

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790189

研究課題名(和文)がん分子標的治療薬エルロチニブの耐性機構解明と耐性克服薬剤の開発

研究課題名(英文)Molecular basis for resistance to erlotinib and development of agents that reverse the resistance

研究代表者

池田 龍二(Ikeda, Ryuji)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・准教授

研究者番号：50398278

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円、(間接経費) 810,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、上皮増殖因子受容体(EGFR)チロシンキナーゼ阻害薬であるエルロチニブ耐性機序を明確にし、実用的な耐性克服薬剤を開発することを目的とし研究を行った。エルロチニブ耐性細胞株にp-糖タンパク質・MRP1・MRP2・Major vault protein(MVP)の阻害剤であるPAK-104Pを添加すると、エルロチニブの感受性が亢進した。また、最近、MVPがエルロチニブ耐性に関与していることが示されていることから、MVPの発現解析を実施した結果、MVPの発現はUSF(upstream stimulating factor)1によって制御されていることが判明した。

研究成果の概要(英文)：Erlotinib, EGFR tyrosine kinase inhibitor, is an effective therapeutic agent for non-small cell lung cancer. However, inherent or acquired chemoresistance is known to be a major obstacle for anti-cancer therapies. I have isolated erlotinib resistant human non-small cell lung cancer A549 cells. PAK-104P inhibits the functions of p-gp, MRP1, MRP2 and Major vault protein (MVP). PAK-104P partially reversed the erlotinib resistance. It has been reported that the MVP mediates resistance to epidermal growth factor receptor-targeting agent such as erlotinib. I identified the crucial MVP promoter elements that regulate MVP expression. By deletion analysis, a conserved proximal E-box binding site was demonstrated to be important for human MVP promoter transactivation. Introduction of siRNA against USF 1, which is known to bind the E-box binding site, decreased the expression of MVP. These findings suggest that USF1 binding to an E-box element may be critical for basal MVP promoter activation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：がん分子標的薬 erlotinib major vault protein vault PAK-104P

1. 研究開始当初の背景

抗がん剤の領域で、がん分子標的治療薬が脚光を浴びている。現在わが国において、エルロチニブ(非小細胞肺癌)、イマチニブ(慢性骨髄性白血病)、ボルテゾミブ(多発性骨髄腫)、リツキシマブ(B細胞リンパ腫)、ゲフィチニブ(非小細胞肺癌)、ベバシズマブ(大腸がん)、ラパチニブ(乳がん)、ソラフェニブ(腎がん)、エベロリムス(腎がん)などが承認されており、さらにこれらに続く多くのがん分子標的薬の開発が世界規模で進められているところである。現在わが国でも、これらの分子標的治療薬を用いたがんの化学療法が広く行われているが、抗がん剤耐性が大きな問題となっており、耐性機序を解明し実用的な耐性克服の方法を開発することは重要であると考えられる。本研究では、上皮増殖因子受容体(Epidermal Growth Factor Receptor: EGFR)チロシンキナーゼ阻害薬であるエルロチニブの耐性機序を解明することを目的とする。

一方、1986年にラットより vault が細胞内オルガネラとして coated vesicle から単離された。電子顕微鏡による解析から、形態がゴシック様式の大聖堂のアーチ型に似ているため vault と名付けられた。Vault は中空になっており、その中に 70S 大腸菌リボソームを数個取り込めるほど大きく、今日まで報告されている中で最大のリボ核蛋白体を形成している。Vault は、110kDa の MVP/LRP (Major Vault Protein/Lung Resistance Protein) のほかに、240kDa(p240)、193kDa(p193)の蛋白質と 1 種類の vault RNA (vRNA)から構成されている。Vault の構成成分の 1 つである MVP のノックアウトマウスが作製されたが、明らかな病態は観察されず、vault が細胞内で一番大きなリボ核蛋白体であるにも関わらず、その機能は現在まで不明な点が多い。また、p-糖蛋白質を発現していない多剤耐性ヒト肺癌細胞株に

110kDa の蛋白質が発現していることが分り、この蛋白質は LRP と名付けられた。LRP は、ABC トランスポーターではないが、核膜や細胞質小胞に局在しているため細胞内の輸送に関与していることが予想された。Vault の構成成分の 1 つである LRP は多剤耐性に関与していると考えられたが、LRP cDNA をトランスフェクトした細胞は、多剤耐性にはならなかった。最近、vault が、EGFR チロシンキナーゼ阻害薬であるゲフィチニブやエルロチニブ耐性に関与することが分かってきているがその詳細は不明である。

2. 研究の目的

本研究では、エルロチニブ耐性の耐性機序の解明し耐性克服薬剤の開発を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

エルロチニブを含む選択培地でヒト非小細胞肺癌 A549 細胞株を培養し耐性株を単離した。また、ゲムシタピンやイリノテカンに対する耐性細胞株も同様の方法で単離し、エルロチニブに対する感受性を調べた。p-糖タンパク質、MRP1、MRP2 と言った複数のトランスポーターおよび vault の機能を阻害することが認められている PAK-104P を細胞に加え、エルロチニブと培養し、エルロチニブ耐性に与える影響について解析した。

MVP のプロモーター領域には、Y-box、Myo D, GATA, E-box, Sp-1, p53, STAT の結合領域が存在する。MVP のプロモーターをルシフェラーゼ遺伝子の 5'上流に挿入したベクターを MVP の発現が確認されている Sw620 細胞にトランスフェクトし、MVP プロモーター活性を亢進させるかどうかを解析した。さらに、MVP のプロモーターに結合している転写因子を同定するために、ChIP (クロマチン免疫沈降)アッセイを実施した。

4. 研究成果

A549 エルロチニブ耐性細胞は、エルロチニブ耐性を示した。また、A549 イリノテカン耐性細胞 (A549/イリノテカン R) も同様にエルロチニブに対して耐性を獲得していた。一方、ゲムシタピンに耐性を獲得した A549 細胞 (A549/ゲムシタピン R) は、エルロチニブに対して耐性を示さなかった。

PAK-104P は、P-糖タンパク質・MRP1・MRP2 といった複数のトランスポーターや MVP の機能を阻害することが分かっている。そこで、PAK-104P を細胞に加え、エルロチニブと培養し、エルロチニブ耐性に与える影響について解析したところ、PAK-104P 存在下では、非存在下の場合と比較して、細胞の増殖が抑制された。この結果から、PAK-104P はエルロチニブの耐性を克服する薬剤として有用であることが示された。

最近、vault が、EGFR チロシンキナーゼ阻害剤であるエルロチニブに耐性を示すことが示されてきている (Losert A., *et al.*, *Cancer Letters*, 319: 164-172, 2014.)。そこで vault の主要な構成成分である MVP の発現解析を実施した。まず、正常組織における MVP の発現を RT-PCR で調べたところ、心臓、胎盤、肺、肝臓、腎臓、膵臓といった正常組織に発現が認められた。また、ヒト大腸癌細胞株 SW-620 における MVP の発現を調べたところ、高い発現が認められ、MVP の局在は主に細胞質であった。

Vault は、110 kDa の MVP / LRP (Major Vault Protein / Lung Resistance Protein) の他に、240 kDa、193 kDa の蛋白質と 1 種類の vault RNA から構成されている。MVP のプロモーター領域には、Y-Box、MyoD、GATA、E-box、Sp-1、p53、stat が存在する。MVP のプロモーターをルシフェラーゼ遺伝子の 5' 上流に挿入したベクターを SW-620 細胞にトランスフェクトし、デュアルルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、Y-Box、MyoD、GATA、E-box、Sp-1、p53、stat のすべての

結合部位が含まれる MVP プロモーターでは、ルシフェラーゼ活性が、200 倍以上上昇した。また、MyoD および GATA の結合部位を欠損させると、ルシフェラーゼ活性は、158 倍になり、さらに E-box を欠損させると、活性が 35 倍まで低下した。この結果、MVP の発現を制御しているもっとも重要な領域は、E-box ではないかと考えた。

USF (upstream stimulating factor) 1 は、E-box に結合する Basic-Helix-Loop-Helix Leucine Zipper 型の転写因子である。USF1 の発現によって MVP の発現が制御されているかどうかを調べるために、USF1 の siRNA を作製し SW620 細胞に取り込ませた。その結果、USF1 の発現の減少が認められ、同時に MVP の発現も抑制された。また、MVP の発現が高いヒト腎がん ACHN 細胞でも同様に、USF1 siRNA を ACHN 細胞に取り込ませたところ、MVP の発現が抑制された。

さらに、USF1 が MVP のプロモーターに結合しているかどうかを調べるために、ChIP (クロマチン免疫沈降) アッセイを実施した。その結果、USF1 が MVP のプロモーター領域に結合していることが判明した。

抗がん剤耐性には、初回治療時から薬剤耐性を示す自然耐性と治療している間に抗がん剤が効かなくなる獲得耐性がある。今回の本研究において、MVP の発現には、USF1 の発現が重要であることが判明し、PAK-104P は、vault、P-糖タンパク質、MRP1、MRP2 および MVP の機能を抑制することが知られている耐性克服薬剤でエルロチニブの耐性克服にも有用であることが示された。

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)

[雑誌論文] (計 16 件)

(1) Oiso, S., Takayama, Y., Nakazaki, R., Matsunaga, N., Motooka, C., Yamamura, A., Ikeda, R., Nakamura, K., Takeda, Y.,

Kariyazono, H., Factors involved in the cisplatin resistance of KCP-4 human epidermoid carcinoma cells, *Oncol. Rep.*, 31: 719-726, 2014. (査読)

(2) Ikeda, R., Nishizawa, Y., Tajitsu, Y., Minami, K., Mataka, H., Masuda, S., Furukawa, T., Akiyama, S., Yamada, K., Takeda, Y., Regulation of Major Vault Protein Expression by Upstream Stimulating Factor 1 in SW620 Human Colon Cancer Cells, *Oncol. Rep.*, 31: 197-201, 2014. (査読)

(3) Tamai, M., Matsushita, S., Miyano-hara, H., Imuta, N., Ikeda, R., Kawai, K., Nishi, J., Sakamoto, A., Shigihara, T., Kanekura, T., Antimicrobial effect of an ultrasonic levitation washer disinfectant with silver electrolysis and ozone oxidation on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *J. Dermatol.*, 40: 1020-1026, 2013. (査読)

(4) Shinsato, Y., Furukawa, T., Yunoue, S., Yonezawa, H., Minami, K., Nishizawa, Y., Ikeda, R., Kawahara, K., Yamamoto, M., Hirano, H., Tokimura, H., Arita, K., Reduction of MLH1 and PMS2 confers temozolomide resistance and is associated with recurrence of glioblastoma, *Oncotarget*, 4: 2261-2270, 2013. (査読)

(5) Tajitsu, Y., Ikeda, R., Nishizawa, Y., Mataka, H., Che, X.F., Sumizawa, T., Nitta, M., Yamaguchi, T., Yamamoto, M., Tabata, S., Akiyama, S.I., Yamada, K., Furukawa, T., Takeda, Y., Molecular basis for the expression of major vault protein induced by hyperosmotic stress in SW620 human

colon cancer cells, *Int. J. Mol. Med.*, 32: 703-708, 2013. (査読)

(6) Ikeda, R., Tabata, S., Tajitsu, Y., Nishizawa, Y., Minami, K., Furukawa, T., Yamamoto, M., Shinsato, Y., Akiyama, S.I., Yamada, K., Takeda, Y., Molecular basis for the regulation of hypoxia-inducible factor-1 α levels by 2-deoxy-D-ribose, *Oncol. Rep.*, 30: 1444-1448, 2013. (査読)

(7) Wang, J., Ikeda, R., Che, X.F., Ooyama, A., Yamamoto, M., Furukawa, T., Hasui, K., Zheng, C.L., Tajitsu, Y., Oka, T., Tabata, S., Nishizawa, Y., Eizuru, Y., Akiyama, S.I., VEGF expression is augmented by hypoxia-induced PGIS in human fibroblasts, *Int. J. Oncol.*, 43: 746-754, 2013. (査読)

(8) Saito, H., Nakamachi, T., Inoue, K., Ikeda, R., Kitamura, K., Minamino, N., Shioda, S., Miyata, A., Autocrine effects of neuromedin B stimulate the proliferation of rat primary osteoblasts, *J. Endocrinol.*, 217: 141-150, 2013. (査読)

(9) Ikeda, R., Vermeulen, L.C., Lau, E., Jiang, Z., Saha, S., Reichelderfer, M., Kolesar, J.M., Stability of infliximab in polyvinyl chloride bags., *Am. J. Health Syst. Pharm.*, 69: 1509-1512, 2012. (査読)

(10) Matsushita, S., Ikeda, R., Fukushima, T., Tajitsu, Y., Gunshin, K., Okumura, H., Ushiyama, M., Akiyama, S., Kawai, K., Takeda, Y., Yamada, K., Kanekura, T., p53R2 is a prognostic factor of melanoma and regulates proliferation and chemosensitivity of melanoma cells., *J.*

Dermatol. Sci., 68: 19-24, 2012. (査読)

(11) Miyawaki, A., Hijioka, H., Ikeda, R., Ishida, T., Nozoe, E., Nakamura, N., Analysis of the outcome of concurrent neoadjuvant chemoradiotherapy with S-1 compared to super-selective intra-arterial infusion for oral squamous cell carcinoma, Oncol. Lett., 3: 995-1001, 2012. (査読)

(12) Saito, H., Ikeda, R., Inoue, K., Nagata, S., Kitamura, K., Minamino, N., Kangawa, K., Miyata, A., Neuromedin B stimulates proliferation of mouse chondrogenic cell line ATDC5, Peptides, 36: 299-302, 2012. (査読)

(13) Oiso, S., Ikeda, R., Nakamura, K., Takeda, Y., Akiyama, S., Kariyazono, H., Involvement of NF- κ B activation in the cisplatin resistance of human epidermoid carcinoma KCP-4 cells, Oncol. Rep., 28: 27-32, 2012. (査読)

(14) Tabata, S., Ikeda, R., Yamamoto, M., Furukawa, T., Kuramoto, T., Takeda, Y., Yamada, K., Haraguchi, M., Nishioka, Y., Sone, S., Akiyama, S., Thymidine phosphorylase activity is involved in augmented reactive oxygen species and interleukin-8 production in human cancer cells, Oncol. Rep., 28: 895-902, 2012. (査読、)

(15) Shibayama, Y., Iwashita, Y., Yoshikawa, Y., Kondo, T., Ikeda, R., Takeda, Y., Osada, T., Sugawara, M., Yamada, K., Iseki, K., Effect of 5-fluorouracil treatment on SN-38 absorption from intestine in rats., Biol. Pharm. Bull., 34: 1418-1425, 2011. (査読)

)

(16) Shibayama, Y., Nakano, K., Maeda, H., Taguchi, M., Ikeda, R., Sugawara, M., Iseki, K., Takeda, Y., Yamada, K., Multidrug resistance protein 2 implicates anticancer drug-resistance to sorafenib. Biol. Pharm. Bull., 34: 433-435, 2011. (査読)

[学会発表](計15件)

(1) 西澤由紀彦、池田龍二、田實裕介、川原康一、山本雅達、新里能成、南謙太郎、古川龍彦、武田泰生、KB3-1細胞における5-aza-2-deoxycytidine (5-AZ)による5-fluorouracil(5-FU)の抗腫瘍効果増強作用、第87回日本薬理学会年会、仙台市、2014.

(2) 有馬由佳、有馬純子、新田美奈、下堂蘭権洋、池田龍二、武田泰生、処方監査手順書と抗がん剤チェックリストの導入によるがん化学療法監査均てん化への取り組み、日本臨床腫瘍薬学会学術大会2014、千葉市、2014.

(3) 池田龍二、がん治療の最先端・基礎と臨床から- 抗がん剤治療における現状と問題点、第30回日本薬学会九州支部会、長崎市、2013.

(4) Ikeda, R., Nishizawa, Y., Tajitsu, Y., Yamada, K., Takeda, Y., Molecular basis for regulation of hypoxia-inducible factor-1 alpha level by 2-deoxy-D-ribose、第7回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム、仙台市、2013.

(5) 池田龍二、西澤由紀彦、田實裕介、古川龍彦、山田勝士、武田泰生、Vaultの高浸透圧耐性化機構、第66回日本薬理学会西南部会、福岡市、2013.

(6) 池田龍二、田實裕介、西澤由紀彦、古川

龍彦、秋山伸一、山田勝士、武田泰生、高浸透圧で誘導されるヴォールトの発現亢進機序と高浸透圧耐性化機構、第 86 回日本薬理学会年会、福岡市、2013.

(7) 益田将吾、二川俊隆、山口沙織、山田勝士、池田龍二、武田泰生、グリオーマの移動・浸潤における Caspr1 の役割、第 65 回日本薬理学会西南部会、熊本市、2012.

(8) Ikeda, R., Tajitsu, Y., Nishizawa, Y., Tominaga, N., Mataka, H., Yamada, K., Takeda, Y., Molecular basis for the induction of vaults by anti-cancer agent and the role of vaults in resistance to anti-cancer agents、第 6 回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム、京都市、2012.

(9) 本田修平、西原和也、園田純一郎、池田龍二、鳴海恵子、河内明夫、徳重恵利紗、武田泰生、本屋敏郎、緑茶カテキン Epigallocatechin-3-gallate (EGCg) の抗がん特性、第 29 回日本薬学会九州支部大会、熊本市、2012.

(10) Shimodozono, Y., Yaji, K., Ikeda, R., Takeda, Y., A survey on communication skills for the trainees pharmaceutical practice、第 22 回日本医療薬学会年会、新潟市、2012.

(11) 有馬純子、佐藤史織、下堂蘭権洋、池田龍二、武田泰生、手術部における薬剤師の取り組みと経済効果、医療薬学フォーラム 2012/第 20 回クリニカルファーマシーシンポジウム、福岡市、2012.

(12) 西澤由紀彦、池田龍二、田畑祥、田實裕介、俣木博徳、古川龍彦、牛山美奈、山口辰哉、山本雅達、松下茂人、秋山伸一、山田勝

士、武田泰生、チミジンホスホリラーゼ発現腫瘍での 5-fluorouracil (5-FU) による thrombospondin-1 (TSP-1) 発現誘導、第 64 回日本薬理学会西南部会、福岡市、2011.

(13) 田實裕介、池田龍二、田畑祥、西澤由紀彦、山口辰哉、牛山美奈、山本雅達、古川龍彦、秋山伸一、山田勝士、武田泰生、高浸透圧による major vault protein (MVP)発現制御における Sp1 の役割、第 64 回日本薬理学会西南部会、福岡市、2011.

(14) Ikeda, R., Tajitsu, Y., Nishizawa, Y., Tabata, S., Ushiyama, M., Furukawa, T., Akiyama, S., Yamada, K., Takeda, Y., Hyperosmotic stress up-regulates the expression of major vault protein in SW620 human colon cancer cells、第 5 回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム、名古屋市、2011.

(15) 池田龍二、武田泰生、山田勝士、抗がん剤耐性機序の解明に向けて、第 5 回日本緩和医療薬学会年会、千葉市、2011.

〔図書〕(計 1 件)

(1) 薬剤耐性 Up-to-Date 感染症・がん領域を中心に がん領域
抗がん剤耐性機序の解明に向けて
月刊薬事 2012, Vol.54 No.8, 51-56.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田 龍二 (Ikeda Ryuji)
鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・准教授

研究者番号 : 50398278