Mizoi Kenta, Ogihara Takuo	4. 巻 520
2. 論文標題 Testosterone and androstenedione are endogenous substrates of P-glycoprotein	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 166 ~ 170
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.09.067	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yano Kentaro, Okabe Chiaki, Fujii Kenta, Kato Yuko, Ogihara Takuo	4. 巻 72
2. 論文標題 Regulation of breast cancer resistance protein and P glycoprotein by ezrin, radixin and moesin in lung, intestinal and renal cancer cell lines	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacy and Pharmacology	6. 最初と最後の頁 575 ~ 582
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jphp.13225	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yano Kentaro, Tomono Takumi, Ogihara Takuo	4. 巻 41
2. 論文標題 Advances in Studies of P-Glycoprotein and Its Expression Regulators	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biological & Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 11 ~ 19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b17-00725	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tomono Takumi, Machida Tatsuya, Kamioka Hiroki, Shibasaki Yumi, Yano Kentaro, Ogihara Takuo	4. 巻 13
2. 論文標題 Entinostat reverses P-glycoprotein activation in snail-overexpressing adenocarcinoma HCC827 cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0200015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Ogihara Takuo, Mizoi Kenta, Kamioka Hiroki, Yano Kentaro	4. 巻 12
2. 論文標題 Physiological Roles of ERM Proteins and Transcriptional Regulators in Supporting Membrane Expression of Efflux Transporters as Factors of Drug Resistance in Cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 3352 ~ 3352
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers12113352	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 X. Zhang, K. Mizoi, H. Kamioka, K. Yano, T. Ogihara
2. 発表標題 Physiological roles of ERM proteins in supporting membrane expression of efflux transporters
3. 学会等名 第5回トランスポーター研究会関東部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 H. Kamioka, K. Yano, T. Tomono, T. Ogihara
2. 発表標題 Mechanism of Drug Resistance Through Increased P-glycoprotein Function due to Enhanced Expression of Radixin at Epithelial-Mesenchymal Transition
3. 学会等名 日本薬物動態学会第35回年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 溝井健太, 瀬戸彩瑛香, 高橋紗織, 矢野健太郎, 荻原琢男
2. 発表標題 テストステロンはP-糖タンパクの生体内基質である
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 矢野健太郎, 岡部千明, 藤井健太, 加藤木綿子, 荻原琢男
2. 発表標題 P-糖タンパク質および乳がん耐性タンパク質の輸送機能におけるERMタンパクの関与とその組織差
3. 学会等名 日本薬剤学会第34年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上岡宏規, 伴野拓巳, 矢野健太郎, 藤田行代志, 藤田敦, 小野里良一, 飯島美砂, 土田秀, 新井隆広, 荻原琢男
2. 発表標題 肺がん細胞におけるSnail誘発性上皮間葉転換時におけるP-糖タンパク質活性化機構の解明
3. 学会等名 日本薬剤学会第34年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 瀬戸彩瑛香, 溝井健太, 高橋紗織, 矢野健太郎, 荻原琢男
2. 発表標題 男性ホルモン輸送におけるP-糖タンパク質の関与
3. 学会等名 第14回トランスポーター研究会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 笠原悠, 上岡宏規, 矢野健太郎, 荻原琢男
2. 発表標題 肝臓がんのSnail誘発性上皮間葉転換におけるP-糖タンパク質の機能変化
3. 学会等名 第14回トランスポーター研究会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 H. Kamioka, T. Tomono, K. Yano, Y. Fujita, A. Fujita, R. Onozato, M. Iijima, S. Tsuchida, T. Arai, T. Ogihara
2. 発表標題 P-glycoprotein activation mechanism by Snail-induced epithelial-to-mesenchymal transition in lung cancer cells
3. 学会等名 ISSX2019, 12th Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上岡宏規, 伴野拓巳, 藤田行代志, 藤田敦, 小野里良一, 飯島美砂, 土田秀, 新井隆広, 矢野健太郎, 荻原琢男
2. 発表標題 肺がん細胞の上皮間葉転換による膜発現調節因子を介したP-糖タンパク質の機能亢進
3. 学会等名 第41回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 K. Yano, M. Kimura, T. Ogihara
2. 発表標題 Bitter substance increases P-glycoprotein membrane localization and transport activity via CCK secretion in Caco-2 Cells
3. 学会等名 日本薬物動態学会第34回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 H. Kamioka, H. Kasahara, K. Yano, T. Ogihara
2. 発表標題 P-glycoprotein activation at epithelial to mesenchymal transition in HepG2 cells
3. 学会等名 日本薬物動態学会第34回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大川こずえ, 森下宙輝, 矢野健太郎, 荻原琢男
2. 発表標題 併用薬物によるP-gp阻害を介したピモジドの消化管吸収の亢進
3. 学会等名 第62回 日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 K. Yano, Y. Watanabe, T. Ogihara
2. 発表標題 Gastrointestinal Hormone Cholecystokinin and Bitter Substance Increase P-glycoprotein Membrane Localization and Transport Activity in Caco-2 Cells
3. 学会等名 日本薬物動態学会第33回年会/MD0国際合同学会(国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森下 宙輝, 大川こずえ, 荒川大, 矢野健太郎, 荻原琢男
2. 発表標題 ピモジドの消化管吸収過程におけるP-糖タンパク質を介した薬物間相互作用の検討
3. 学会等名 第3回トランスポーター研究会関東部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 荻原琢男
2. 発表標題 足場タンパクによる組織選択的なP-糖タンパク質(P-gp)の機能調節
3. 学会等名 慶應義塾大学大学院 生物系薬学特論/薬品機能解析・動態制御学特論(招待講演)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	矢野 健太郎 (Yano Kentaro) (40644290)	高崎健康福祉大学・薬学部・講師 (32305)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------