

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：32305

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22717

研究課題名（和文）肺がんの転移に関する転写調節因子による薬物耐性獲得メカニズムの解明

研究課題名（英文）Mechanism of multidrug resistance acquisition by transcriptional regulators involved in lung cancer metastasis

研究代表者

張 協義 (ZHANG, XIEYI)

高崎健康福祉大学・薬学部・博士研究員

研究者番号：60878510

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：多剤耐性タンパク質2（MRP2）はがんの多剤耐性に関与している薬物排出トランスポーターである。本研究では、転写調節因子SlugがMRP2の活性に関与しているか否かを確認した。Slugを導入したHCC827肺がん細胞におけるMRP2のmRNAおよびタンパク質発現量は、Mockと比べて有意に高かった。細胞取り込み実験において、Slugを導入した細胞の細胞内CDCFおよびSN-38濃度は、Mockと比べて有意に減少した。さらに、肺がん患者におけるSlugとMRP2のmRNA発現量に高い相関が認められた。本研究において、SlugがMRP2の発現と機能において調節的な役割を担っていることが証明された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

P-糖タンパク質（P-gp）や乳がん耐性タンパク質（BCRP）、多剤耐性タンパク質2（MRP2）は細胞膜上に局在して薬物を細胞外に排出するトランスポーター（ETPs）であり、がんの多剤耐性に関与している。今までにがんの多剤耐性を抑制する目的でP-gpの阻害薬の開発が進められてきたが、他の手段を用いて多剤耐性を抑制する研究はほとんど行われていない。本研究は、肺がん細胞および肺がん臨床検体において、転写調節因子Slugが足場タンパク質を介さずに直接MRP2の発現量増強に寄与している可能性を見出した。この研究結果より、転写調節因子発現の制御から多剤耐性の制御できる医薬品の創製が期待された。

研究成果の概要（英文）：Multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) is a drug efflux transporter involved in multidrug resistance in cancer. In the present study, we determined whether the transcriptional regulator Slug is involved in MRP2 activity. mRNA and protein expression levels of MRP2 in Slug-transfected HCC827 lung cancer cells were significantly higher compared to Mock. The intracellular uptake of CDCF and SN-38 levels in Slug-transfected HCC827 cells were significantly decreased compared to Mock cells. Furthermore, there was a high correlation between Slug and MRP2 mRNA expression levels in lung cancer patients. This study demonstrates that Slug plays a regulatory role in MRP2 expression and function.

研究分野：生物薬剤学

キーワード：上皮間葉転換 薬物排出系トランスポーター 足場タンパク SN1ファミリー がん転移 転写調節因子 肺がん HCC827肺がん細胞

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

転移を伴うがん患者ではがん組織の外科的な除去が難しいため、その5年生存率は転移していない場合に比べて極めて低い。がん細胞が転移する際には、原発巣の上皮系細胞が血中に浮遊できる間葉系の細胞に転換する経過をたどり、これを上皮間葉転換(Epithelial-mesenchymal transition: EMT)とよぶ。がん細胞はEMTに際して極性と細胞接着性が喪失し、生じた間葉系細胞は浸潤および移動能力を獲得する。EMTの引き金となる転写調節因子としてSNAI family (Snail(SNAI1)、Slug(SNAI2)、Smuc(SNAI3))などが知られており、がんの悪性度の指標にもなっている。一方、EMTはがん細胞からの薬物排出を促進することから薬剤耐性にも関与していることが示唆されているが、その詳細なメカニズムは明らかではない。

P-gpやBCRP、MRP2は細胞膜上に局在して薬物を細胞外にETPsであり、がんの多剤耐性に関与している。最近我々を含めいくつかの研究機関は、1) ETPsのmRNA発現量はその活性と必ずしも相関しないこと、2) ETPsにはそれらを細胞膜上に固定するERM(Ezrin(Ezr)、Radixin(Rdx)およびMoesin(Msn))と呼ばれる足場タンパク質が存在し、このタンパク質の発現がETPsの活性発現の決定因子であること、3) この足場タンパク質はETPs間で異なり、さらに同じETPsであっても発現する組織によって異なること、4) ERMタンパク質はSnailによって発現誘導されることを報告した。具体的に我々は、肺がん細胞にSnailを導入したとき、ERMタンパク質のなかでMsnのmRNAの発現のみが誘導され、P-gpのmRNA量や細胞内総発現量は増えないにも関わらず細胞膜に発現するP-gpは増え、結果としてP-gpの活性が高まる可能性を見出した(Snail Msn P-gp連関係)。これと同様の現象が臨床でも見出されるか否か、肺がん患者から採取した検体を用いて検討したところ、驚くべきことに、SnailのmRNA発現量(がんの悪性度)はMsnのみならずRdxやEzrとも正相関し、P-gpのmRNAとも正相関した。これらはいずれも*in vitro*試験系では観察されなかった事象である。つまり、SnailはMsnの発現を刺激することでP-gpの活性上昇に間接的に関与しているが、実際の臨床においては、Snail以外の転写調節因子も(Msn以外の)ERMタンパク質の発現に関与していること、これらの転写調節因子は足場タンパク質を介さずにP-gpのmRNAや細胞内総発現量の増加にも直接的に関与していること、さらにはMsn以外のERMタンパク質によってP-gp以外のETPsの発現が調節されていること、などの可能性が示唆され、これらのすべてが相乗的に作用し、総合的に肺がん細胞の薬物耐性獲得に関与している(転写調節因子ERM・薬物排出系ETPs連関係)ことが示された。

## 2. 研究の目的

本研究では、転写調節因子Slugが、どの足場タンパク質(特にMsn以外のEzr、Rdx)の活性を調節して間接的に、あるいは足場タンパク質を介さずに直接的に、どのETPs(P-gp、BCRPおよびMRP2)の活性に関与しているかを、肺がん細胞および肺がん患者から採取した検体を用いて確認することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 1. ヒト由来HCC827肺がん細胞を用いた検討

#### (1) ETPsおよびERMタンパク質の発現

肺がん細胞HCC827を培養し、Slug plasmid (Slug) または vector plasmid (Mock) をLipofectamine 3000を用いて導入した。Slug導入はGFP蛍光とSlugのmRNA及びタンパク質発現量を定量することにより確認した。mRNA発現量はRT-PCRを用いて定量した。タンパク質発現量はWestern Blottingを用いて定量した。

#### (2) 細胞CDCFおよびSN-38取り込み実験

MRP2の活性をMRP2の蛍光基質である5(6)-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein (CDCF) およびMRP2の基質であるSN-38を用いたUptake assayより評価した。

#### (3) 細胞生存率実験

MRP2の活性をSN-38添加後のMockおよびSlugを導入した細胞の細胞生存率を比較して評価した。

### 2. 肺がん臨床検体を用いた検討

群馬県立がんセンターから肺がん組織および隣接する非がん組織を入手した。これらの組織は2016年から2018年にかけて9人の肺がん手術患者から得られた。患者の肺組織(約200mg)からmRNAを抽出し、cDNAを合成した。qRT-PCRによってmRNA発現レベルの定量化した。標的遺伝子のmRNA発現レベルは、GAPDHのmRNA発現レベルと比較して、次の式( $C_t$ : Threshold Cycle,

反応の蛍光シグナルが Threshold Line と交差する時点のサイクル数) に従って定量化した。

$$\text{mRNA expression level} = 1000 \times 0.5^{-(\text{Ct}(\text{GAPDH}) - \text{Ct}(\text{target gene}))}$$

遺伝子発現レベルは各人によって異なる可能性があるため、解析には絶対値および相対値を利用した。絶対値は癌組織における遺伝子発現レベルとして定義した。相対値は非癌組織における遺伝子発現レベルに対する癌組織における遺伝子発現レベルの比率として定義した。

#### 4. 研究成果

##### 1. ヒト由来 HCC827 肺がん細胞を用いた検討

##### (1) ETPs および ERM タンパク質の発現

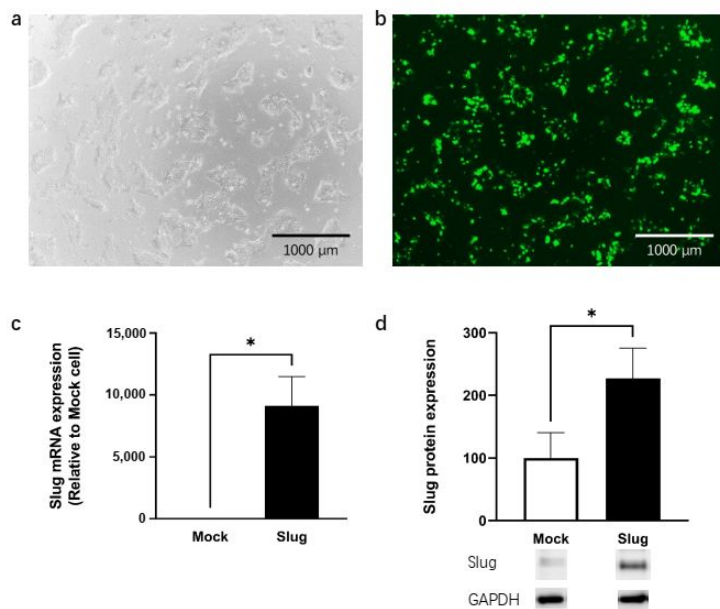


図1 HCC827細胞株にSlugプラスミドを導入することに成功した

蛍光イメージングを用いて、Mock および Slug プラスミドが HCC827 細胞株に導入されたことを確認した (図 1)。Slug を導入した HCC827 細胞における MRP2 の mRNA およびタンパク質発現量は Mock と比べて有意に高かったが、足場タンパク質の mRNA 発現量には有意な差はなかった (図 2、3)。

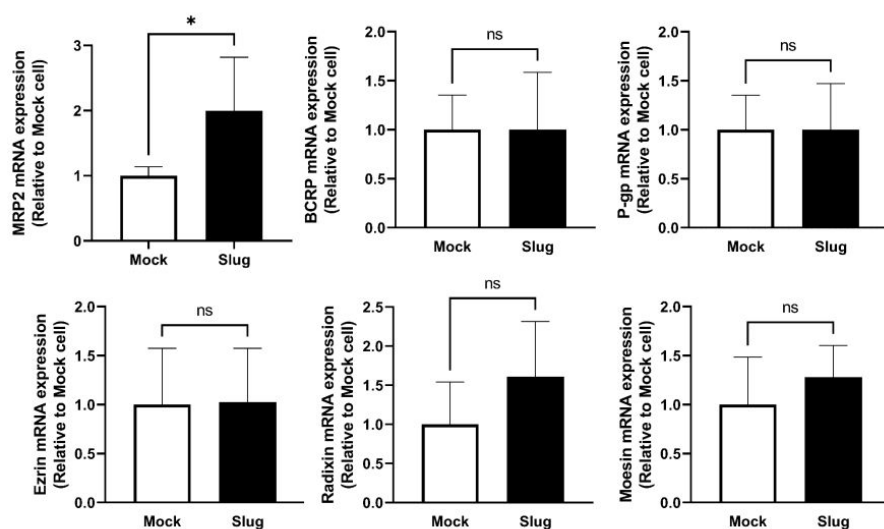


図2 SlugまたはMockを導入したHCC827細胞におけるETPsおよびERMタンパク質のmRNA発現量

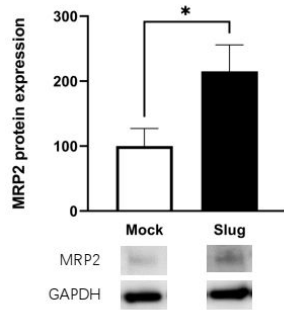


図3 SlugまたはMockを導入したHCC827細胞におけるMRP2のタンパク質の発現量

### (2) 細胞 CDCF および SN-38 取り込み実験

細胞取り込み実験において、HCC827細胞をMRP2基質のCDCF(5 μM)またはSN-38(2 μM)と共にインキュベートした。Slugを導入した細胞におけるCDCFのC/M比は、Mockを導入した細胞より有意に低いことがわかった。さらに、この変化は、MK571処理によって逆転した。このことより、Slugを導入したHCC827細胞の細胞内CDCFおよびSN-38濃度がMockと比べて有意に減少した(図4)。

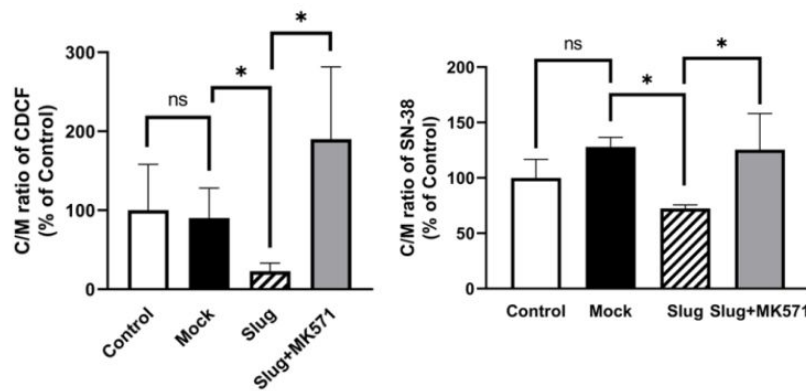


図4 CDCFおよびSN-38細胞取り込み実験

### (3) 細胞生存率実験

Slugを導入したHCC827細胞において、細胞生存率実験を行った。Slugを導入した細胞では、50 μMのSN-38を1時間インキュベートした後、細胞生存率がMockを導入した細胞(25.7%)と比較して有意に増加した(38.0%)。このことより、SN-38を加えたとき、Slugを導入した細胞の細胞生存率はMockと比べて有意に増加した(図5)。

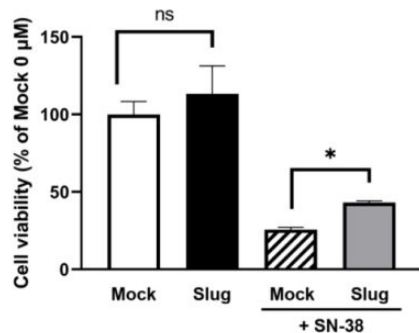


図5 SN-38細胞生存率実験

## 2. 肺がん臨床検体を用いた検討

肺癌患者における Slug と MRP2 の mRNA 発現レベルの絶対値の間に高い相関が見られた。さらに、相対値も高い相関が見られ、臨床検体では Slug が MRP2 の機能的調節に寄与しているものと考えられた。(図6)

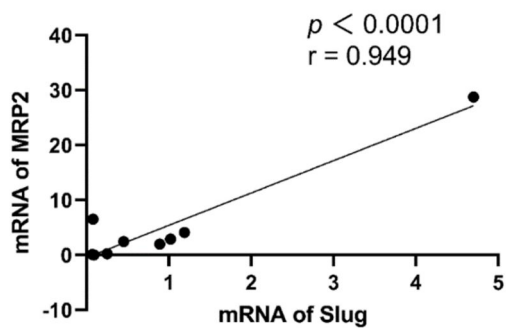


図6 肺癌臨床検体を用いた癌および非癌組織におけるmRNA発現レベルの相関(相対値)

#### まとめ

以上の研究結果より、肺癌細胞および肺癌臨床検体において、Snail 以外の特定の転写調節因子が足場タンパク質を介さずに直接 ETPs の発現量増強に寄与している可能性を見出した。本研究は、肺癌において Slug が MRP2 の発現と機能において調節的な役割を担っていることを証明するものである (Slug 直接 MRP2 連関係)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Zhang Xieyi, Liu Wangyang, Edaki Kazue, Nakazawa Yuta, Kamioka Hiroki, Fujita Atsushi, Onozato Ryoichi, Iijima Misa, Tsuchida Shigeru, Arai Takahiro, Fujita Yukiyoishi, Mizoi Kenta, Ogihara Takuo	4. 巻 2021
2. 論文標題 Correlations of mRNA Levels among Efflux Transporters, Transcriptional Regulators, and Scaffold Proteins in Non-Small-Cell Lung Cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology	6. 最初と最後の頁 1~6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2021/4005327	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 Zhang Xieyi, Liu Wangyang, Edaki Kazue, Nakazawa Yuta, Takahashi Saori, Sunakawa Hiroki, Mizoi Kenta, Ogihara Takuo	4. 巻 12
2. 論文標題 Slug Mediates MRP2 Expression in Non-Small Cell Lung Cancer Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 806~806
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biom12060806	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Xieyi Zhang, Kenta Mizo, Hiroki Kamioka, Kentaro Yano, Takuo 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~2021年

1. 発表者名 Xieyi Zhang, Hiroki Kamioka, Yuta Nakazawa, Kazue Edaki, Kenta Mizoi, Takuo Ogihara
2. 発表標題 The role of scaffold proteins in regulating P-gp expression during epithelial-mesenchymal transition in lung cancer
3. 学会等名 日本薬物動態学会第36回年会（国際学会）
4. 発表年 2021年~2022年

1. 発表者名 Yuta Nakazawa, Xieyi Zhang, Kazue Edaki, Kenta Mizoi, Takuo Ogihara
2. 発表標題 The role of transcriptional factors and scaffold proteins in mediating MRP2 expression in lung cancer cells
3. 学会等名 日本薬物動態学会第36回年会（国際学会）
4. 発表年 2021年～2022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
---------------------------	-----------------------	----

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1件

国際研究集会 日本薬物動態学会第36回年会	開催年 2021年～2022年
--------------------------	--------------------

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
---------	---------