

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：32723

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16451

研究課題名(和文)再発性リンパ腫の多剤耐性能および転移能の獲得機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism for acquiring multidrug resistance and metastatic potential in recurrent lymphoma

研究代表者

矢野 健太郎 (Yano, Kentaro)

横浜薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：40644290

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：B細胞由来の非ホジキンリンパ腫に分類される濾胞性リンパ腫(FL)に対して、臨床で用いられる抗がん薬を継続的に曝露したところ、薬物耐性能の亢進が認められた。また、耐性能が亢進した細胞において、P-糖タンパク質(P-gp)の発現亢進に基づく輸送機能亢進が認められた。一方で、P-gp阻害薬を併用した場合には薬物耐性の減弱が認められた。これらの結果から、治療薬に持続的に曝露されたリンパ腫細胞は、P-gpの発現増加を介して薬物耐性を増強させることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、濾胞性リンパ腫細胞に対して、実際に濾胞性リンパ腫の治療に用いられる抗がん薬であるドキソルビシンとビンクリスチンを持続的に曝露した結果、薬物耐性能が亢進した細胞株を樹立することに成功した。この成功により、既存のリンパ腫の研究とは異なり、臨床で実際に確認されるリンパ腫細胞の薬物耐性およびその誘導メカニズムを解析していくことができるものと期待される。また、そのメカニズムのひとつとして、抗がん薬を細胞外へと掃き出すP-糖タンパク質の発現および機能上昇を見出した。以上の点で、本研究の成果は学術的および社会的意義が大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Follicular lymphoma (FL), a non-Hodgkin's lymphoma, was continuously exposed to the clinically used anticancer drugs. As a result, the drug resistance of the FL cells was markedly enhanced. Moreover, the increase in P-glycoprotein (P-gp) expression and its transport function was observed in the FL cells with enhanced resistance. On the other hand, drug resistance was attenuated when P-gp inhibitors were used concomitantly. Thus, these results suggest that FL cells continuously exposed to therapeutic agents enhance drug resistance via increased P-gp expression.

研究分野：薬物動態学

キーワード：リンパ腫 薬物耐性 排出系トランスポーター P-糖タンパク質 転移

## 1. 研究開始当初の背景

B細胞由来の非ホジキンリンパ腫に分類される濾胞性リンパ腫 (FL)の化学療法として、シクロホスファミド (C)、ドキシソルビシン (H)、ビンクリスチン (O) およびプレドニゾロン (P) が用いられてきた (CHOP 療法)。近年では、リンパ腫が有する cluster of differentiation 20 (CD20) 抗原に対する分子標的薬としてリツキシマブ (R) が登場し、CHOP 療法に追加すること (R-CHOP) で予後が大幅に改善されてきている。しかしながら、これらのリンパ腫は再発率が極めて高く、継続的な抗がん薬治療の過程で、薬物耐性を獲得し抗がん薬が効かなくなる。<sup>1,2)</sup> この耐性機構には、細胞膜上に発現することで様々な抗がん薬を細胞内から細胞外へと掃き出す、P-糖タンパク質 (P-gp) や乳がん耐性タンパク (BCRP) などの機能亢進がある。P-gp は FL において発現が確認されており、CHOP 療法におけるドキシソルビシンやビンクリスチンはいずれも P-gp の基質薬物である。通常は CHOP によって多くのリンパ腫細胞が死に至る。一方、一部が自然耐性あるいは P-gp による抗がん薬の排出によって細胞死を回避し、増殖を繰り返すことでリンパ腫が再発する。再発したがん細胞は高頻度で形質転換を起こし、悪性化 (さらなる多剤耐性および転移能を獲得) する。他の組織由来のがんにおいては、悪性化の誘導因子のひとつとして、ある種の転写因子や microRNA と呼ばれる微小な RNA の存在が確認されている。一方で、リンパ腫においては詳細な報告はなされていない。<sup>3,4)</sup> したがって、リンパ腫における悪性化時の薬物耐性獲得メカニズムを明らかにすることは、既存の医薬品の有用性を高めることにつながるものと考えられる。しかしながら、これまでに数多く報告されているリンパ腫の細胞株を基本培地にて培養する研究手法では、必ずしも臨床における悪性化を反映しておらず、ゆえに薬物による悪性化の誘導機構を同定することは困難である。

## 2. 研究の目的

抗がん薬の持続的な暴露によって、濾胞性リンパ腫の薬物耐性能が亢進するかに加え、亢進した薬物耐性において P-gp の機能上昇が直接的に関係しているかを明らかにする。本研究の遂行により、薬物により誘発される濾胞性リンパ腫の薬物耐性亢進という現象およびそのメカニズムの一端を見出し、治療困難な再発性リンパ腫を完治可能ながんへと転換することを目的とする。申請者は、R-CHOP などのがん化学療法が再発後のリンパ腫に奏功しない原因として、再発したリンパ腫細胞では P-gp の機能が亢進され、抗がん薬の効果が減弱しているからではないかと考えた。しかしながら、リンパ腫の細胞株を通常通り基本培地にて培養している研究手法では必ずしも悪性化時を反映しておらず、臨床で起きている薬物による誘導機構を同定することは困難である。本研究では、抗がん薬を持続曝露することで臨床を反映した悪性リンパ腫の悪性化モデルを構築し、リンパ腫特異的な P-gp 機能亢進とそのメカニズムを同定する。これにより、既存の抗がん薬の有用性と安全性のいずれも高める治療法が提案でき、完治可能な患者を増やすことが可能となると考えた。

《参考論文》1) Myron S. Czuczman, et al., J Clin Oncol. 22, 4711-4716 (2004), 2) Mozesohn L. et al., Leuk Lymphoma. 55, 2502-2507 (2014), 3) Fang S. et al., Oncol Lett. 12, 5007-5014 (2016), 4) Ono M. et al., Sci Signal. 7, ra63 (2014)

## 3. 研究の方法

### 再発リンパ腫 (転移・悪性化) モデルの構築と P-gp の機能評価

#### (1) 細胞培養法

ヒト B細胞由来濾胞性リンパ腫細胞株である Sci-1 細胞の基本培地は、Roswell Park Memorial Institute medium 1640 (RPMI1640) に非働化済みの Fetal Bovine Serum (FBS) を 10% となるように加えたものを用いた。細胞は 37°C、5%CO<sub>2</sub> 条件下にて 3~4 日おきに継代した。

#### (2) 耐性化モデル細胞の作製

P-gp の基質薬物であり CHOP 療法にて使用されるドキシソルビシン (Dox) およびビンクリスチン (Vinc) を、単独または併用して Sci-1 細胞に持続曝露した。曝露濃度は低濃度から開始し、各薬物の添付文書から推測される最高血中濃度を元に、最終的にドキシソルビシンは 50 nmol/L、ビンクリスチンは 1 nmol/L とした。並行して培養した未処置の細胞 (NT) と持続曝露した細胞を用いて、抗がん薬に対する耐性能を cell counting kit-8 (CCK-8) により評価した。

#### (3) 各種遺伝子発現量の評価

P-gp をはじめとした薬物耐性に関わる排出系トランスポーター群の遺伝子発現量は、内在性コントロール遺伝子である glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) に対する発現比として評価した。

#### (4) P-gp の細胞内局在の評価

細胞全体および膜画分を用いて、P-gp の細胞膜上タンパク発現量が増加しているかを Western blotting により確認した。

#### (5) P-gp の輸送機能比較

P-gp の基質薬物の細胞内蓄積量あるいは、一度細胞内に蓄積させてから一定時間後に培地中

に排出される速度を測定することで、薬物持続暴露細胞における P-gp の輸送機能変動を評価した。また同時に P-gp 阻害薬を併用することで、薬物の排出における P-gp による排出の寄与を評価した。さらに、耐性能が亢進した細胞と未処置の細胞における機能を比較することで、再発モデルにおいて P-gp の輸送機能が亢進しているかを確認した。

#### (6) P-gp 基質薬物である抗がん薬に対する薬物耐性能の評価

P-gp 基質薬物である Dox および Vinc に対する、Sci-1 細胞の感受性 (IC50) 変動を明らかにするとともに、P-gp 阻害薬を追加添加した場合の感受性と比較することにより、薬物耐性能亢進における P-gp の関与を評価した。

#### (7) P-gp 基質薬物以外の抗がん薬に対する薬物耐性能の評価

P-gp 基質ではない抗がん薬として 6-メルカプトプリン (6-MP) に対する細胞生存率を評価し、薬物耐性の亢進が P-gp 以外の要因によるものであるのかを評価した。

### 4. 研究成果

#### (1) 抗がん薬持続暴露細胞における排出系トランスポーターの遺伝子発現量およびタンパク発現量の変動

Vinc および Dox+Vinc の曝露下において継代培養し、生存した細胞から RNA を回収した。各種排出系トランスポーターの mRNA 発現量を測定したところ、Vinc および Dox+Vinc 持続暴露細胞のいずれにおいても、未曝露の細胞 (NT) と比較して、特に P-gp の有意な発現増加が確認された (図 1)。また、BCRP も、両細胞に置いて mRNA 発現が増加していたが、P-gp ほど顕著な増加ではなかった。一方で、MRP2 は Dox+Vinc を持続曝露した細胞においては 2 倍程度の発現増加が認められたものの、Vinc 単独持続曝露した細胞においては変化が認められなかった。したがって、いずれの細胞においても P-gp の mRNA 発現量増加が最も顕著であったことから、次にタンパク発現量も変動しているかを確認した。

その結果、Vinc 持続曝露によって P-gp の細胞内総発現量が増加しており、Dox+Vinc においてはさらに大幅な増加が確認された (図 2)。また、細胞膜画分においても同様の増加が確認されたことから、P-gp の mRNA 発現量の増加に基づいた、タンパク発現量の増加が引き起こされ、その結果として細胞膜上のタンパク発現量が増加したものと考えられた。

#### (2) P-gp の輸送機能変動

P-gp の膜上発現量増加に伴って P-gp の輸送機能亢進が認められるか明らかにするため、P-gp 基質薬物 rhodamine123 (Rho123) の排出速度を efflux assay により評価した。未処理の NT と比較して Vinc 持続暴露細胞における Rho123 の排出速度は有意に増加した (図 3)。これに対して P-gp 阻害薬であるベラパミル (Vera) の併用によって、排出速度の増加が有意に抑制された。したがって、本検討で認められた Rho123 の排出速度の増加には、P-gp による排出増加が主要な原因となっていることが示唆された。なお、Dox+Vera についても同様の検討を行っており、Vinc 持続暴露細胞で見られた排出速度以上に有意な P-gp による排出速度の亢進が確認できている。

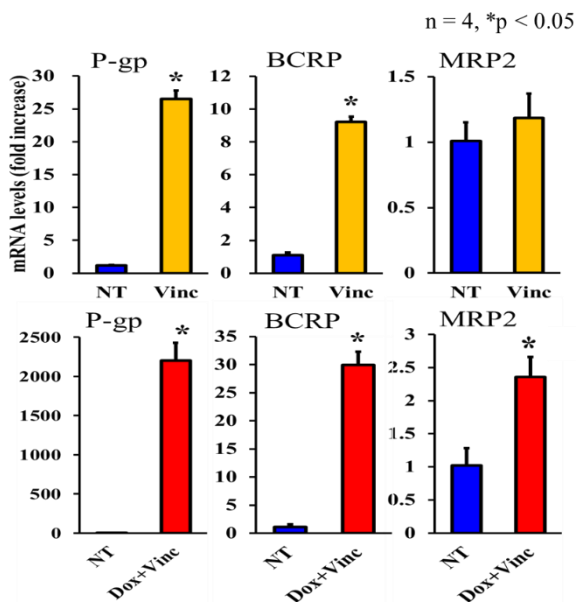


図1. 抗がん薬持続暴露による排出系トランスポーターの mRNA 発現量変動

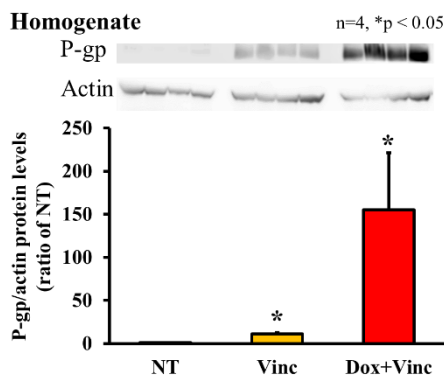


図2. 抗がん薬持続曝露時の細胞全体における P-gp のタンパク発現量変動

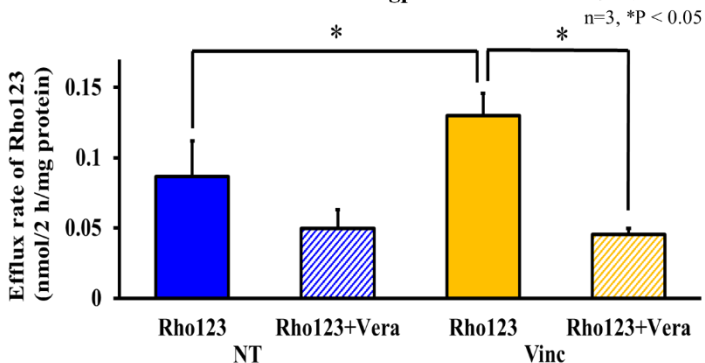


図3. 抗がん薬持続曝露による P-gp の輸送機能変動

### (3) 抗がん薬に対する耐性能亢進における P-gp の関与

P-gp の輸送機能亢進が薬物耐性能の亢進に影響し得るかを確認するため、P-gp 基質となる抗がん薬および非基質である抗がん薬に対する細胞生存率を評価した。P-gp 基質抗がん薬としては Vinc を用いた場合、耐性能はおよそ 2 倍高まっていたが、P-gp 阻害薬であるシクロスポリン (CysA) を加えた場合には耐性能が減弱し、薬物持続曝露細胞 (Vinc) と未処理の細胞 (NT) に対する IC50 は一致した (図 4)。したがって、Vinc 持続曝露細胞における Vinc に対する耐性能の亢進には、P-gp が主要な要因であることが示された。一方で、P-gp の基質とはならない抗がん薬として 6-MP を用いて、同様に薬物耐性能を評価したところ、Vinc 持続曝露および Dox+Vinc 持続曝露細胞いずれにおいても、耐性亢進は認められなかった。すなわち、P-gp 基質薬物を持続曝露した細胞における薬物耐性能の亢進は、主に P-gp の機能上昇に依存したものであり、アポトーシスを誘発するシグナルの減弱などの P-gp 以外の要因は大きな影響を与えていないものと考えられた。

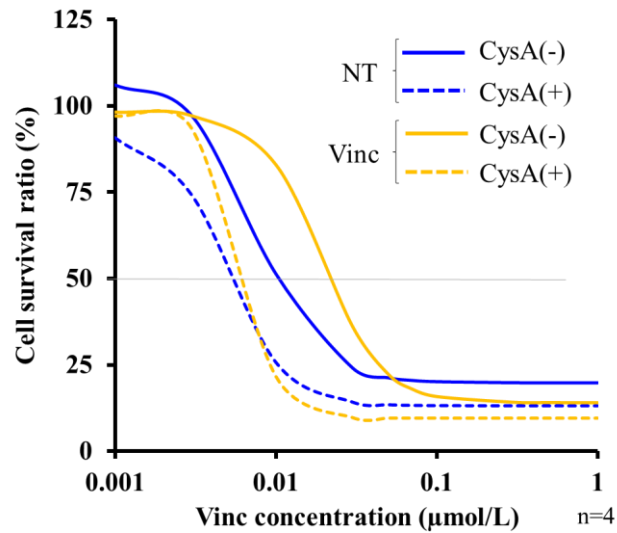


図4. P-gpの基質抗がん薬に対する薬物耐性能とP-gp阻害薬の影響

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7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 Ogihara Takuo, Mizoi Kenta, Kamioka Hiroki, Yano Kentaro	4. 巻 12
2. 論文標題 Physiological Roles of ERM Proteins and Transcriptional Regulators in Supporting Membrane Expression of Efflux Transporters as Factors of Drug Resistance in Cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 3352 ~ 3352
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers12113352	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 -
1. 著者名 Yano Kentaro, Todokoro Itsuki, Kamioka Hiroki, Tomono Takumi, Ogihara Takuo	4. 巻 44
2. 論文標題 Functional Alterations of Multidrug Resistance-Associated Proteins 2 and 5, and Breast Cancer Resistance Protein upon Snail-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition in HCC827 Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 103 ~ 111
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b20-00693	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 Kamioka Hiroki, Tomono Takumi, Fujita Atsushi, Onozato Ryoichi, Iijima Misa, Tsuchida Shigeru, Arai Takahiro, Fujita Yukiyoishi, Zhang Xieyi, Yano Kentaro, Ogihara Takuo	4. 巻 109
2. 論文標題 Moesin-Mediated P-Glycoprotein Activation During Snail-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition in Lung Cancer Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Pharmaceutical Sciences	6. 最初と最後の頁 2302 ~ 2308
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.xphs.2020.03.008	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 Kentaro Yano, Chiaki Okabe, Kenta Fujii, Yuko Kato, Takuo Ogihara	4. 巻 72
2. 論文標題 Regulation of breast cancer resistance protein and P glycoprotein by ezrin, radixin and moesin in lung, intestinal and renal cancer cell lines	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacy and Pharmacology	6. 最初と最後の頁 575-582
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jphp.13225	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 Kentaro Yano, Saeka Seto, Hiroki Kamioka, Kenta Mizoi, Takuo Ogihara	4. 巻 520
2. 論文標題 Testosterone and androstenedione are endogenous substrates of P-glycoprotein.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and biophysical research communications	6. 最初と最後の頁 166-170
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.09.067	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 Yano Kentaro, Kimura Masaki, Watanabe Yayoi, Ogihara Takuo	4. 巻 44
2. 論文標題 Rapid Increase of Gastrointestinal P-Glycoprotein Functional Activity in Response to Etoposide Stimulation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 701 ~ 706
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b21-00007	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 Kamioka Hiroki, Edaki Kazue, Kasahara Haruka, Tomono Takumi, Yano Kentaro, Ogihara Takuo	4. 巻 73
2. 論文標題 Drug resistance via radixin-mediated increase of P-glycoprotein membrane expression during SNAI1-induced epithelial-mesenchymal transition in HepG2 cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacy and Pharmacology	6. 最初と最後の頁 1609 ~ 1616
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jpp/rgab051	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 -

〔学会発表〕 計16件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 上岡宏規, 矢野健太郎, 伴野拓巳, 荻原琢男
2. 発表標題 MECHANISM OF DRUG RESISTANCE THROUGH INCREASED P-GLYCOPROTEIN FUNCTION DUE TO ENHANCED EXPRESSION OF RADIXIN AT EPITHELIALMESENCHYMAL TRANSITION
3. 学会等名 日本薬物動態学会第35回年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 深井悠貴, 溝井健太, 松本映子, 小山智志, 矢野健太郎, 石田誠一, 小島肇, 荻原琢男
2. 発表標題 OECD/TGのcytochrome P450誘導試験におけるmRNA測定の有用性
3. 学会等名 第27回HAB研究機構学術年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高野由博, 加部春香, 溝井健太, 箱田恵子, 矢野健太郎, 荻原琢男
2. 発表標題 簡易懸濁時における ACE 阻害薬の安定性に対する酸化マグネシウムの影響
3. 学会等名 第64回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中村友哉, 高橋紗織, 上野俊也, 溝井健太, 矢野健太郎, 荻原琢男
2. 発表標題 CYP3A4誘導消化管細胞を用いたCYP3A4阻害作用評価系の構築
3. 学会等名 日本薬剤学会第35回年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 矢野健太郎, 岡部千明, 藤井健太, 加藤木綿子, 荻原琢男
2. 発表標題 P-糖タンパク質および乳がん耐性タンパク質の輸送機能におけるERMタンパクの関与とその組織差
3. 学会等名 日本薬剤学会第34年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上岡宏規, 伴野拓巳, 矢野健太郎, 藤田行代志, 藤田敦, 小野里良一, 飯島美砂, 土田秀, 新井隆広, 荻原琢男
2. 発表標題 肺がん細胞のSnail誘発性上皮間葉転換時におけるP-糖タンパク質活性化機構の解明
3. 学会等名 日本薬剤学会第34年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 K. Yano, M. Kimura, T. Ogihara
2. 発表標題 Bitter substance increases P-glycoprotein membrane localization and transport activity via CCK secretion in Caco-2 Cells
3. 学会等名 日本薬物動態学会第34回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 瀬戸彩瑛香, 溝井健太, 高橋紗織, 矢野健太郎, 荻原琢男
2. 発表標題 男性ホルモン輸送におけるP-糖タンパク質の関与
3. 学会等名 第14回トランスポーター研究会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 笠原悠, 上岡宏規, 矢野健太郎, 荻原琢男
2. 発表標題 肝臓がんのSnail誘発性上皮間葉転換におけるP-糖タンパク質の機能変化
3. 学会等名 第14回トランスポーター研究会年会
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 H. Kamioka, T. Tomono, K. Yano, Y. Fujita, A. Fujita, R. Onozato, M. Iijima, S. Tsuchida, T. Arai, T. Ogihara
2. 発表標題 P-glycoprotein activation mechanism by Snail-induced epithelial-to-mesenchymal transition in lung cancer cells
3. 学会等名 ISSX2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上岡宏規, 伴野拓巳, 藤田行代志, 藤田敦, 小野里良一, 飯島美砂, 土田秀, 新井隆広, 矢野健太郎, 荻原琢男
2. 発表標題 肺がん細胞の上皮間葉転換による膜発現調節因子を介したP-糖タンパク質の機能亢進
3. 学会等名 第41回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 H. Kamioka, H. Kasahara, K. Yano, T. Ogihara
2. 発表標題 P-glycoprotein activation at epithelial to mesenchymal transition in HepG2 cells
3. 学会等名 日本薬物動態学会第34回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 矢野健太郎, 木下カンナ, 岩瀬由未子, 荻原琢男, 柴原隆
2. 発表標題 濾胞性リンパ腫の薬物耐性およびP-糖タンパク質の機能に対する抗がん薬持続曝露の影響
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木下カンナ、矢野健太郎、荻原琢男、柴原隆
2. 発表標題 濾胞性リンパ腫の薬物耐性におけるP-糖タンパク質の関与
3. 学会等名 日本薬物動態学会 第36回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森下宙輝、高橋佳佑、石井美咲、伊藤政明、張協義、溝井健太、矢野健太郎、荻原琢男
2. 発表標題 P-gpを介した薬物動態学的相互作用がピモジドの hERGチャネル阻害におよぼす影響
3. 学会等名 日本薬物動態学会 第36回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋佳佑、石井美咲、森下宙輝、伊藤政明、張協義、上岡宏規、溝井健太、矢野健太郎、荻原琢男
2. 発表標題 P-糖タンパク質 (P-gp) の阻害によるピモジドのヒト心筋細胞内への蓄積とhERGチャネルへの影響
3. 学会等名 日本薬剤学会 第36年会
4. 発表年 2021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
---------	---------