

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 11 月 27 日現在

機関番号：32305

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590667

研究課題名(和文) 排出系トランスポーター群の翻訳後共通因子を標的とするがん多剤耐性克服手法の構築

研究課題名(英文) The construction of a means to overcome cancerous multidrug resistance by mediating the post-translational regulators of drug-efflux transporters

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) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：がん多剤耐性の主要な因子として知られるP-糖タンパク質(P-gp)は多くの薬物の排出にしている。本検討結果からその輸送機能は、消化管の正常組織およびがん細胞においては、肝臓がん細胞と同様にezrin, radixin, moesin (ERM)と呼ばれるタンパクのうちradixinによって調節されていることを見出した。一方、腎臓の正常組織およびがん細胞においては、どのERMタンパクも関与していないことが示唆された。従って、同一の組織においては、正常とがんの間にERMタンパクによるP-gpの調節機構に差はなかったものの、消化管と腎臓のような多組織間ではその機構が異なっていることが考えられた。

研究成果の概要(英文)：P-glycoprotein (P-gp) excretes many therapeutic drugs from the cytoplasm to outside the cells. Therefore, it is well known as a major factor in multidrug resistance of cancer cells. Our previous study demonstrated that radixin among ezrin, radixin and moesin (ERM proteins) regulated P-gp transport activity and membrane localization. In this study, we investigated the relationship between P-gp and ERM proteins in cancer cells from other organs. The transport activity of intestinal P-gp was regulated by radixin in both normal and cancer cells. On the other hand, it was suggested that none of the ERM proteins affected the renal P-gp in either normal or cancer cells. Thus, we hypothesize that the functional regulation mechanism of P-gp via ERM proteins varies between different organs, such as the intestine and kidney, but not between normal and cancer cells in the same organ.

研究分野：生物薬剤学

キーワード：P-糖タンパク がん多剤耐性 裏打ちタンパク 膜上発現 調節因子 ERMタンパク 組織選択性

1. 研究開始当初の背景

タンパク質は mRNA を鋳型として生成され、その機能を発揮する。このため、その機能活性の指標として mRNA 量がしばしば測定されているが、タンパク質としての発現量あるいは活性は、その mRNA 量に必ずしも依存していない。我々はラットの全小腸を用いた連続ループ法によって、P-gp の活性およびタンパク質発現量と mRNA 発現量はかならずしも相関していないことを明らかにしている。これに対してトランスポーターは細胞膜上に発現することで、その機能を発揮する。従って、P-gp を細胞膜上に移動あるいは、繋ぎとめておく因子が存在していることが推測される。これに対して、ヒト肝がん由来細胞 HepG2 において、P-gp が MRP2(P-gp とは異なる薬剤排出トランスポーター)で報告されている事象と同様に、ERM タンパクに属する radixin と呼ばれるタンパク質によってその細胞膜上の局在が調節されていることを明らかにしている。

2. 研究の目的

肝がん細胞において radixin が P-gp の輸送機能を調節していたことから、各がん細胞における radixin の機能を抑制することによって、P-gp や MRP2 などの複数の排出系トランスポーターの輸送機能を同時にかつ網羅的に抑えることができるのではないかと考えた。しかしながら、正常組織および他の臓器のがん細胞においても P-gp に対して同様の調節メカニズムがはたしているのかは明らかになっていない。そこで、まずは正常な組織における P-gp の機能調節因子を明らかにすることで、P-gp の調節メカニズムに臓器特異性があるのか否かを示す。さらに、肝がん細胞以外のがん細胞における多剤耐性を克服するためにも、radixin の機能抑制剤が有用であるのか否かを検討することを目的とした。

3. 研究の方法

マウス in vivo における正常組織の P-gp 発現部位差と輸送機能調節因子の探索

(1)小腸における P-gp の発現

radixin 欠損型および野生型マウスの小腸を上部から下部にかけて分割し、P-gp の mRNA を real time PCR 法を用いて確認した。さらに、各画分の組織から細胞膜を抽出し、組織全体および細胞膜画分における P-gp のタンパク質発現量を確認することで細胞内における局在を評価した。

(2)P-gp 基質薬物の体内動態変動

P-gp 基質薬物である rhodamine123(Rho123)を radixin 遺伝子欠損型および野生型マウスに経口投与し、その血漿中濃度を測定することで体内動態の変動を確認した。

(3)受動拡散マーカーの体内動態変動

トランスポーターでは輸送されないアンチピリンを radixin 遺伝子欠損型および野生型マウスに経口投与し、その血中濃度を測定することで受動拡散の変動を確認した。

各種ヒト由来がん細胞を用いた検討

(1) P-gp および各 ERM タンパクが発現している細胞のスクリーニング

ヒト結腸がん由来 Caco-2 細胞をはじめ、複数種のヒト癌細胞を用いて、P-gp および各 ERM タンパクの mRNA の発現を real time PCR 法を用いて確認した。

(2)siRNA 処理による mRNA 発現量の変化

上記(1)にて各 mRNA の発現が確認された細胞に siRNA 処理を行ない、mRNA 発現が適切に抑制できているのかを real time PCR 法により評価した。

(3) P-gp 輸送機能評価

Rho123 を siRNA により ERM タンパクの発現を抑制した各種がん細胞に添加し、一定時間後の細胞内蓄積量を定量することにより評価した。

(4)腎臓がん細胞における ERM タンパクのタンパク質発現量評価

siRNA 処理後のがん細胞における ERM タンパクのタンパク質発現量を Western blotting により定量した。

4. 研究成果

マウス in vivo における正常組織の P-gp 発現部位差と輸送機能調節因子の探索

(1)小腸における P-gp の発現

radixin 欠損型および野生型マウスの小腸どちらにおいても、上部から下部にかけて P-gp の mRNA 発現量は増加していた(図 1)。

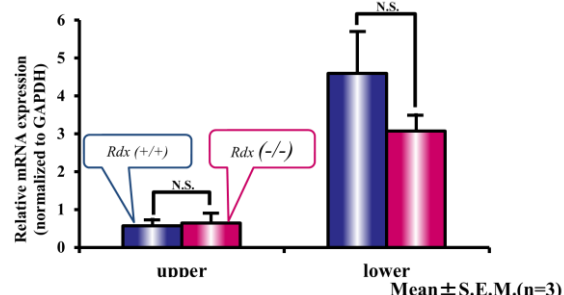


図1 野生型およびradixin欠損マウスの小腸におけるP-gpのmRNA発現量

さらに、小腸を等間隔で 3 部位に分けた際、各部位の組織全体における P-gp のタンパク質発現量も、上部から下部にかけて増加しており、mRNA 発現量とよく相関していた(図 2)。一方、各部位の組織から細胞膜を抽出し、細胞膜画分における P-gp のタンパク質発現量を確認したところ、radixin を欠損したマウスでは野生型マウスと比較して P-gp の細胞膜上発現量が低下していた(図 3)。従って、radixin が P-gp の細胞膜上発現に関わる翻訳後調節因子として機能していることが示唆された一方で、P-gp の遺伝子発現(転写調節)には影響を与えないことが確認された。

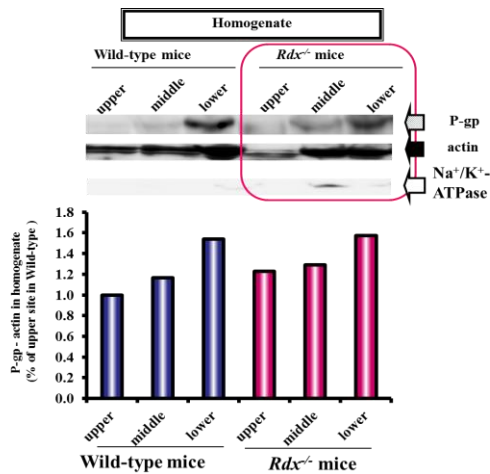


図2 野生型およびradixin欠損マウス的小腸組織全体におけるP-gpのタンパク発現量

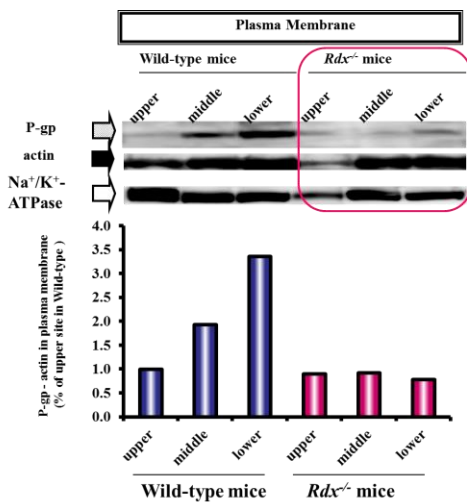


図3 野生型およびradixin欠損マウス的小腸細胞膜におけるP-gpのタンパク発現量

(2) P-gp 基質薬物の体内動態変動

radixin 欠損型マウスに P-gp 基質薬物である Rho123 を経口投与すると、最高血中濃度 (C_{max}) が 79.7 ± 2.0 ng/mL を示し、野生型マウスの 40.0 ± 9.3 ng/mL と比較して優位に増加していた。一方、半減期は各々 208 ± 19 (radixin 欠損型) と 169 ± 8.8 min (野生型) で顕著な差は認められなかった。加えて、2 本 1 組の遺伝子のうち、1 本が野生型でもう 1 本が欠損型であるヘテロ型の遺伝子を有するマウスでは、C_{max} および血中濃度時間曲

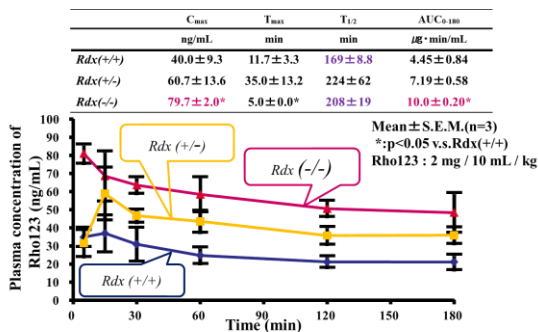


図4 野生型およびradixin欠損マウスにおけるRho123の血中濃度推移

線下面積(AUC)は、いずれも radixin 欠損型と野生型の間値を示した(図 4)。C_{max} の増加が見られたことから、Rho123 の吸収が亢進していたことが示唆された。さらに、いずれのマウスにおいても消失半減期に変化が見られなかったことから、Rho123 の主要な排泄臓器である腎臓においては、その排泄能に radixin が関与していないことが示唆された。

(3) 受動拡散マーカーの体内動態変動

トランスポーターを介さず細胞膜を透過するアンチピリンを radixin 欠損型および野生型マウスに経口投与すると、どの薬物動態パラメータにおいても差はなく、その体内動態は同じであった(図 5)。本結果より、(2)で見

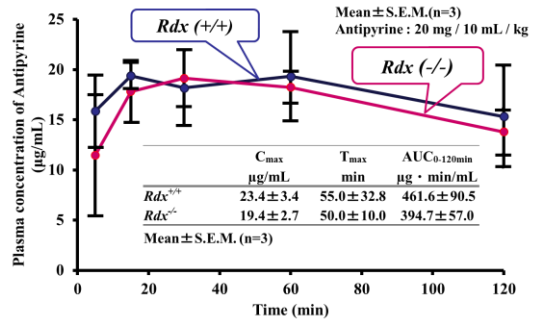


図5 野生型およびradixin欠損マウスにおけるAntipyrineの血中濃度推移

られた Rho123 の吸収増加の原因としては、膜構造の変化による膜透過性が上昇ではなく、P-gp の輸送機能の低下による消化管中への排泄減少が関与していたことが示唆された。

各種ヒト由来がん細胞を用いた検討

(1) P-gp および各 ERM タンパクが発現している細胞のスクリーニング

ヒトの結腸がん (Caco-2)、腎臓がん (Caki-1)、肺がん (A549) および乳腺がん (MCF7) 細胞を用いて、real time PCR 法により P-gp の発現を確認した。Caco-2 および Caki-1 細胞においては、P-gp の発現が確認され、以降の検討に用いた。一方、A549 および MCF7 細胞においては、僅かな発現が確認されたものの、機能を評価するには不十分であり、以降の検討からは除外した。

(2) siRNA 処理による mRNA 発現量の変化

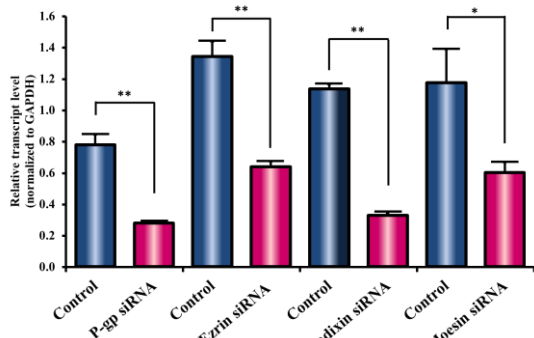


図6 Caco-2細胞における各siRNAの効果

Caco-2 および Caki-1 細胞に ERM および P-gp の siRNA を処理したところ、各 mRNA 発現量の顕著な低下が確認された(図 6, 7)。

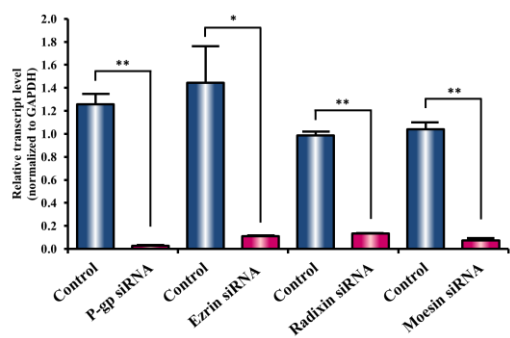


図7 Caki-1細胞における各siRNAの効果

従って、siRNA 処理の適切な系が確立したと考えられ、本方法を用いて(3)および(4)の検討に着手した。

(3) P-gp 輸送機能評価

Caco-2 細胞の P-gp の遺伝子発現を siRNA 処理により抑制したところ、Rho123 の細胞内蓄積量は顕著に増加し、P-gp の輸送機能低下が確認された。各 ERM タンパクに対する siRNA 処理した際には、radixin の遺伝子発現を抑制した細胞においてのみ、Rho123 の細胞内蓄積量の増加が見られ、P-gp の輸送機能が低下していることが示唆された。一方、ezrin および moesin の遺伝子発現抑制は、Rho123 の細胞内蓄積量に影響しなかったことから、P-gp の輸送機能調節には関与していないことが示唆された(図 8)。

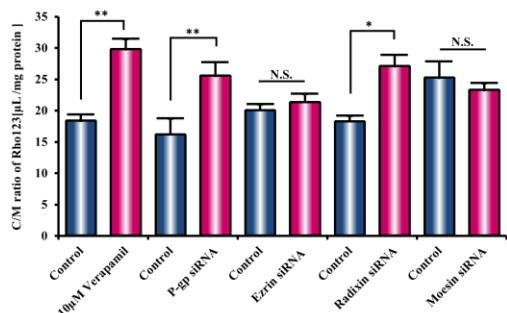


図8 Caco-2細胞のP-gp輸送機能に対する各siRNAの効果

(4)腎臓がん細胞における ERM タンパクのタンパク発現量評価

Caki-1 細胞の P-gp の遺伝子発現を siRNA 処理により抑制したところ、Caco-2 細胞同様に Rho123 の細胞内蓄積量は顕著に増加し、P-gp の輸送機能低下が確認された。これに対して、各 ERM タンパクに対する siRNA 処理した際には、タンパク発現レベルで十分な低下が確認できたにもかかわらず、Rho123 の細胞内蓄積量には影響がみられなかった(図 9)。このことから、Caki-1 細胞の P-gp の輸送機能調節には、ERM タンパクは関与していないことが示唆された。

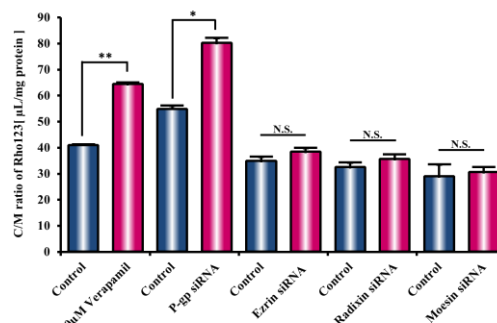


図9 Caki-1細胞のP-gp輸送機能に対する各siRNAの効果

まとめ

以上の結果より、消化管におけ P-gp の発現には部位差があり、特にその細胞膜上発現が radixin 遺伝子欠損マウスにおいて消失したことから、細胞膜上での発現調節に radixin が関与していることが示唆された。加えて radixin による P-gp の膜上発現量の調節は、P-gp の輸送機能にもダイレクトに影響しており、特に薬物の吸収部位である消化管においてはその調節機構がはたらいっているものの、腎臓においては関与しないことが示された。

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 4 件)

(1) Kentaro Yano, Suzune Mita, Kaori Morimoto, Tamami Haraguchi, Hiroshi Arakawa, Miyako Yoshida, Fumiyoshi Yamashita, Takahiro Uchida, Takuo Ogihara

Multiple Linear Regression Analysis Indicates Association of P-Glycoprotein Substrate or Inhibitor Character with Bitterness Intensity, Measured with a Sensor

J Pharm Sci. 2014 Dec 24. doi:

0.1002/jps.24232. [Epub ahead of print]

(2) Kentaro Yano, Shinobu Takimoto, Toshimitsu Motegi, Takumi Tomono, Mihoko Hagiwara, Yoko Idota, Kaori Morimoto, Akira Takahara, Takuo Ogihara
Role of P-Glycoprotein in Regulating Cilnidipine Distribution to Intact and Ischemic Brain

Drug Metab Pharmacokinet.

2014;29(3):254-8. Epub 2013 Dec 24.

(3) Kentaro Yano, Takumi Tomono, Riyo Sakai, Takashi Kano, Kaori Morimoto, Yukio Kato, Takuo Ogihara

Contribution of radixin to P-glycoprotein expression and transport activity in mouse

small intestine in vivo
J Pharm Sci. 2013 Aug;102(8):2875-81. doi:
10.1002/jps.23637. Epub 2013 Jun 10.

(4) Sho Wada, Takashi Kano, Suzune Mita,
Yoko Idota, Kaori Morimoto, Fumiyoshi
Yamashita, Takuo Ogihara

The role of inter-segmental differences in
P-glycoprotein expression and activity
along the rat small intestine in causing the
double-peak phenomenon of substrate
plasma concentration

[学会発表] (計 14 件)

(1) Takumi Tomono, Kentaro Yano, Toshi
mitsu Motegi, Shinobu Takimoto, Mihok
o Hagiwara, Yoko Idota, Takashi Kano,
Hiroshi Arakawa, Kaori Morimoto, Chih
aya Kakinuma, Akira Takahara, Takuo
Ogihara

P-glycoprotein Plays a Key Role in the
Contractionary Effects Brain Infarction
of Cilnidipine, 19th North American ISSX/
29th JSSX Meeting, San Francisco, 10/19
-23, 2014.

(2) 大塚杏磨, 矢野健太郎, 川端秀明, 金井
祐樹, 伴野拓巳, 荒川 大, 萩原琢男
RadixinによるP-gp機能調節の臓器差 第58
回日本薬学会関東支部大会, 東京, 10/4, 201
4.

(3) 川端秀明, 矢野健太郎, 大塚杏磨, 金井祐
樹, 伴野拓巳, 荒川 大, 萩原琢男
ヒト癌細胞の P-gp 輸送活性に対する radixin の
関与 第 9 回トランスポーター研究会年会, 名古屋,
6/14-15, 2014.

(4) 三田鈴音, 矢野健太郎, 荒川 大, 原口珠
実, 吉田 都, 内田享弘, 萩原琢男
薬物の苦味による P-糖タンパクの基質認識性の
予測 日本薬剤学会 第 29 回年会, さいたま市
大宮区, 5/20-22, 2014.

(5) 三田鈴音, 矢野健太郎, 荒川 大, 原口
珠実, 吉田 都, 内田享弘, 萩原琢男
苦味センサーを用いた P-糖タンパクの基質認
識性の解析, 第 57 回日本薬学会関東支部大
会, I-08, 東京, 10/26, 2013.

(6) 川端秀明, 矢野健太郎, 伴野拓巳, 荒川
大, 萩原琢男
P-糖タンパク機能発現における Radixin の役
割, 第 57 回日本薬学会関東支部大会,
P-160, 東京, 10/26, 2013.

(7) Kentaro Yano, Takumi Tomono, Hideaki

Kawabata, Yoko Idota, Kaori Morimoto,
Hiroshi Arakawa, Takuo Ogihara

Contribution of radixin to P-glycoprotein
expression and transport activity, 28th
JSSX Annual Meeting, 2-B-09-2, Tokyo,
10/9-11, 2013.

(8) 伴野拓巳, 矢野健太郎, 川端秀明, 荒川
大, 萩原琢男

Contribution of radixin to P-glycoprotein
expression and transport activity in mouse
small intestine *in vivo*, 第 8 回トランスポー
ター研究会年会, 熊本, 6/15-16, 2013.

(9) 大塚杏磨, 伴野拓巳, 阿部 遼, 三田鈴
音, 金川雅彦, 荒川 大, 矢野健太郎, 萩原
琢男

ゴマリグナンによるP-糖タンパク質基質の消化
管吸収における影響の検討, 第8回トランス
ポーター研究会年会, 熊本, 6/15-16, 2013.

(10) Sho Wada, Takuo Ogihara, Takeo
Nakanishi, Ikumi Tamai

Double-peak phenomena caused by
intestinal segmental difference of
P-glycoprotein activity, 4th ISSX/CSSX
Joint Workshop, Henan, China, 5/17-19,
2013.

(11) Takumi Tomono, Riyo Sakai, Kentaro
Yano, Kaori Morimoto, Yukio Kato, Takuo
Ogihara

Contribution of Radixin in Segmental
Difference of P-glycoprotein Expression in
Small Intestine, 27th Japan Society for the
Study of Xenobiotics, 1-B-O2-4, 船堀,
11/20-22, 2012.

(12) Toshimitsu Motegi, Shinobu Takimoto,
Mihoko Hagiwara, Yoko Idota, Kaori
Morimoto, Chihaya Kakinuma, Akira
Takahara, Takuo Ogihara

Participation of P-glycoprotein to the Brain
Distribution of Cilnidipine in Ischemia,
27th Japan Society for the Study of
Xenobiotics, 1-B-O2-3, 船堀, 11/20-22,
2012.

(13) 萩原琢男, 萩原美帆子, 高原 章
脳虚血時におけるシルニジピンの脳内移行性
に対する P-糖タンパク質の関与, 第 35 回日本
高血圧学会総会, PA-3-082, 名古屋, 9/20/-22,
2012.

(14) 酒井理予, 叶 隆, 和田 翔, 森本かおり,
加藤将夫, 萩原琢男

Radixin は P-糖タンパクの小腸発現に
関与する, 日本薬剤学会第 27 年会, 24-2-23,
神戸, 5/24-26, 2012.

〔図書〕(計 4件)

(1) 荻原琢男, 井戸田陽子

2 試料の調製および分析法, 薬剤学実験法必携マニュアル Pharmaceutical Scientist のために II 生物薬剤学, 15-29, 南江堂, 2014.

(2) 荻原琢男

第1章 総論, わかりやすい生物薬剤学 第5版, 1-11, 廣川書店, 2014.

(3) 荻原琢男, 井戸田陽子

第5章 トランスポーターを利用した DDS 開発, 第1節 薬物トランスポーターの研究と DDS 開発への活用例, DDS 製剤の開発・評価と実用化手法, 243-250, (株)技術情報協会, 2013.

(4) 荻原琢男, 井戸田陽子

バイオ/抗体医薬品の開発・製造プロセス-開発・解析・毒性・臨床・申請・製造・特許・市場-, 19-37, 情報機構, 2012.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

高崎健康福祉大学薬学部生物薬剤学研究室

http://www.takasaki-u.ac.jp/p_yaku_lab/yaku-03-05/

1.2014年10月 Certificate of JSSX Travel Grant 2014 大学院1年生の伴野拓巳君が、10月にサンフランシスコで行われた薬物動態学会第29年会から発表要旨や過去の発表実績が評価され、表彰されました。

2.2014年5月優秀発表賞 学部6年生の川端秀明君が、5月に名古屋で行われたトランスポーター研究会年会にてポスター発表をし、優秀発表賞を受賞しました。

3.2013年6月優秀発表賞 学部6年生の伴野拓巳君と学部4年生の大塚杏磨君が、5月に熊本で行われたトランスポーター研究会年会にてポスター発表をし、優秀発表賞を受賞しました。

4.ひらめきときめきサイエンス～高校生講座

～2013年8月8日実施

6. 研究組織

(1)研究代表者

荻原 琢男 (Takuo Ogihara)

高崎健康福祉大学大学院・薬学研究科・臨床薬物動態学分野・教授

研究者番号: 80448886

(2)研究分担者

森本 かおり (Kaori Morimoto)

高崎健康福祉大学・薬学部・講師

研究者番号: 90401009

平成25年3月19日削除

(3)研究分担者

梶田 昌裕 (Masahiro Kajita)

高崎健康福祉大学・薬学部・准教授

研究者番号: 40591871

平成27年2月4日削除

(4)研究分担者

井戸田 陽子 (Yoko Idota)

高崎健康福祉大学・薬学部・研究員

研究者番号: 90629594

(5)研究分担者

矢野 健太郎 (Kentaro Yano)

高崎健康福祉大学・薬学部・助手

研究者番号: 40644290