

## 論文の内容の要旨および論文審査の結果の要旨

学位申請者氏名：上岡 宏規

学位の種類：博士（薬学）

学位記番号：博（薬）甲第三号

学位授与年月日：令和3年3月3日

### 審査委員

主査 高崎健康福祉大学大学院薬学研究科教授 中西 猛夫



副査 高崎健康福祉大学大学院薬学研究科教授 常岡 誠



副査 高崎健康福祉大学大学院薬学研究科教授 中道 範隆



### 論文題目

がん細胞における Snail 誘発性上皮間葉転換に伴う薬物排出トランスポーターを介した薬物耐性機構の解析

Drug resistance mechanism mediated by efflux transporter during Snail-induced epithelial-mesenchymal transition in cancer cells

### 【論文内容の要旨】

2015年のWHOの調査によると、がんは各国における死亡原因の1位または2位を占めている。特に肺癌は全てのがん種の中で最も罹患率が高く、早期に転移することが知られている。また、肝癌は遠隔転移することで5年生存率がおよそ1%まで低下する。いずれの癌に対しても転移のように病期が進行した症例では、根治が望める外科的切除の対象から外れるため薬物療法などが施される。しかし、その効果は十分に得られていない。その原因の一つに、薬物に対する耐性が癌の進行につれて増強することが考えられる。上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition; EMT) は、固形癌の悪性化、特に転移と薬剤耐性に関与する。EMTは、上皮系細胞の細胞間接着の喪失を引き起こし、移動能を有する間葉系細胞へと変化させる現象である。EMTは様々な転写調節因子の増加により引き起こされ、最も広く研究されている因子として Snail がある。また、がん細胞の多剤耐性化機構の主な原因として、薬物排出輸送体の過剰発現が知られている。代表的な輸送体に、P-glycoprotein (P-gp) や MRP などがあり、これらのタンパク質は複数の薬物や生体異物を認識するため膜発現が増加することで薬物耐性が生じる。これまでに、学位申請者が所属する生物薬剤学研究室では、非小細胞肺癌細胞株 HCC827 細胞に Snail をコードする SNAI1 遺伝子を導入し EMT を誘導することで、P-gp の活性が亢進することが既に報告されている。本博士論文では、肺および肝癌細胞を用いて Snail 誘発性の EMT に伴う、P-gp の機能亢進メカニズムを解析することが目的とされた。

第2章では、Snail 誘発性の EMT に伴う P-gp の活性化機構として、P-gp の細胞膜発現を調節する ezrin (Ezr) や radixin (Rdx)、moesin (Msn) などの ERM タンパク質の機能に焦

点を当てた検討が実施された。SNAI1 遺伝子を導入した HCC827 細胞では Msn の発現量が増加し、また P-gp の細胞膜発現量が増加することが確認された。さらに、Msn の発現が抑制されると、P-gp 基質の抗がん薬である paclitaxel に対する感受性が増加した。したがって、HCC827 細胞では Snail 誘発性の EMT に伴い Msn の発現量および P-gp の細胞膜発現量が増加し、薬物耐性が増強することが示唆された。この現象が臨床においても生じ得るかを検討するため、肺癌患者の組織検体における mRNA 発現量を測定した結果、SNAI1 の発現量と P-gp および全ての ERM の発現に正の相関が認められた。これらの結果から臨床検体においては Snail の発現量の増加とともに、他の因子も P-gp および ERM の発現を調整している可能性が示唆された。

第 3 章では、非小細胞肺癌の治療に頻繁に使用される cisplatin は MRP2 や MRP5 の基質であり、irinotecan の活性代謝物 SN-38 は BCRP に輸送されることから、SNAI1 遺伝子を導入した HCC827 細胞において P-gp 以外の薬物排出輸送体による薬剤耐性について検討がなされた。SNAI1 遺伝子を導入した HCC827 細胞では MRP5 の細胞膜発現の増加に伴い、cisplatin に対する感受性が低下することが示唆された。一方、BCRP の発現は低下し HCC827 細胞の薬剤耐性は低下することが示された。

第 4 章では、肝芽腫由来細胞株 HepG2 細胞に SNAI1 遺伝子が導入され、P-gp の発現量および排出能の変化並びに P-gp に対する ERM の影響が検討された。SNAI1 遺伝子を導入した細胞では P-gp の総タンパク質量は変化しなかったが、細胞膜発現量が増加し P-gp の基質である rhodamine123 の細胞外排出の増加および paclitaxel に対する感受性の低下が認められた。また、SNAI1 遺伝子を導入した HepG2 細胞では ERM のうち Rdx の発現量が増加が認められた。さらに、P-gp と Rdx の相互作用を免疫沈降法により調べたところ、P-gp と直接結合する Rdx が増加することが確認された。

以上、本研究の成果により、がん細胞において Snail 誘発性の EMT に伴い臓器によって異なる ERM の発現が増加し、排出系トランスポーターの中で特に P-gp の細胞膜発現が増加することが確認された。これにより、癌細胞の転移性と基質薬物の細胞外排出に相関関係が示唆され、EMT により薬物耐性が増強することが示唆された。したがって、原発巣において P-gp を調節する ERM を標的とする医薬品の開発により、EMT に伴う P-gp を介した薬物耐性を抑制できることが期待された。

#### 【論文審査結果の要旨】

論文の審査は、主査と副査 2 名による予備審査および公開発表の場における最終試験により行われた。予備審査においては、序論と総括および上記三章に関して学位申請者(以下、申請者)がパワーポイントによるプレゼンテーションを行った後、本論文の内容に関する質問や問題点の指摘、コメントに対して申請者が応答する形式で行われた。全体を通じて、SNAI1 遺伝子発現細胞の EMT モデルとしての妥当性が指摘され、EMT と薬物耐性の関係の評価するためには複数のモデルの使用が推奨された。また、第 2 章では、SNAI1 遺伝子を導入した HCC827 細胞での P-gp 膜発現が確認されておらず、第 4 章での肝癌細胞による P-gp 膜発現の増加を示す結果から、EMT による癌細胞の薬物排出への P-gp の関与が示唆されていることから、結果に基づいて考察するように助言がなされた。他にも改善すべ

き点、加筆修正すべき点が指摘されたが、本研究課題は生物薬剤学分野の基礎研究として本研究科博士課程に相応しい内容であり、固形癌の多剤耐性発現機序に関する新規知見を含むため、適切な改善がなされれば、博士の学位申請論文として受理できると結論された。

しかし、この予備審査における指摘事項に関して実質的な変更がなされないまま、主査の了承なく本論文の最終版が1月31日に提出された。

2月15日に実施された最終試験では、予備審査で発表された第3章に相当する部分を除いた内容にSNAI1遺伝子を導入した非小細胞肺癌HCC827細胞でのP-gp膜発現の増加を示す結果が加えられる形で論文の公開プレゼンテーションが行われ、その後に質疑応答が実施された。発表は滞りなく行われたが、データの解釈および結論の導出過程に質疑や批判が集中した。具体的には、予備審査で指摘されたEMTモデルの妥当性をはじめとして、ERM発現に関するin vitro およびin vivo データの取り扱いと結果の相違、SNAI発現細胞の結果のみを基にしたERMの臓器依存性への言及などに対して見解が求められたが、いずれの質問についても申請者からは十分で納得のいく説明はなされなかった。ERMを標的とした薬剤耐性に関する可能性について、P-gpの活性は必ずしもERMの発現に依存しないが、この点についてはSNAI発現細胞のみで結論が導出されており、本可能性について十分な検証が行われていなかった。さらに、最終試験では発表されなかった第3章について、SNAI発現HCC827細胞においてMRPタンパク質の膜発現が増加する一方でBCRPの発現は低下することが示されている。同細胞ではP-gpの膜発現が増加していることを考慮すれば、化学療法の感受性が全体でどのように変化するかについて考察されず、あいまいなまま結論が導かれている点も看過できない。

最終試験の結果を踏まえて、審査委員は2月16日に審査委員会を開き、正しい実験結果の解釈に基づいて合理的な結論を導くように、具体的な指摘事項を別紙に示す通り2月17日に明示し、2月25日までに修正するように指導した。

固形癌の転移や薬剤耐性獲得はがん化学療法の有効性を阻む臨床上重大な障壁である。本論文は、固形癌の転移能獲得に重要な役割を果たすEMTプロセスが癌の悪性化に及ぼす影響を評価する研究の一環として薬剤耐性に焦点を当てて実施されたものであり、究極的には新規な固形癌の薬剤耐性獲得機序の解明に寄与し、有効ながん化学療法の開発へ繋がることを期待される。しかしながら、最終試験ではデータの客観的な解釈に基づく論理的な思考が展開されたとは言えず、ところどころ論旨に矛盾がみられた。また、予備審査における審査委員の助言及び修正要求が十分に反映されていなかった。本審査委員会はこの点を慎重に考慮し再度論文の改訂を求めた結果、申請者は指摘事項を十分に理解し、学位申請論文の修正に応じた。さらに、本論文の一部は既に査読付きの原著論文として公開されており博士申請に必要な要件は満たされているため、審査委員会は申請者の今後の活躍を期待し、本論文が博士(薬学)の学位に値するものであると判断した。