

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：32305

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08078

研究課題名(和文) 膜裏打ちタンパクの制御による臓器特異的ながん多剤耐性の非働化

研究課題名(英文) Organ-specific inactivation of cancer multidrug resistance by regulating membrane scaffold proteins

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：P-glycoprotein (P-gp)などの排出系トランスポーター群は細胞内に取り込まれた薬物の多くを細胞外に排出し、がん多剤耐性の主要な因子として機能している。本研究結果から、排出系トランスポーター群の輸送機能は各種足場タンパクによって臓器特異的に調節されていることが示された。また、肺がんのように、複数種の排出系トランスポーターが同一の足場タンパクにて調節される組織が存在することが示された。したがって、ある種のがん組織においては特定の足場タンパクの機能を抑制することで、がん多剤耐性に関わる排出系トランスポーターの網羅的な非働化が可能となることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Efflux transporters, as exemplified by P-glycoprotein (P-gp), are localized at the plasma membrane and excrete many therapeutic drugs from the cytoplasm to outside the cells. These transporters are therefore known as a major contributing factor resulting in multidrug resistance of cancer cells. Our study indicated that the regulation of transporters by scaffold proteins, such as ezrin, radixin and moesin (ERM proteins) is different between cancerous tissues. Moreover, these regulatory properties are the same as those of the corresponding normal tissues, and suggest that organ-specific differences in the regulation of P-gp by ERM proteins are retained in cancerous tissues. Furthermore, in tissues such as lung cancer, several efflux transporters were controlled by the same one scaffold protein. Therefore, it was suggested that the suppression of a specific scaffold protein comprehensively inactivated efflux transporters in certain kinds of cancerous tissue.

研究分野：生物薬剤学、薬物動態学

キーワード：P-gp BCRP MRP s 網羅的な阻害 足場タンパク がん組織 排出系トランスポーター 多剤耐性

1. 研究開始当初の背景

トランスポーターは細胞膜内外の物質の輸送を行なっている。したがって、その機能を発揮するためには、細胞膜上に発現している必要がある。中でも P-糖タンパク(P-gp)などの排出系トランスポーターは、がん細胞において過剰に発現しており、抗がん薬耐性の主要な因子のひとつとして考えられている。しかしながら、各組織において P-gp がどのようにして細胞膜上に発現しているのかについては、報告が乏しかった。一方、ある種の膜タンパクは Ezrin (Ezr)、Radixin (Rdx) および Moesin (Msn) (ERM タンパク) と呼ばれる足場タンパクによって、細胞膜上の発現が調節されている。そこで我々はマウスの小腸における P-gp が ERM タンパクいずれによって調節されているのかを検討したところ、Rdx に調節されていることを明らかにした。また、主要な排泄臓器のひとつである腎臓においては、ERM いずれの足場タンパクも P-gp の輸送機能には関与していないことが示された。

2. 研究の目的

これまでの我々の結果および既存の報告から、P-gp は一部の正常組織にも発現しており、肝臓および消化管においては正常およびがん細胞の区別なく、Rdx が P-gp の細胞膜上発現および輸送機能に寄与している。しかしながら腎臓の P-gp については関与しておらず、他の裏打ちタンパクの関与が想定される。そこで裏打ちタンパクを個別に制御することによって、臓器特異的に排出系トランスポーター群による多剤耐性を同時に網羅的に非働化することが可能であるか否かを検討し、がん多剤耐性克服のための新規薬効標的としての裏打ちタンパクの可能性および有用性を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

各種がん細胞における排出系トランスポーターおよび ERM タンパクの発現量

(1) がん細胞における P-gp および各 ERM タンパクの発現

ヒト結腸がん由来(Caco-2)細胞、ヒト腎臓がん由来(Caki-1)細胞およびヒト肺がん細胞(HCC827)細胞を培養し、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各トランスポーターあるいは ERM タンパクの 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) 基質薬物の細胞内蓄積量

siRNA により ERM タンパクの発現を抑制した各種がん細胞に、P-gp 基質薬物である rhodamine 123 (Rho123)あるいは BCRP 基質薬物である SN-38 (イリノテカンの活性化代

謝物)を添加し、一定時間後の細胞内蓄積量を蛍光プレートリーダーまたは高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて定量した。

(4) P-gp 基質薬物の細胞外排出速度

Rho123 または SN-38 を添加し、一定時間経過後に細胞外へ排出された薬物量を(3)と同様の方法にて定量した。

(5) 腎臓がん細胞における ERM タンパクのタンパク発現量

Caki-1 細胞に ERM タンパクの siRNA を処理し、各標的タンパク発現量を Western blotting により定量した。

(6) 受動拡散マーカーの体内動態変動

Caco-2 細胞の ERM タンパクの発現を siRNA により抑制したとき、トランスポーターでは輸送れない Evans blue の細胞膜透過量が変化するかを検討した。

4. 研究成果

各種ヒト由来がん細胞を用いた検討

(1) 各種トランスポーターおよび ERM タンパクの発現

Caco-2、Caki-1 および HCC827 細胞を用いて、real time PCR 法により P-gp、BCRP および ERM タンパクの mRNA 発現を確認した。

(2) siRNA 処理による mRNA 発現量の変化

Caco-2、Caki-1 および HCC827 細胞に P-gp、BCRP および ERM タンパクの siRNA を処理したところ、各 mRNA 発現量の有意な低下が確認された。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) 消化管がん細胞における P-gp 輸送機能評価(Uptake study)

Caco-2 細胞の P-gp の遺伝子発現を siRNA 処理により抑制、あるいは阻害薬である Verapamil にて前処理したところ、Rho123

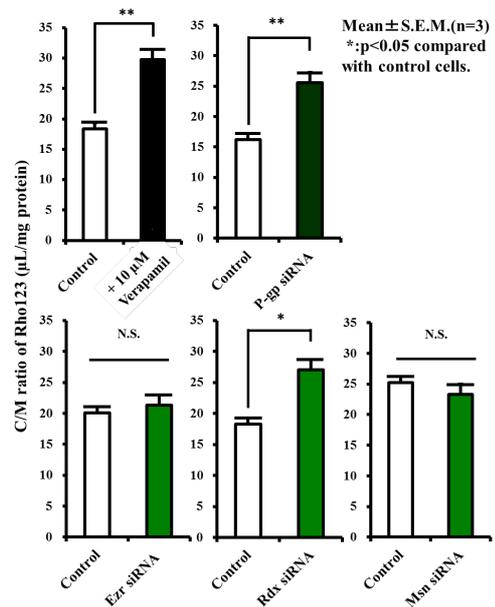


図1 Caco-2細胞のP-gpの輸送機能に対するERMタンパクの関与

の細胞内蓄積量は有意に増加し、P-gp の輸送機能低下が確認された。並行して各 ERM タンパクに対する siRNA を処理した際には、Rdx 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認められた。一方、Ezr および Msn 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 Rdx のみが関与していることが示唆された(図 1)。

(4) 膜透過性マーカーの細胞内蓄積量 (Uptake study)

ERM タンパクは細胞膜構造の形成に関与していることから、Rdx の発現抑制が細胞膜に損傷を与え、その結果として Rho123 の透過量が増えたことが否定できない。そこで、Rdx の遺伝子抑制時にトランスポーターによって輸送されず細胞膜を透過しない Evans blue を用いて、細胞内蓄積量の変化を検討した。その結果、Ethanol のように細胞膜を直接損傷させた場合には有意に Evans blue の細胞内蓄積量が増加したものの、Rdx の発現抑制時には未処置群と差はなく、その細胞内蓄積量は同じであった(図 2)。本結果より、(2)で認められた Rho123 の蓄積増加の原因としては、P-gp の輸送機能の低下による細胞外排出の低下が関与していたことが示唆された。

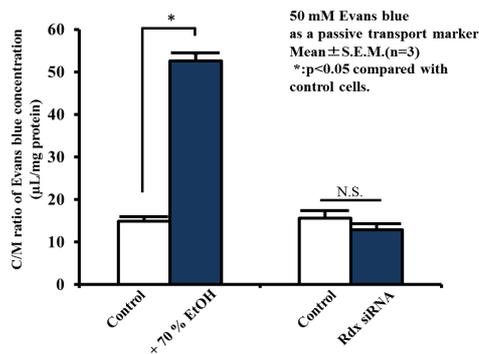


図3 Caco-2 cells の細胞膜透過性における Rdx knockdown の影響

(5) 腎臓がん細胞における P-gp の輸送機能 (Uptake study) と 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 を処理した際には、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認められなかった(図 3)。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。

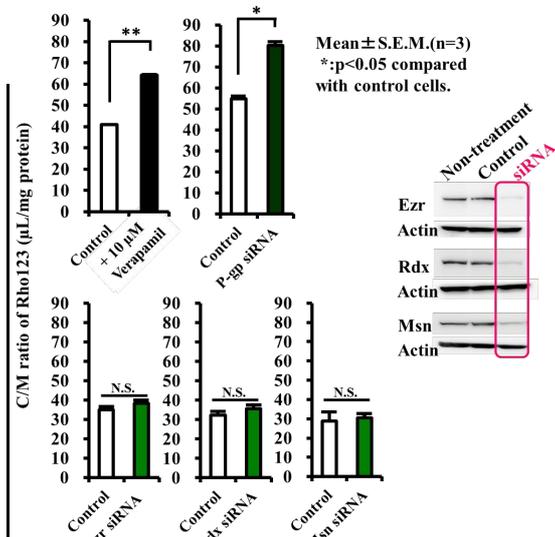


図3 Caki-1細胞のP-gpの輸送機能に対するERM タンパクの関与

(6) 肺がん細胞における P-gp 輸送機能評価 (Efflux assay)

HCC827 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 の細胞外排出速度は有意に減少し、P-gp の輸送機能低下が確認された。並行して各 ERM タンパクに対する siRNA を処理した際には、Ezr および Msn の遺伝子発現を抑制した細胞において、Rho123 の排出速度の減少が認められ、P-gp の輸送機能が低下していること

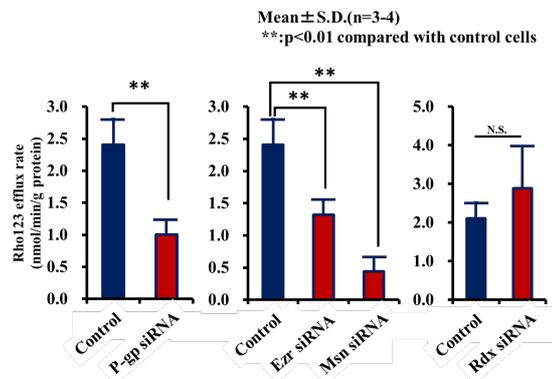


図4 HCC827細胞のP-gpの輸送機能に対する ERMタンパクの関与

が示唆された。一方、Rdx の遺伝子発現抑制は、Rho123 の排出速度に影響を与えなかったことから、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 4)。

(7) 肺がん細胞における BCRP 輸送機能評価 (Efflux assay)

HCC827 細胞の BCRP の遺伝子発現を siRNA 処理により抑制したところ、SN-38 の細胞外排出速度は有意に減少し、BCRP の輸送機能低下が確認された。並行して Ezr および Msn に対する siRNA を処理した際には、Ezr および Msn の遺伝子発現を抑制した細胞において、SN-38 の排出速度の減少が認められ、BCRP の輸送機能が低下していることが示唆された(図 5)。

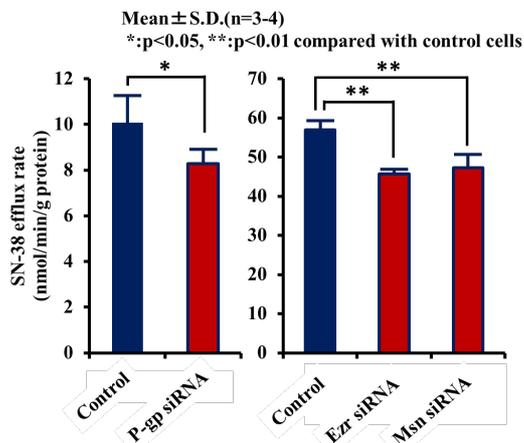


図5 HCC827細胞のBCRPの輸送機能に対するEzrおよびMsnの関与

まとめ

以上の結果より、排出系トランスポーターの機能調節は、組織ごとに異なった足場タンパクによって調節されていることが示唆された。さらに、肺がんのようにある種の組織に置いては、複数の排出系トランスポーターの輸送機能が、同一の足場タンパクによって調節されていることが確認された。これらのことから、由来とする組織によっては、特定の足場タンパクの機能を抑制することで、網羅的な排出系トランスポーターの非働化が可能となることが期待された。

表1 各種がん細胞においてトランスポーターの機能調節に関する足場タンパク

	Caco-2 (Intestine)	Caki-1 (Kidney)	HCC827 (Lung)
P-gp	Rdx	ERMは関与していない	Ezr & Msn
BCRP	unknown	Rdx	Ezr & Msn

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 6 件)

(1) Kentaro Yano, Saori Shimizu, Takumi Tomono, Takuo Ogihara

Gastrointestinal Hormone Cholecystokinin Increases P-Glycoprotein Membrane Localization and Transport Activity in Caco-2 Cells, *J. Pharm. Sci.*, 106(9), 2650-2656 2017.

(2) Takumi Tomono, Kentaro Yano, Takuo Ogihara

Snail-Induced Epithelial-to-Mesenchymal Transition Enhances P-gp-Mediated Multidrug Resistance in HCC827 Cells, *J. Pharm. Sci.*, 106(9), 2642-2649 2017.

(3) 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]

(4) 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.

(5) 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.

(6) 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 20 件)

(1) 岡部千明, 矢野健太郎, 藤井健太, 加藤木綿子, 小山智志, 荻原琢男

臓器特異的なBCRPおよびP-gpの輸送機能調節, 日本薬物動態学会第32回年会, 東京, 11/29-12/1, 2017.

(2) 富所いつき, 伴野拓巳, 上岡宏規, 小山智志, 矢野健太郎, 荻原琢男

Snailが誘発するEMTにおける排出系トランスポーター発現への影響, 日本薬物動態学会第32回年会, 東京, 11/29-12/1, 2017.

(3) 伴野拓巳, 上岡宏規, 柴崎由実, 小山智志, 矢野健太郎, 荻原琢男

Snail誘発性の上皮間葉転換は足場タンパクMoesinの上昇を介してP-gpを活性化する, 日本薬物動態学会第32回年会, 東京, 11/29-12/1, 2017.

(4) 矢野健太郎, 横塚弥衣, 松本映子, 小山智志, 荻原琢男

神経調節物質であるSpermineのBCRPによる脳移行調節と脳内分布の変化, 日本薬物動態学会第32回年会, 東京, 11/29-12/1, 2017.

(5) 荻原琢男, 森本かおり, 井戸田陽子, 小山智志, 矢野健太郎
P-糖タンパクを介した薬物の脳内移行性の制御OseltamivirとCilnidipineの例, 第39回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 金沢, 10/26-27, 2017.

(6) 矢野健太郎, 渡邊弥生, 伴野拓巳, 荻原琢男
消化管ホルモンであるコレシストキニンによるP-糖タンパク質の細胞膜上発現および輸送機能の亢進, 第12回トランスポーター研究会年会, 仙台, 7/8-9, 2017.

(7) Takumi Tomono, Kentaro Yano, Toshimitsu Motegi, Shinobu Takimoto, Mihoko Hagiwara, Yoko Idota, Takashi Kano, Hiroshi Arakawa, Kaori Morimoto, Chihaya 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.

(8) 大塚杏磨, 矢野健太郎, 川端秀明, 金井祐樹, 伴野拓巳, 荒川大, 荻原琢男
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, 2014.

(9) 川端秀明, 矢野健太郎, 大塚杏磨, 金井祐樹, 伴野拓巳, 荒川大, 荻原琢男
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.

(10) 三田鈴音, 矢野健太郎, 荒川大, 原口珠実, 吉田都, 内田享弘, 荻原琢男
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.

(11) 三田鈴音, 矢野健太郎, 荒川大, 原口珠実, 吉田都, 内田享弘, 荻原琢男
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.

(12) 川端秀明, 矢野健太郎, 伴野拓巳, 荒川大, 荻原琢男

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.

(13) 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.

(14) 伴野拓巳, 矢野健太郎, 川端秀明, 荒川大, 荻原琢男
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.

(15) 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, 荻原琢男
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.

(16) 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.

(17) 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.

(18) 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.

(19) 荻原琢男, 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.

(20) 酒井理予, 叶 隆, 和田 翔, 森本かおり, 加藤将夫, 荻原琢男
Radixin は P-糖タンパクの小腸発現に關与する, 日本薬劑学会第 27 年会, 24-2-23, 神戸, 5/24-26, 2012.

〔図書〕(計 6 件)

(1) 荻原琢男, 矢野健太郎, 小山智志, 伴野拓巳, 井戸田陽子
高崎健康福祉大学薬学部生物薬劑学研究室の研究紹介(2)-設立 10 周年, 充実してきた研究成果-, 日本薬物動態学会アドメサークル, NL32(6), 2017.

(2) 荻原琢男, 矢野健太郎, 小山智志
高崎健康福祉大学薬学部生物薬劑学研究室の研究紹介(1)-薬劑学研究の新しい潮流を目指して-, 日本薬物動態学会アドメサークル, NL32(5), 2017.

(3) 荻原琢男, 井戸田陽子
2 試料の調製および分析法, 薬劑学実験法必携マニュアル Pharmaceutical Scientist のために 生物薬劑学, 15-29, 南江堂, 2014.

(4) 荻原琢男
第 1 章 総論, わかりやすい生物薬劑学 第 5 版, 1-11, 廣川書店, 2014.

(5) 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 製劑の開発・評価と実用化手法, 243-250, (株)技術情報協会, 2013.

(6) 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 0 件)
- 取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

高崎健康福祉大学薬学部生物薬劑学研究室
http://www.takasaki-u.ac.jp/p_yaku_lab/yaku-03-05/

1. 荻原琢男教授が平成 28 年度科研費審査委員として表彰されました。
2. 小山智志助手が Lush Prize 2017, Young Researcher-Asia を受賞しました。
3. 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。

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・薬学研究所・臨床薬物動態学分野・教授
研究者番号: 80448886

(2) 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

(3) 連携研究者

荒川 大 (Hiroshi Arakawa)
金沢大学・医薬保健研究域薬学系・助教
研究者番号: 40709028

(4) 連携研究者

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