

平成22年6月28日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007年度～2008年度
 課題番号：19790124
 研究課題名（和文） 肺癌における薬物輸送蛋白BCRPの過剰発現制御機構の解明と臨床的意義
 研究課題名（英文） Clinical implication and regulation of individual variation of drug transporter (BCRP) expression in lung tumor tissues.
 研究代表者
 高根 浩（TAKANE HIROSHI）
 鳥取大学・医学部附属病院・主任薬剤師
 研究者番号：50444641

研究成果の概要：日本人肺癌患者を対象に、化学療法の臨床効果に影響を及ぼす可能性が示唆される薬物輸送タンパクであるBCRPの肺癌組織における遺伝子発現量の個人差について検討した結果、BCRPの発現量に大きな個人差が認められた。その個人差の原因の一つと考えられた遺伝子プロモーター領域におけるCpGアイランドのメチル化は関与していないことが明らかとなった。BCRPは肺癌で標準的に使用される抗がん剤の臨床効果に影響を及ぼすことが考えられるため、今後のさらなる研究の必要性を示したものである。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	0	1,600,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	480,000	3,680,000

研究分野：遺伝薬理学、薬物動態学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：肺癌、薬物輸送タンパク、BCRP、エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

癌化学療法における薬剤耐性は临床上重要な問題である。その分子機構には、(1)薬物輸送蛋白の過剰発現、(2)細胞内の解毒化反応の促進、(3)標的分子の変化などがある。固形癌の中でも肺癌は化学療法に対する奏効率が約30%と低く、その要因に肺癌細胞の薬剤耐性化が大きな問題となっている。従っ

て、薬剤耐性の分子機構解明は耐性克服のみならず、抗癌剤に対する感受性情報に基づく癌化学療法の個別化を考慮する上で不可欠である。Breast cancer resistance protein (BCRP)はABC transporterと呼ばれる薬物輸送蛋白の一つであり、基質薬物の細胞外への排出に関与する。近年、BCRP過剰発現が肺癌化学療法に対する治療抵抗に関与する可能性が*in vitro*で示唆されている。また、臨

床試験において、非小細胞肺癌や白血病細胞のBCRP発現量が治療抵抗性に関連することが報告されている。しかし、未だ臨床的実証も少なく、そのメカニズムについては未だ十分な解析がなされていない。

2. 研究の目的

臨床では癌細胞におけるBCRP発現量を直接定量できる可能性は肺癌摘出術施行患者に限定され、多くを占める手術非適応の進展型肺癌では困難が予測される。従って、BCRP発現量の予測は多くの医療関係者が切望する事項である。従って、BCRP過剰発現の制御機構を解明することは、多くの肺癌患者で過剰発現を予測できる有用なバイオマーカーの探索において重要である。さらに、抗癌剤耐性克服の新規治療法の開発においても、重要な寄与となることは明らかである。DNA分子中のシトシン-グアニン配列(CpG)のシトシンのメチル化は、遺伝子配列以外の遺伝子発現を選択的に制御する機構として注目されており、癌の薬剤耐性化にも関与することが示唆されている。BCRPをコードする*ABCG2*遺伝子の転写制御領域にはCpGアイランド(CpG密集領域)が存在し、近傍には多くのcis-配列が認められ、CpGアイランドのメチル化状態がBCRP発現量に関与する可能性は高い。しかし、*in vivo*における肺癌の薬剤耐性において、*ABCG2*遺伝子の過剰発現の分子制御機構としてCpGアイランドのメチル化状態に着目した研究は皆無であり、新規の攻略方法であることから、本研究を着想するに至った。

抗癌剤耐性に関与するABC transporterの一つであるBreast cancer resistance protein (BCRP)は基質薬物の細胞外への排出に関与する。臨床試験において、非小細胞肺癌や白血病細胞のBCRP発現量が治療抵抗性に関連することが報告されている。しかし、臨床的実証も少なく、そのメカニズムについては未だ十分な解析がなされていない。従って、BCRP過剰発現の制御機構を解明することは、多くの肺癌患者で過剰発現を予測できる有用なバイオマーカーの探索や抗癌剤耐性克服の新規治療法の開発において重要である。そこで本研究は、BCRP過剰発現のメカニズムおよび肺癌化学療法に対する治療抵抗への

関与を明らかにすることを目的としている。

そこで本研究は以下の項目を明らかにすることを目的とした。

(1) 摘出肺癌組織の*ABCG2*遺伝子の変異解析とBCRP発現量への関与解明

(2) 摘出肺癌組織の*ABCG2*遺伝子転写領域のCpGアイランドのメチル化状態解析とBCRP発現量への関与解明

(3) *ABCG2*転写活性に及ぼす遺伝子変異およびCpGアイランドのメチル化状態の影響

3. 研究の方法

(1) *ABCG2*遺伝子の遺伝子およびタンパクの発現量の評価

日本人肺癌患者102症例より得た癌および正常組織より蛋白、DNAおよびmRNAを抽出した。BCRP蛋白の定量は、ウエスタンブロット法にて行い発現量を解析した。組織より抽出した*ABCG2*mRNAの発現量は、リアルタイムPCR法で行い、ハウスキーピング遺伝子として β -アクチンを用いて定量評価を行った。その他に、抗癌剤耐性に関連する薬物輸送タンパクであるMDR1(*ABCB1*)、MRP2(*ABCC2*)、Ctr1、代謝酵素であるDPD(*DPYD*)の肺癌組織におけるmRNA発現量の個人差について検討を行った。なお、*ABCB1*および*DPYD*遺伝子は、*ABCG2*遺伝子と同様にプロモーター領域にCpGアイランドが存在し、発現量に影響する可能性があるため、今回対象とした。

(2) *ABCG2*遺伝子の遺伝子変異のスクリーニングおよび同定

遺伝子変異のスクリーニングはPCR-SSCP法により行い、ダイレクトシーケンスあるいはサブクローニング後、シーケンスにより同定した。プライマーは*ABCG2*遺伝子のプロモーター領域をターゲットに設計した。

(3) *ABCG2*遺伝子の変異および転写領域のCpGアイランドのメチル化状態解析

ABCG2、*ABCB1*および*DPYD*遺伝子のプロモーター領域のCpGアイランド全領域のメチル化パターンをbisulfite sequencing法にて特定した。次にDNAのメチル化の程度を簡便、網羅的かつ高精度で検出する方法として、メチル化の対象となるCpGアイランドを含むDNAの

領域を特異的にPCR増幅し、制限酵素処理を行う COBRA 法 (Combined Bisulfite Restriction Analysis) を用いてメチル化状態を評価し、遺伝子発現量との関連を解析した。なお、COBRA法は図1に示す領域 (プライマーセット) をターゲットに行った。

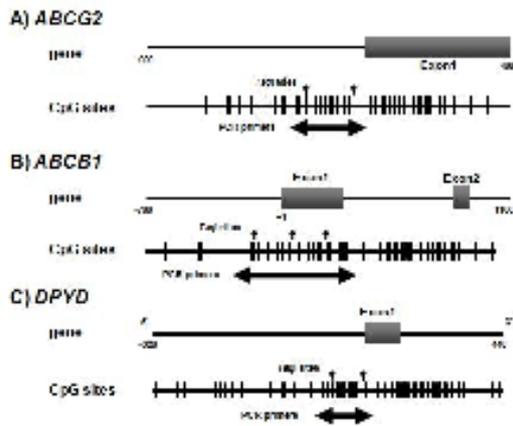


図 1 各遺伝子プロモーターの CpG アイランド

4. 研究成果

(1) 対象患者

日本人肺癌患者 97 症例の背景は、70 歳以上が 54 例、女性が 34 例および喫煙歴ありが 55 例であった。非小細胞肺癌が 91 例、小細胞肺癌が 1 例、大細胞肺癌が 1 例、不明が 4 例であった。非小細胞肺癌の組織型は、腺がんが 74 例および扁平上皮がんが 17 例であった。病期は IA 期が 47 例、IB 期が 22 例、IIA 期が 2 例、IIB 期が 8 例、IIIA 期が 6 例、IIIB 期が 4 例、IV 期が 2 例および不明が 6 例であった。

(2) がん組織における mRNA 発現量 (図 2)

ABCG2 mRNA 発現量には大きな個人差があり、最大で約 100 倍の違いが認められた。要因別に解析した結果、組織型別において、扁平上皮がんと比較して腺がんにおいて有意に発現量が高いことが認められた ($P=0.01$, t-test)。一方、性別、喫煙歴、年齢 (70 歳以上) では有意な差異は認められなかった。一方、*DPYD* mRNA 発現にも同様に傾向が認められ、扁平上皮がんと比較して腺がんにおいて有意に発現量が高いことが認められた ($P<0.01$, t-test, 図 3)。 *ABCB1* mRNA に関し

ては、いずれの要因に対しても有意な差異は認められなかった。

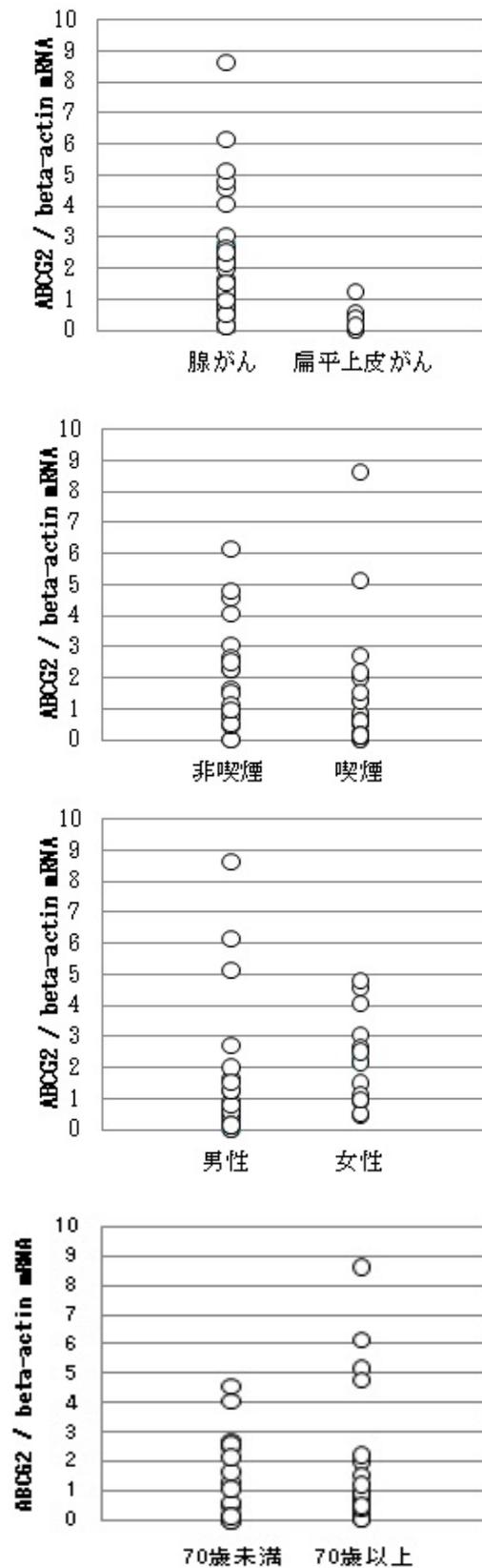


図 2 *ABCG2* mRNA 発現量

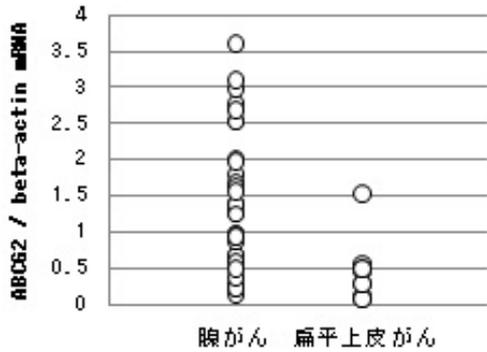


図3 DPYD mRNA 発現量

(3)プロモーター領域のメチル化状態と mRNA 発現量との関連(図4)

COBRA 法で各遺伝子のプロモーター領域のメチル化状態を評価した結果、*ABCB1* 遺伝子に関しては一部の検体で高度にメチル化されており、mRNA の低発現との関連が示唆されたが、ほとんど mRNA 発現量の個人差と関連していなかった。一方、*ABCG2* および *DPYD* において、ほとんど検体でプロモーター領域にメチル化は認められなかった。なお、この定性的評価に加え、ダイレクトシーケンス法による評価も行ったが、メチル化状態は確認されず、COBRA 法による評価の妥当性が確認された。

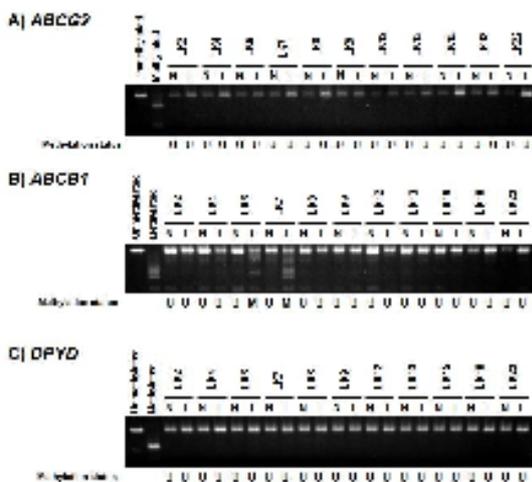


図4 各遺伝子のメチル化状態
 N: 正常組織、T: がん組織
 U: メチル化なし、UM: メチル化あり

(4)まとめ

本研究では、日本人肺癌患者を対象に、肺癌化学療法の臨床効果に影響を及ぼす可能性が示唆される薬物輸送タンパクである BCRP (*ABCG2*)、MDR1 (*ABCG2*)、MRP2 (*ABCC2*)、Ctr1、代謝酵素である DPD (*DPYD*) の肺癌組織における mRNA 発現量の個人差について検討を行った。その結果、BCRP、MDR1、MRP2 および DPD の mRNA 発現量に大きな個人差が認められた。一方、白金製剤の細胞内取り込みに関与する Ctr1 およびグルタチオン抱合に関与する GSTP1 の発現量には大きな個人差は認められなかった。

ABCG2、*ABCG1* および *DPYD* 遺伝子の特徴として、転写活性を制御するプロモーター領域に CpG アイランドが存在する。従って、その発現の個体間変動に関連する可能性が示唆されるプロモーター領域のメチル化状態と遺伝子発現量の関連性について検討を行った。その結果、① *ABCG2*、*ABCG1* および *DPYD* 遺伝子におけるメチル化状態には個人差が存在したが、多くの肺癌組織でメチル状態は低レベルであった。② また、mRNA 発現量とプロモーター領域のメチル化状態には関連性は認められなかった。

以上、本研究より、肺癌組織における多くの薬物輸送タンパクおよび代謝酵素、特に BCRP、MDR1、MRP2 および DPD の発現量に個人差があることが明らかとなったが、その個人差に遺伝子プロモーター領域における CpG アイランドのメチル化は関与していないと考えられた。しかし、BCRP、MDR1、MRP2 および DPD は、肺癌の術後化学療法で標準的に使用される抗がん剤の基質薬物であり、その個人差が臨床効果に影響を及ぼすことが考えられるため、今後のさらなる研究の必要性を示したものである。

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)

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高根 浩 (TAKANE HIROSHI)

鳥取大学・医学部附属病院・主任薬剤師

研究者番号: 50444641