

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590179

研究課題名(和文)がん個別化治療確立を目指した新規がん特異的トランスポーターの橋渡し研究

研究課題名(英文) Expression and functional characterization of cancer-type organic anion transporting polypeptide 1B3 in human lung and colon cancer

研究代表者

降幡 知巳(Furihata, Tomomi)

千葉大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：80401008

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)：本研究では、がん型organic anion transporting polypeptide 1B3(がん型OATP1B3)のがん治療・臨床への応用を目指した基礎研究をおこなった。その結果、がん型OATP1B3はヒト肺がんにおいてがん組織特異的に発現することが明らかとなり、ヒト大腸がんでは、さらに頻度・発現量ともに高く発現することが明らかとなった。また、ヒト大腸がん試料を用いた解析から、本遺伝子は高いがん診断力および早期がん検出能を有するバイオマーカーとなる可能性が見出された。

研究成果の概要(英文)：We recently identified cancer-type organic anion transporting polypeptide 1B3 (Ct-OATP1B3) mRNA in human several cancer tissues. Since Ct-OATP1B3 mRNA expression characteristics in colon and lung cancer and its clinical significance have yet to be identified, in this study, we sought to identify clinical significance of Ct-OATP1B3 mRNA expression in lung and colon cancer by characterizing its expression profile in two groups of matched-colon tissue pairs (cancer/normal). Our results showed that Ct-OATP1B3 mRNA expression levels was significantly higher in cancer tissues than in normal tissues in colon cancer. Similar results were also obtained from lung cancer tissues. Therefore, we concluded that Ct-OATP1B3 mRNA expression is primarily associated with cancer tissues in colon and lung cancer, and that Ct-OATP1B3 mRNA may become a promising biomarker for colon cancer detection.

研究分野：薬物動態

キーワード：がん分子標的 がんバイオマーカー トランスポーター

1. 研究開始当初の背景

がん生物学と創薬技術の進展により、がん治療は現在大きな変革期にある。従来の低分子抗がん剤は広く正常細胞にも作用するのに対し、近年はがん特異的に発現・機能する標的分子を同定し、その発現陽性患者に対して標的・特異的に作用する化合物/抗体を用いることにより効果的にがんを狙い撃つがん個別化治療が主流となってきている。例えば EML4-ALK 融合遺伝子を標的とした肺がんのクリゾチニブ療法では、同遺伝子発現陽性患者 82 例において完全・部分寛解 47 例、不変 27 例であり、さらに有害作用はグレード 2 以下と、有効性・安全性の高い治療結果が報告されている。このようにより効果的で有害作用の少ないがん分子標的個別化治療を確立するためには、個々のがん種において最適な標的分子を同定することが必須である。

このようながん分子標的候補の一つに organic anion transporting polypeptide 1B3 (OATP1B3) がある。OATP1B3 は通常、肝細胞膜基底側にのみ特異的に発現し、様々な薬剤・内因性化合物を細胞内に取り込むトランスポーターである。しかし、近年 OATP1B3 が様々ながん組織において発現することが明らかとなってきている。これまでに乳がんが発現する OATP1B3 は良好な予後と関連が認められること、前立腺がんにおいては OATP1B3 遺伝子に存在する遺伝子多型ががん進行度と関連すること、また大腸がん細胞では OATP1B3 がアポトーシスを抑制することが報告されている。したがって、その機能には不明な点が多いが、OATP1B3 はがん細胞に発現し何らかの役割を担っていると考えられている。

上述のような従来のがん OATP1B3 研究は全て「がん細胞と肝細胞に発現する OATP1B3 は同一である」という前提のもとに解析されてきた。しかし、その実験的証明はこれまでになされていない。そこで代表者はこの点に着目し、がん細胞に発現する OATP1B3 遺伝子について詳細な解析をおこなったところ、がん細胞では肝細胞に発現する OATP1B3 mRNA (肝型 OATP1B3) とは異なる配列を持つ、新規の OATP1B3 mRNA 分子種 (がん型 OATP1B3) が発現することを見出した。さらに、数検体の大腸がん組織および肺がん組織を用いた解析により、発現が認められたいずれのがん組織でもがん型 OATP1B3 mRNA は肝型 mRNA よりも優位に発現することを明らかにした。また、がん型 OATP1B3 mRNA の肝細胞における発現は非常に低く、がん隣接正常組織においても発現が非常に低いか、または認められなかった。これらのことからがん細胞に発現する OATP1B3 の実体は「肝型」ではなく新規に同定した「がん型」である可能性が高く、したがってがん型 OATP1B3 はがん細胞特異的に発現する分子標的候補として極めて有望であると考えられる。

2. 研究の目的

がん型 OATP1B3 をがん個別化治療の分子標的として確立するためには、がん組織におけるその発現頻度・レベルを明らかにすること、がん型 OATP1B3 発現における臨床的意義、さらにそれを裏付ける機能の実験的証拠を確立することが必要である。

そこで本研究では医学研究者と連携し、肺がんおよび大腸がんを対象としてがん型 OATP1B3 の発現頻度・レベルを明らかにすること、これらががん型 OATP1B3 発現の臨床的意義を明らかにすること (予後や進行度との関連等)、さらにはがん細胞におけるがん型 OATP1B3 の機能を明らかにすること (輸送機能や増殖への影響等) を目的とする。

3. 研究の方法

ヒト試料および細胞

ヒト肺がん組織および隣接正常組織 28 検体は千葉大学大学院医学研究院 呼吸器病態外科学研究室より入手した。ヒト肺検体は上記施設において肺がんの切除手術を受けた患者の肺切片である。また、ヒト大腸がん組織および隣接正常組織 39 検体は、千葉県がんセンターより入手した。これら検体は、事前にインフォームドコンセントを得た患者から採取し、本研究におけるこれら検体の研究利用は、千葉大学大学院薬学研究院・千葉大学大学院医学研究院・千葉県がんセンターの倫理委員会の事前承認を得た。

ヒト混合肝細胞 (50 donor pooled) は Celsis IVT (Baltimore, MD, USA) より購入した。ヒト結腸がん由来 LS180 細胞は DS ファーマバイオメディカル (大阪) より入手した。ヒト大腸がん由来 HCT116 細胞は Dr. Vogelstein (Johns Hopkins University, Baltimore, MD, USA) より御恵与賜った。

がん型 OATP1B3 発現ベクターの作製

がん型 OATP1B3 mRNA の推定翻訳領域をヒト大腸がん組織 cDNA よりクローニングし、pBApo-CMV Pur DNA (タカラバイオ、滋賀) に挿入することにより、がん型 OATP1B3/pBApo を作製した。

細胞培養法

HCT116 細胞培養には Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, 和光、大阪) を、LS180 細胞培養には Eagle's minimal essential medium (和光) を用いた。これらの培地には 10% (v/v) 非働化ウシ胎仔血清 (fetal bovine serum, FBS) および抗生物質を加えた。各 OATP1B3 安定発現 human embryonic kidney 293 (HEK293) 細胞 (後述) の培養には、DMEM

に 10% FBS および 抗生物質 を加え、そこ
に G418 (Sigma, St. Louis, MO, USA) または
ピューロマイシン (和光) を最終濃度 400
μg/mL または 0.6 μg/mL で添加した培地を用
いた。上記細胞は全て、5% CO₂ / 95% air を
気相とした 37 インキュベーター内で培養
した。

OATP1B3 安定発現細胞の構築

肝型 OATP1B3 安定発現 HEK293 細胞 (肝型
OATP1B3/HEK293) およびコントロール細胞
(mock/HEK293) は以前に本研究室で樹立し
たものを用いた。

がん型 OATP1B3 安定発現 HEK293 細胞 (がん
型 OATP1B3/HEK293) は、HEK293 細胞にがん型
OATP1B3/pBApo をトランスフェクションし、
ピューロマイシンで選択した後、最もがん型
OATP1B3 の発現が高い細胞クローンを単離す
ることにより樹立した。

Total RNA 抽出および cDNA の作製

がん組織および隣接正常組織からの total
RNA は ISOGEN (ニッポンジーン, 東京) を
用いてプロトコールに従い抽出した。各種細
胞からの total RNA は NucleoSpin RNA (タ
カラバイオ) を用いてプロトコールに従い
抽出した。

cDNA は、total RNA 1 μg または使用でき
る最大量をテンプレートとし、High Capacity
cDNA Reverse Transcription kit with random
primers (Applied Biosystems, Foster City,
CA, USA) を用いてプロトコールに従い合成し
た。

定量的 real-time PCR

ヒトがん組織、隣接正常組織、ヒトがん細
胞、ヒト混合肝細胞、および各安定発現
HEK293 細胞の cDNA をテンプレートとして定
量的 real-time PCR をおこなった。PCR およ
び DNA 増幅の検出には Eco Real-Time PCR
System (Illumina, San Diego, CA, USA) を
用いた。がん型 OATP1B3 mRNA または肝型
OATP1B3 mRNA 発現量の算出には、検量線法に
よる絶対定量、または glyceraldehyde
3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA の
発現量を用いて補正する相対定量法 (Ct
法) を用いた。

Transport assay

[³H]Cholecystinin-octapeptide sulfate
(CCK-8) (PerkinElmer, Boston, MA, USA) お
よび非標識 CCK-8 (PEPTIDE INSTITUTE, INC,
大阪) は Na⁺-plus Krebs-Henseleit buffer
(KHB) に溶解し、最終濃度 1 μM、最終放射線
濃度 0.1 μCi/mL とした。 [³H]Estradiol-17
-glucuronide (E₂G) (Moravek Biochemicals,

Brea, CA, USA) および非標識 E₂G (SIGMA) は
Na⁺-plus KHB に溶解し、最終基質濃度 500 nM、
最終放射線濃度 0.5 μCi/mL とした。阻害実
験では基質溶液に bromosulfophthalein
(BSP, Sigma) を添加し、最終濃度 100 μM
となるように調製した。

Mock/HEK293、がん型 OATP1B3/HEK293、お
よび肝型 OATP1B3/HEK293 を collagen type-I
でコートした 24-well プレートに 4.0 × 10⁵
cells/mL で播種した。播種から 48 時間後に
transport assay をおこなった。細胞を 37
の Na⁺-plus KHB で 1 回リンスした後、基質
溶液 (阻害剤含有または非含有) 200 μL を加
えて、37 で取り込み反応を開始した。取り
込み時間は、CCK-8 は 3 分間、E₂G は 5 分間と
した。インキュベーション後、氷冷した Na⁺
-plus KHB で速やかに 3 回リンスし、250 μL
の 0.2% SDS を加え、室温で 5 時間振盪し、
細胞溶解液とした。細胞溶解液の放射活性は、
液体シンチレーションカウンター
(LSC-6100, Aloka, 東京) にて測定した。細
胞溶解液のうち 25 μL は、タンパク質濃度
測定に使用した。

Receiver operating characteristic curve (ROC) 解析

ROC 解析は、定量的 real-time PCR の値を
用い、Prism6 (GraphPad Software, La Jolla,
CA, USA) によりおこなった。

統計解析

正常組織とがん組織におけるがん型
OATP1B3 mRNA 発現量の比較、ヒトがん組織に
おけるがん型 OATP1B3 mRNA 発現量と肝型
OATP1B3 mRNA 発現量の比較、およびがん型
OATP1B3 mRNA 発現量とがんのステージとの関
連は、Mann-Whitney U test により解析した。
細胞における mRNA 発現量の平均値の差の検
定は Student's t-test によりおこなった。
いずれの解析においても P 値が 0.05 以下の
場合において有意差ありとした。統計計算は
Excel 統計ソフト Statcel 第 3 版 (OMS 出
版, 埼玉) を使用した。

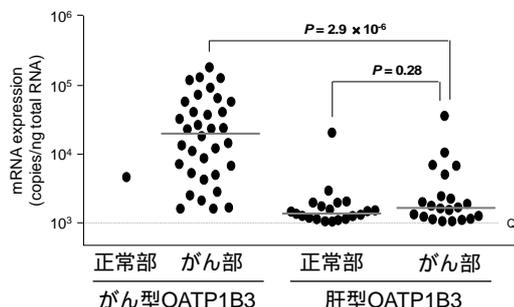


図1. ヒト大腸がんにおけるがん型および肝型OATP1B3 mRNA の発現解析 各OATP1B3 mRNA分子種の発現量は、それぞれに特異的なプライマーを用いた定量的リアルタイムPCRにより定量した。図中、各 は、各患者組織におけるがん型または肝型OATP1B3 mRNA発現量の平均値を示す。QLは定量限界を示し、各群の横線は中央値を示す。

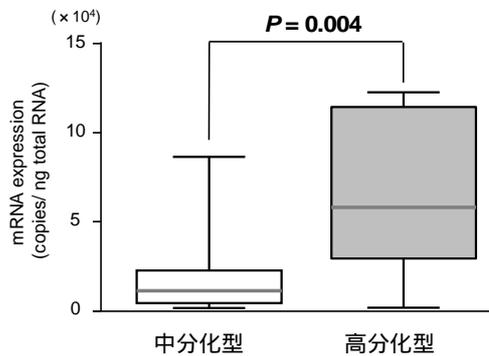


図2. がん型OATP1B3 mRNA発現とがん分化度との関連解析
大腸がん組織試料を高分化型(10検体)と中分化型(18検体)にわけ、両群のがん型OATP1B3 mRNA発現量の比較解析をおこなった。各群のデータはボックス&ウィスカ・プロットにより示した。ボックス内の横線は中央値を示す。

4. 研究成果

大腸がん組織・隣接正常組織 39 検体におけるがん型 OATP1B3 mRNA 発現の解析をおこなったところ、がん型 OATP1B3 mRNA の発現頻度は、それぞれ 87.2%(34/39)および 2.6%(1/39)であり、がん組織において有意に高かった ($P=1.24 \times 10^{-15}$) (図 1)。さらに、非がん部と比較し、がん組織におけるがん型 OATP1B3 mRNA の発現量は著しく高かった。

一方、同様に大腸がん組織・隣接非がん組織における肝型 OATP1B3 mRNA 発現の解析をおこなったところ、その発現頻度はそれぞれ 53.8%(21/39)および 51.3%(20/39)であり、両者に有意な差は認められなかった (図 1)。また、両組織の発現量の中央値にも差は認められなかった。

次に、がん組織におけるがん型 OATP1B3 mRNA と肝型 OATP1B3 mRNA の発現量を比較したところ、がん型 OATP1B3 mRNA の中央値は肝型よりも 12.2 倍高かった ($P=2.9 \times 10^{-6}$)。

したがって、がん型 OATP1B3 mRNA は極めてがん特異的に発現すること、さらにその発現量は肝型 OATP1B3 mRNA よりも優位に高いことが明らかとなった。

がん型 OATP1B3 mRNA がヒト大腸がんにおける主な OATP1B3 分子種であることが明らかとなったことから、次にごん型 OATP1B3 mRNA 発現と患者背景・臨床所見との関連解析をおこなった。まず、がんステージとの関連を解析したところ、がん型 OATP1B3 mRNA の早期ステージ (0~2) における発現陽性率は 88.9%(16/18)であり、進行ステージ (3, 4) における発現陽性率 (93.8%、15/16) と同等であった。また、がん型 OATP1B3 mRNA 発現量は早期ステージ群において、進行ステージ群よりも高い傾向にあった。

つづいて、がん分化度とがん型 OATP1B3 mRNA 発現量との関連を解析した。その結果、高分化型大腸がん (10 検体) におけるがん型 OATP1B3 mRNA 発現中央値は、中分化型・低分

化型大腸がん (18 検体) の値と比べ、5.2 倍高かった ($P<0.004$) (図 2)。

したがって、がん型 OATP1B3 mRNA は早期ステージにおいても高い頻度で発現することが明らかとなり、また、その発現量はがん分化度と関連すると考えられた。

次に大腸がんと同様の方法で、ヒト肺がん試料を用いた解析をおこなった。その結果、ヒト肺がん組織におけるがん型 OATP1B3 mRNA 発現頻度は、28.6%(8/26)と、隣接正常組織の頻度 (7.1%、2/28) よりも高かった。しかしながら、その値は大腸がん組織より得られた頻度よりも低く、その発現量も大腸がん組織と比べ低かった。また、ヒト肺がん組織において肝型 OATP1B3 mRNA の発現解析をおこなった結果、大腸がん組織と同様、発現頻度、発現量ともにごん型 OATP1B3 mRNA よりも低かった。

したがって、ヒト肺がんにおいてもがん型 OATP1B3 mRNA はがん組織に特異的に、かつ肝型 OATP1B3 mRNA よりも有意に発現することが明らかとなった。また、ヒト大腸がん組織より得られた結果との差異から、がん型 OATP1B3 mRNA の発現頻度・発現量には組織差が存在することも明らかとなった。

がん型 OATP1B3 は大腸がんにおいて高頻度かつがん組織特異的に発現することが明らかとなったことから、がん型 OATP1B3 mRNA は大腸がん診断のための新たなバイオマーカーとなる可能性が考えられる。そこで、ROC 解析により、がん型 OATP1B3 mRNA のがん診断力を解析した。その結果、ROC の area under the curve 値は 0.93 (95%CI= 0.865-0.994; $P < 0.0001$) であり、がん型 OATP1B3 mRNA は極めて高いがん診断力を有することが明らかとなった (図 3)。

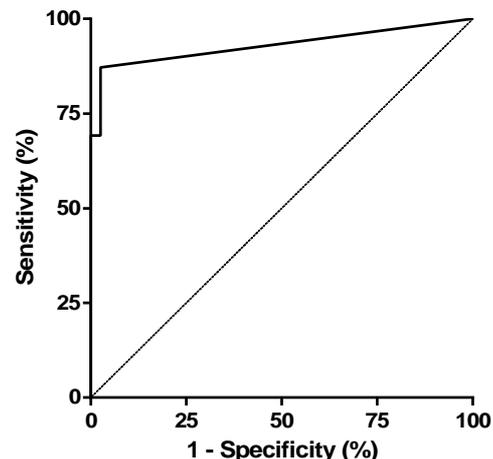


図3. がん型OATP1B3 mRNAの大腸がん検出に対するROC解析 がん型OATP1B3 mRNAの大腸がん検出力をROC解析により評価した。Sensitivityは感度を、1-Specificityは特異度を示す。実線はがん型OATP1B3 mRNAの評価結果を示す。

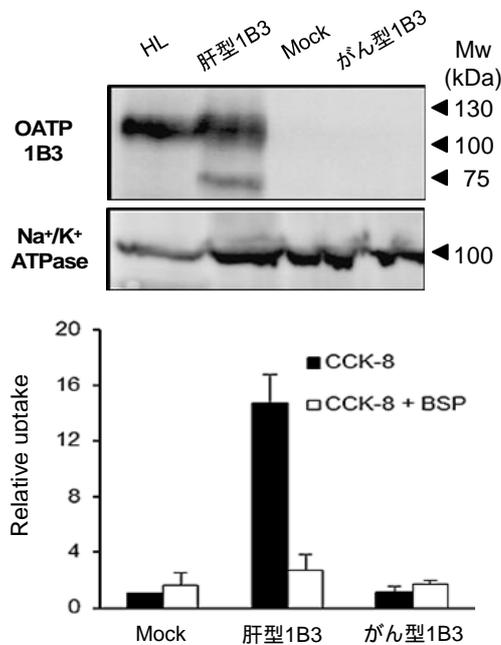


図4. がん型OATP1B3 安定発現細胞の構築とその機能解析
 上、がん型OATP1B3安定発現細胞(がん型1B3)、肝型OATP1B3安定発現細胞(肝型1B3)、空ベクター導入細胞(Mock)から膜画分を調製し、各OATP1B3タンパク質の発現をウエスタンブロットにより解析した。コントロールとしてヒト肝臓試料(HL)を用いた。内部標準としてNa⁺/K⁺ ATPaseを用いた。下、各細胞におけるCCK-8(OATP1B3の基質)の取り込み活性をトランスポートアッセイにより解析した。BSPはOATP1B3の機能阻害剤として用いた。

一方、がん型 OATP1B3 mRNA はがん細胞において何らかの役割を担っていることが考えられる。そこでまず、がん型 OATP1B3 の推定翻訳領域のクローニングをおこない、HEK293細胞に導入してがん型OATP1B3のトランスporter機能を解析した。比較として、肝型 OATP1B3 安定発現細胞も構築し、これらのコントロールとして空ベクター導入細胞を作製した。これら細胞における OATP1B3 の発現を解析したところ、ヒト肝臓試料および肝型 OATP1B3 発現細胞においては、肝型 OATP1B3 タンパク質の発現が認められたものの、がん型 OATP1B3 発現細胞においてはその発現は認められなかった。また、OATP1B3 典型的基質である CCK-8 を用いて各細胞におけるその取り込み活性を解析したところ、肝型 OATP1B3 細胞においてはその発現に依存した高い CCK-8 取り込み活性が認められたものの、がん型 OATP1B3 発現細胞においては、コントロールよりも高い CCK-8 取り込み活性は認められなかった。

したがって、がん型 OATP1B3 タンパク質は既知の OATP1B3 とは異なる構造を有する可能性、またはがん型 OATP1B3 はタンパク質として翻訳されない non-coding RNA である可能性が考えられた。

以上、本研究の結果、当初の予測通り、がん型 OATP1B3 はヒト肺がんにおいてがん組織特異的に発現することが明らかとなったが、ヒト大腸がんでは、さらに頻度・発現量ともに高く発現することが明らかとなった。した

がって、がん型 OATP1B3 の発現プロファイルはがん毎に異なっている可能性があり、他のがんを対象とした検討を進める必要がある。

また、ヒト大腸がん試料を用いた解析からは、がん型 OATP1B3 mRNA が高いがん診断力および早期がん検出能を有するバイオマーカーとなる可能性が見出された。これまでに大腸がんにおいて早期ステージの検出に有効なバイオマーカーは確立していないことから、がん型 OATP1B3 mRNA は新たな特徴を有する優れた大腸がん診断バイオマーカーとなる可能性があり、今後研究を進めて行く必要があると考えられる。

一方、本研究結果からは、がん型 OATP1B3 のタンパク質およびその活性は認められなかった。これら結果は、必ずしもがん型 OATP1B3 のトランスporterとしての機能を全て否定するわけではないが、今後の検討においてはがん型 OATP1B3 mRNA の non-coding RNA としての機能も視野に入れた検討が必要であると考えられる。また、今回着目した翻訳領域のほか、がん型 OATP1B3 mRNA にはペプチドをコードするフレームも存在することから、がん型 OATP1B3 ペプチドに着目した検討を進める必要もあると考えられる。これらの検討から、がん型 OATP1B3 の機能実体が明らかとなれば、それを標的としたがん治療法の開発につながる事が期待される。

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 1件)

1. Sun Y, Furihata T (corresponding author), Ishii S, Nagai M, Harada M, Shimozato O, Kamiyo T, Motohashi S, Yoshino I, Kamiichi A, Kobayashi K, Chiba K. Unique expression features of cancer-type organic anion transporting polypeptide 1B3 mRNA expression in human colon and lung cancers. Clin Transl Med. 2014;3:37. 査読有

[学会発表](計 8件)

1. 孫雨晨、降幡知巳、石井聖弥、長井美樹、原田まなみ、下里修、上條岳彦、千葉 寛. Exploration of clinicopathological features of Ct-OATP1B3 mRNA expression in human colon cancer. 19th North American regional ISSX meeting/29th JSSX annual meeting (San Francisco, USA) Oct. 22, 2014
2. 孫雨晨、降幡知巳、石井聖弥、長井美樹、原田まなみ、下里修、上條岳彦、本橋新一郎、吉野一郎、千葉寛. ヒト肺がん・

ヒト大腸がんにおける Cancer-type OATP1B3 mRNA 発現プロファイル第9回トランスポーター研究会（名古屋）2014年6月14日

3. 孫雨晨、降幡知巳、鈴木雄基、石井聖弥、長井美樹、下里修、上條岳彦、本橋新一郎、吉野一郎、千葉寛. ヒト肺がんおよび大腸がんにおける新規がん特異的遺伝子 Cancer-type OATP1B3 の発現解析 第36回日本分子生物学会年会（神戸）2013年12月4日
4. 孫雨晨、降幡知巳、石井聖弥、本橋新一郎、吉野一郎、下里修、上條岳彦、長井美樹、上市敦子、千葉寛. 肺がんおよび大腸がんにおける Cancer-type OATP1B3 の存在に対するさらなる知見およびその発現プロファイルの解析 第28回日本薬物動態学会年会（東京）2013年10月9日
5. 孫雨晨、降幡知巳、石井聖弥、本橋新一郎、吉野一郎、下里修、上條岳彦、長井美樹、上市敦子、千葉寛. Cancer-type OATP1B3: further evidence on its existence and expression profiles in human lung and colon cancer tissues 10th International ISSX Meeting (Toronto, Canada) Oct. 2, 2013
6. 孫雨晨、降幡知巳、石井聖弥、長井美樹、上市敦子、本橋新一郎、吉野一郎、千葉寛. 新規がん特異的分子種 cancer-type OATP1B3 のヒト肺がん組織における発現プロファイルの解析 第133回日本薬学会（横浜）2013年3月30日
7. 孫雨晨、降幡知巳、石井聖弥、長井美樹、上市敦子、本橋新一郎、吉野一郎、千葉寛. 新規がん特異的分子種 cancer-type OATP1B3 のヒト肺がん組織における発現プロファイルおよび生化学的特徴の解析 第35回日本分子生物学会（福岡）2012年11月14日
8. 石井聖弥、降幡知巳、長井美樹、上市敦子、孫雨晨、本橋新一郎、吉野一郎、千葉寛. cancer-type OATP1B3 のヒト肺がんにおける発現プロファイルと生化学的機能の解析. 日本薬物動態学会第27回年会（東京）2012年11月21日

〔図書〕（計 0件）

〔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

<http://www.p.chiba-u.jp/lab/yakubutu/franepage4.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

降幡 知巳 (FURIHATA, Tomomi)
千葉大学・大学院薬学研究院・助教
研究者番号：80401008

(2) 研究分担者

本橋 新一郎 (MOTOHASHI, shinichiro)
千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号：60345022

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：