

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06806

研究課題名(和文) トランスポーター周辺タンパク質は抗がん薬多剤耐性克服のターゲットとなり得るか？

研究課題名(英文) Modulation of transporter-associated proteins to overcome the anticancer drug resistance

研究代表者

川瀬 篤史 (Kawase, Atsushi)

近畿大学・薬学部・准教授

研究者番号：80411578

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題は、がん細胞の抗がん薬多剤耐性の原因のひとつである排出トランスポーターの発現および機能亢進をトランスポーター周辺タンパク質を標的として克服する試みである。トランスポーター周辺タンパク質のひとつであるradixinおよびEBP50が排出トランスポーターのうち特にMRPの膜局在および機能発現に関与していることを明らかにした。さらに、MRP基質となる抗がん薬であるメトトレキサートを用い抗がん作用に対するトランスポーター周辺タンパク質ノックダウンの影響を評価したところ、メトトレキサートの細胞内蓄積および細胞増殖抑制作用が上昇することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん化学療法において、抗がん薬の細胞内送達の効率が十分でなく、その原因として、細胞内から細胞外へと抗がん薬を排出するトランスポーターの関与が知られている。本研究では、トランスポーターの膜局在をトランスポーターの周辺タンパク質の機能低下により起こす試みであり、本研究課題の成果は抗がん薬を効率良くがん細胞に送達する新たな方法として極めて重要な知見となり得ると考えられる。今回、いくつかのトランスポーター周辺タンパク質を利用することで、抗がん作用の増強が確認され、本手法をさらに発展させることは効果的ながん化学療法において有益であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Efflux transporters such as P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein in cancer cells actively pump anti-cancer drugs out. This study aims to clarify the effects of knockdown of transporter-associated proteins to overcome the anticancer drug resistance. This study demonstrated that the knockdown of scaffold proteins such as radixin and EBP50 led to increases of the intracellular accumulation of MRP substrates such as methotrexate. Furthermore, the anticancer effects of methotrexate were elevated by knockdown of radixin in HepG2 cells and mice. This approach provides a better understanding of the modulation of transporter activity to overcome the anticancer drug resistance.

研究分野：生物薬剤学

キーワード：トランスポーター 裏打ちタンパク質 抗がん薬 P-糖タンパク質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

トランスポーターは肝臓や腎臓など全身的に広く発現しており、基質の細胞膜輸送を調節することで体内動態を決定する因子のひとつとなる。近年、トランスポーター単独ではなく、トランスポーター周辺環境が輸送活性に影響することが明らかとなり、ERM タンパク質 (ezrin, radixin, moesin) は裏打ちタンパク質としてトランスポーターの膜局在および機能発現に重要な役割を担っている。これまでに種々の病態の発生や進行に関わる炎症を取り上げ、複数の炎症モデル動物を用い薬物動態に影響する因子、例えば血漿タンパク結合、代謝酵素およびトランスポーターなどの炎症時の変動について検討を行ってきた。トランスポーター発現および機能変動は、基質薬物の体内動態に影響し、効果減弱や副作用を引き起こす原因となるため、トランスポーターを活用したドラッグデリバリー法は期待される手法のひとつである。

ERM タンパク質は、通常細胞質で不活性な closed 型として存在し、C 末がリン酸化を受けると活性な open 型となり、細胞骨格のアクチン線維 (F-アクチン) と排出トランスポーターとを連結させる機能を担っている。これまでに radixin の活性型であるリン酸化が炎症時の肝臓で抑制され、トランスポーターの膜局在および輸送活性低下を促すことを明らかにしてきた。今回、得られた知見に基づき、がん細胞においても肝臓と同様にトランスポーター周辺タンパク質機能を調整することで、排出トランスポーター機能を抑制できる可能性が考えられた。がん細胞では悪性化に伴い排出トランスポーター発現が亢進し、抗がん薬多剤耐性能獲得の一因となることが知られている。本法を多剤耐性能の克服における新たなアプローチとして確立することができた場合、化学療法の効果増強のみならず副作用低減、さらには抗がん薬の投与量減量に伴う医療費削減においても非常に意義があると考えられる。

さらに、ERM タンパク質以外のトランスポーター周辺タンパク質として、ERM タンパク質の活性化に関わる phosphatidylinositol (PI) 4,5-bisphosphate (PIP2) 生成酵素である PI 4-phosphate 5-kinase (PIP5K)、およびトランスポーターと ERM タンパク質を仲介するタンパク質 ezrin-radixin-moesin-binding phosphoprotein 50 (EBP50) も標的タンパク質として利用できる可能性が考えられる。

2. 研究の目的

これまで単独のトランスポーターの阻害剤を用いた多剤耐性能の克服については検討されてきたものの、いずれも十分な効果が得られていない。その原因のひとつとして抗がん薬は複数のトランスポーターの基質である場合が多く、単一のトランスポーターを阻害するのみでは抗がん薬のがん細胞への蓄積効果が不十分であることが挙げられる。また、トランスポーター発現は全身に広く分布していることからがん細胞以外に対する影響(副作用)も大きかった。本研究課題ではがん細胞で発現亢進を既に確認しているトランスポーター周辺タンパク質に着目し、トランスポーターの膜局在を低下させることで抗がん薬の細胞外への排出を抑制が可能であるかを検討する。

3. 研究の方法

In vitro で ERM タンパク質ノックダウン時のトランスポーター発現および機能評価：これまでに肝臓で検討を進めてきた ERM タンパク質について siRNA を用い *in vitro* でノックダウン時のトランスポーター発現および機能を検討する。検討細胞：臓器由来によるノックダウンの影響の違いを併せて評価するために下記の細胞の使用を予定している。ヒト肝がん由来細胞株 HepG2、ヒト肺がん由来細胞株 A549、ヒト乳がん由来細胞株 MDA-MB-453、ヒト膵がん由来細胞株 PANC-1、マウス悪性黒色腫 B16 など。評価トランスポーター：がん細胞において多剤耐性の原因となる multidrug resistance-associated protein (MRP/ABCC)、P-glycoprotein (P-gp/ABCB) および breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2)

トランスポーター発現量は細胞から調製した膜タンパク質および粗タンパク質を用い標的プロテオミクス法により同一サンプル内で一斉に定量することとする。既に Hersman らの論文 (J Pharmacol Exp Ther, 349, 221-228, 2014) を参考にマウス肝臓から複数のシトクロム P450 を標的プロテオミクス法により同時定量可能であることを確認しており、本課題で測定対象とするタンパク質についても定量限界、真度および精度(同時再現性および日差再現性)を評価し、従来のウエスタンブロット法と比較し十分な優位性がみられることを確認した。トランスポーター活性は蛍光基質を用い ERM タンパク質ノックダウン時の細胞内蓄積量より測定した。

In vitro で PIP5K および EBP50 ノックダウン時のトランスポーター発現および機能評価：ERM タンパク質以外のトランスポーター周辺タンパク質として PIP5K および EBP50 について siRNA を用い *in vitro* でノックダウン時のトランスポーター発現および機能を検討した。PIP5K は複数のアイソフォームが存在し、本検討では PIP2 の生合成に主に関わる 1A、1B および 1C を選択し検討を行う。また、PIP5K および EBP50 単独での検討に加え、有効なターゲット分子と組合せ複

数のターゲットをノックダウンしたときのトランスポーター発現および機能評価を行った。 *In vivo* でトランスポーター周辺タンパク質ノックダウン時のトランスポーター機能および抗がん作用評価：これまでに *in vitro* で検討したターゲット分子のうち、トランスポーター活性の抑制に有効性を示した単独あるいは組合せを用い *in vivo* で抗がん薬多剤耐性能および抗がん作用に対する影響を評価した。動物実験系：マウス背部皮下にルシフェラーゼ発現がん細胞を投与し、腫瘍径が 5 mm に到達した時点で siRNA を *in vivo* jetPEI などの導入試薬を用い腫瘍内投与する。ノックダウン効率を経時的に評価し、十分なノックダウン効果が得られた段階で複数のトランスポーターの基質となる抗がん薬 (methotrexate) を腫瘍内投与し、がん細胞内の蓄積を評価した。さらに、抗がん作用を腫瘍径および生存率の測定により行った。腫瘍径のみではがん細胞の内部環境を評価することは困難であるため、IVIS imaging system を用い発光させたがん細胞を観察することで非侵襲的にがん細胞の増殖を確認した。

4. 研究成果

In vitro の検討において、今回トランスポーター周辺タンパク質として取り上げた ERM タンパク質、PIP5K および EBP50 のうち、特に radixin と EBP50 において排出トランスポーターの膜局在および機能発現を調節する機能が見いだされ、それらのターゲット分子を利用することで抗がん薬の細胞内蓄積の上昇や抗がん薬による抗がん作用の上昇につながる可能性が考えられた。そこで、トランスポーターの蛍光基質を用い細胞内蓄積に対するターゲット分子のノックダウン効果を判定した後、抗がん薬を用い、細胞増殖抑制作用および *in vivo* における抗腫瘍作用を評価することとした。その結果、radixin ノックダウンによりがん細胞内の methotrexate の蓄積が control と比べ有意に上昇することが明らかとなり、がん細胞の増殖の抑制につながることを示された。また、EBP50 においては *in vivo* の評価には至らなかったが、*in vitro* で抗がん薬の細胞内蓄積および細胞増殖抑制作用を上昇することが明らかとなった。これらの結果より、トランスポーター周辺タンパク質を標的とした抗がん薬耐性克服に向けたアプローチは抗がん薬の細胞内蓄積の改善や抗がん作用の向上において有用な方法である可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Kawase Atsushi, Inoue Yuta, Hirosoko Miho, Sugihara Yuka, Shimada Hiroaki, Iwaki Masahiro | 4. 巻 22 |
| 2. 論文標題 Decrease in Multidrug Resistance-associated Protein 2 Activities by Knockdown of Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase in Hepatocytes and Cancer Cells | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences | 6. 最初と最後の頁 576 ~ 584 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18433/jpps30444 | 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 Kawase A, Nakasaka M, Bando H, Yasuda S, Shimada H, Iwaki M | 4. 巻 43 |
| 2. 論文標題 Changes in Radixin Expression and Interaction with Efflux Transporters in the Liver of Adjuvant-Induced Arthritic Rats | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Inflammation | 6. 最初と最後の頁 85 ~ 94 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10753-019-01097-9 | 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 Kawase Atsushi, Inoue Yuta, Nakazaki Sayaka, Koizumi Erika, Iwaki Masahiro | 4. 巻 42 |
| 2. 論文標題 Radixin knockdown improves the accumulation and efficiency of methotrexate in tumor cells | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Oncology Reports | 6. 最初と最後の頁 283 ~ 290 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/or.2019.7162 | 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 Kawase Atsushi, Hirosoko Miho, Sugihara Yuka, Koyama Yunosuke, Fukae Ayaka, Shimada Hiroaki, Iwaki Masahiro | 4. 巻 14 |
| 2. 論文標題 NHERF1/EBP50 as a Target for Modulation of MRP Function in HepG2 Cells | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Pharmaceuticals | 6. 最初と最後の頁 239 ~ 246 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ph14030239 | 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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 Kawase Atsushi |
| 2. 発表標題 Modulation of transporter activities in hepatocytes and cancer cells by knockdown of transporter-associated proteins |
| 3. 学会等名 The 2nd Workshop for Korea-Japan Young Scientists on Pharmaceutics (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Kawase Atsushi, Inoue Yuta, Hirosoke Miho, Shimada Hiroaki, Iwaki Masahiro |
| 2. 発表標題 Modulation of transporter activities in cancer cells by transporter-associated proteins |
| 3. 学会等名 2018 MDO/JSSX (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 川瀬篤史, 井上裕太, 廣底美保, 杉原由華, 島田紘明, 岩城正宏 |
| 2. 発表標題 トランスポーター裏打ちタンパク質を利用した抗がん薬デリバリー効率の改善 |
| 3. 学会等名 日本薬学会第139年会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 廣底美保, 川瀬篤史, 井上裕太, 杉原由華, 小山勇之介, 島田紘明, 岩城正宏 |
| 2. 発表標題 抗がん薬デリバリー効率の改善を目指して ~トランスポーター裏打ちタンパク質の調節を利用したトランスポーター発現低下への試み~ |
| 3. 学会等名 未来創薬医療イノベーションシンポジウム |
| 4. 発表年 2018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0件

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|