

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24701023

研究課題名(和文) 上皮間葉転換に伴うアポトーシス制御と抗癌剤耐性機構の解析

研究課題名(英文) Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Acquisition of Chemoresistance

研究代表者

峠 正義 (Toge, Masayoshi)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・助教

研究者番号：90456385

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：肺癌は早期であってもしばしば転移・再発をきたす。術後再発予防策の進歩が望まれるが、シスプラチンを用いた術後補助化学療法は早期(Ⅰ期)肺癌に対して有効性が示されておらず、その理由は解明されていない。一般に癌細胞は転移・伸展していく過程で、その性状を変化させ微小環境を整えていくことが知られている。そこで、転移初期に起こる上皮間葉転換という現象に着目し、その状態にある肺癌細胞がMcl1という蛋白質を増やすことで抗癌剤耐性を増強させることを解明した。今後、術後再発予防のためのターゲットとして期待されると考える。

研究成果の概要(英文)：Non-small-cell Lung cancer (NSCLC) is a common cause of deaths in industrialized countries. Surgery is the most effective therapy for the patients with NSCLC. Recently, cisplatin therapy after surgery is most popular, but it is still controversial that an adjuvant-chemotherapy could give a significant survival advantage in the stage I patients compared with surgery alone. We focused on TGF- $\beta$  induced epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) because it is involved in both metastasis and chemo-resistance and the mechanism of its EMT-related chemo-resistance has not been known. In this study, we identified MCL1 as a critical molecule for TGF- $\beta$  induced chemo-resistance in NSCLC cells, A549. Moreover, targeting MCL1 using siRNA or pan-BCL2 inhibitor, obatoclax mesylate, could overcome the TGF- $\beta$  induced chemoresistance. Collectively, TGF- $\beta$  induced chemo-resistance and MCL-1 itself could provide a new therapeutic opportunity in NSCLC patients even in post-operative chemotherapies.

研究分野：lung cancer

キーワード：上皮間葉転換 抗癌剤耐性

1. 研究開始当初の背景

肺癌は本邦で増加傾向を示しており、癌死亡原因の第一位となっている。しかし、未だ全肺癌症例の5年生存率は15-20%と低く、その治療効果は満足し得るものではない。肺癌の最も効果的な治療法は外科的切除であるが、完全切除が行われた早期肺癌であってもしばしば術後の再発・転移が起こる。そのため、近年は、生存率の改善を期待してシスプラチンベースの術後補助化学療法が行われている。ところが、最も治療効果が期待される早期肺癌については、術後補助化学療法の効果が示されておらず、その理由は解明されていない。一方、基礎医学の分野では、転移の初期段階で上皮間葉転換という現象が重要な役割を果たしていることが分かってきた。

2. 研究の目的

(1) 上皮間葉転換に伴い癌細胞のアポトーシス制御に変化が生じ、抗癌剤耐性が高まる可能性について検証・立証する。

(2) その機序を調べ、術後補助化学療法の成績を改善するための新たな治療ターゲットを探る。

3. 研究の方法

(1) 肺腺癌細胞 A549 に TGF- $\beta$  で上皮間葉転換を誘導し、各種抗癌剤を作用させて、抗癌剤耐性獲得の有無を調べる。

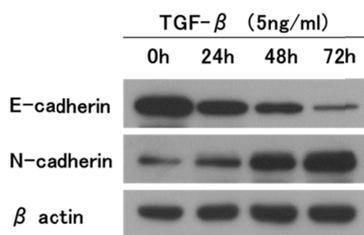
(2) 上皮間葉転換に伴って発現量が変化する Bcl-2 family について調べる。

(3) Bcl-2 阻害剤を用いて、その効果を検証する。

4. 研究成果

(1) TGF- $\beta$  を加えた培地で A549 細胞を培養し、上皮間葉転換が誘導されることを確認した (Fig.1)。

Fig.1



(2) 上皮間葉転換を誘導した A549 細胞に各種抗癌剤を作用させ、WST-1 assay を用いて評価したところ、耐性獲得が確認された (Table.1)。

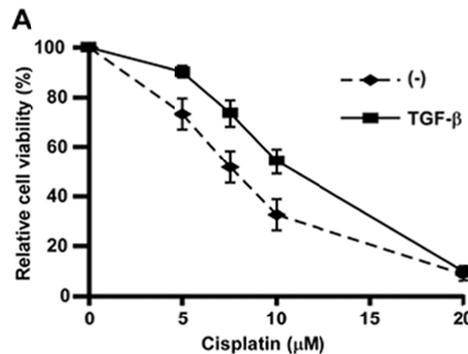
Table.1

	IC <sub>50</sub> <sup>a</sup> (mean $\pm$ SD)	
	A549	A549/TGF- $\beta$
Cisplatin ( $\mu$ M)	7.6 $\pm$ 0.8	10.6 $\pm$ 0.8*
Paclitaxel (nM)	11.1 $\pm$ 1.1	22.4 $\pm$ 7.4*
Gemcitabine ( $\mu$ M)	0.75 $\pm$ 0.2	> 40*
Vinorelbine (nM)	15.8 $\pm$ 3.0	29.1 $\pm$ 6.9*

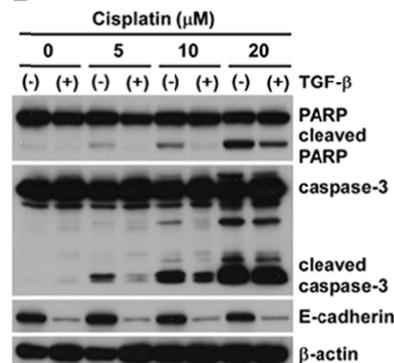
<sup>a</sup> Inhibitory concentration at 50 % (IC<sub>50</sub>) was determined by WST-1 assay at 48 h. The values were calculated with data from at least three independent experiments.  
\* P<0.05 compared with A549 cells

(3) 上皮間葉転換を誘導した A549 細胞にシスプラチンを作用させ、WST-1 assay と western blotting でアポトーシス抵抗性の獲得を確認した (Fig.2)。

Fig.2

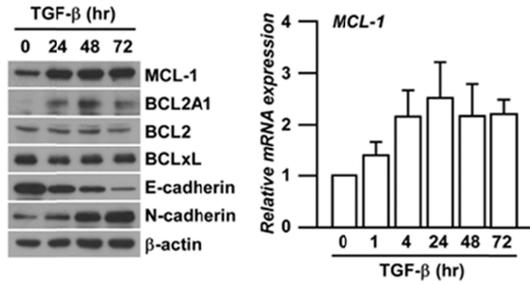


B



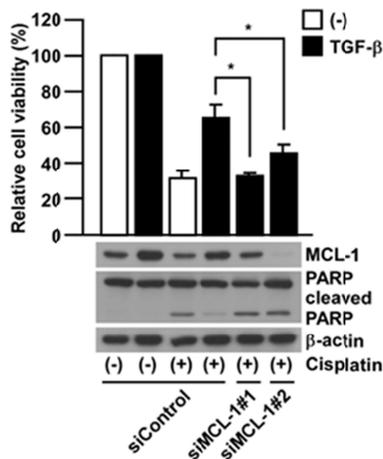
(4) A549 細胞に TGF- $\beta$  で上皮間葉転換を誘導し、抗アポトーシス作用を有する Bcl-2 family の発現量について調べたところ、蛋白質レベルおよび mRNA レベルで Mcl-1 が増加していた。Mcl-1 の発現量は TGF- $\beta$  添加後 24 時間でピークに達し、72 時間後も維持されていた (Fig.3)。

Fig.3



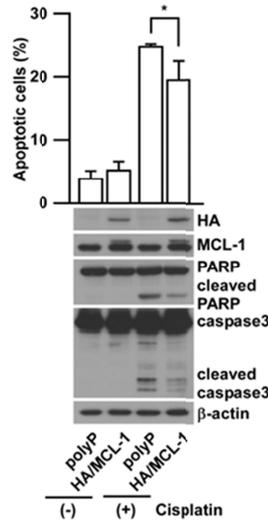
(5) A549 細胞に siMCL-1 を導入後、上皮間葉転換を誘導し、cisplatin を添加して WST-1 assay と western blotting で評価を行った。その結果、Mcl-1 を抑制すると cisplatin に対する耐性が解除されることが判明した (Fig.4)。

Fig.4



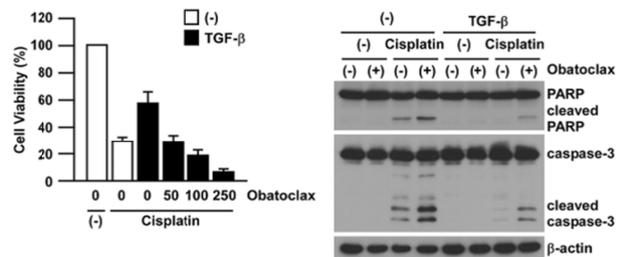
(6) pcDNA3.1 に HA/MCL-1 を組み込み、A549 細胞に導入して安定発現株を樹立した。これにシスプラチンを作用させたところ、western blotting と apoptosis assay でアポトーシス抵抗性の増強が確認された。以上より、本実験系では Mcl-1 の増加が上皮間葉転換に伴う抗癌剤耐性獲得に重要な役割を担っていることが判明した (Fig.5)。

Fig.5



(7) 各種 Bcl2 阻害薬を用いて耐性獲得の有無を比較したところ、上皮間葉転換を誘導した A549 細胞は ABT737 や ABT263 に対して耐性を示したが、obatoclox に対する耐性は認められなかった。これは ABT737 や ABT263 が Mcl-1 をターゲットとしていないのに対し、obatoclox のターゲットに Mcl-1 が含まれることに起因すると考えられた。さらに、cisplatin に少量の obatoclox を併用すると、上皮間葉転換を起こした A549 細胞に対しても相乗的に作用し、シスプラチンへの抵抗性が解除されることが判明した (Fig.6)。

Fig.6



これらの結果から、ある種の癌細胞において、Mcl-1 は転移初期段階の生存と抗癌剤耐性に重要な役割を担っていることが予想され、術後補助化学療法の成績を改善するためのターゲットになりうると考えられた。

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 1 件)  
MASAYOSHI TOGE,  
SATORU YOKOYAMA,  
SHINICHIRO KATO,  
HIROAKI SAKURAI,  
KAZUTAKA SENDA,  
YOSHINORI DOKI,  
YOSHIHIRO HAYAKAWA,  
NAOKI YOSHIMURA,  
IKUO SAIKI

Critical contribution of MCL-1 in EMT-associated chemo-resistance in A549 non-small cell lung cancer  
International Journal of Oncology,  
査読有, 2015 年, p1844-1848

(学会発表)(計 1 件)  
第 55 回日本肺癌学会学術集会  
(2014 年 11 月 14 日~16 日)  
上皮間葉転換に伴うアポトーシス制御と抗癌剤耐性機構  
峠正義、仙田一貴、土岐善紀、芳村直樹

(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.inm.u-toyama.ac.jp/pb/gyoseki/inde.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者  
峠 正義 (TOGE, Masayoshi )  
富山大学・医学部・外科学(呼吸・循環・総合外科)・助教  
研究者番号:90456385

(2)研究分担者

(3)連携研究者  
横山 悟(YOKOYAMA, Satoru)  
富山大学・和漢医薬学総合研究所・病態生化学分野・助教  
研究者番号:90613498

早川 芳弘(HAYAKAWA, Yoshihiro)  
富山大学・和漢医薬学総合研究所・病態生化学分野・准教授  
研究者番号:10541956

済木 育夫(SAIKI, Ikuo)  
富山大学・和漢医薬学総合研究所・病態生化学分野・教授  
研究者番号:80133776