

2020 年度 博士論文

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

高崎健康福祉大学大学院薬学研究科
薬学専攻博士課程

学籍番号 1720101

氏 名 上岡宏規

指導教員 萩原琢男

目次

第1章	序論	7
第2章	ヒト非小細胞肺癌（NSCLC）細胞株（HCC827）における Snail 誘発性の上皮間葉転換（EMT）に伴う P-glycoprotein (P-gp) の機能亢進に対する Moesin (Msn) の関与	
第1節	序	9
第2節	結果	12
2-2-1	HCC827 細胞に <i>SNAIL</i> 遺伝子を導入したときにおける P-gp の細胞膜発現量の変化	12
2-2-2	HCC827 細胞に <i>SNAIL</i> 遺伝子を導入したときの ezrin, radixin (Rdx) および Msn (ERM) の発現量変化	13
2-2-3	HCC827 細胞における siRNA 処理による Msn の発現抑制	14
2-2-4	HCC827 細胞に <i>SNAIL</i> 遺伝子を導入したときの P-gp の排出能の亢進および paclitaxel に対する感受性の低下に対する Msn の関与	15
2-2-5	NSCLC 細胞株間における <i>SNAIL</i> 、ERM および P-gp の mRNA 発現量の相関	17
2-2-6	肺癌患者の組織検体における <i>SNAIL</i> 、ERM および P-gp 発現量の相関	18
2-2-7	肺癌患者の正常およびがん組織間における <i>SNAIL</i> および ERM の発現量および発現量比の比較	20
2-2-8	肺癌患者の正常およびがん組織間と NSCLC 株における <i>SNAIL</i> および ERM の発現量比較	22
第3節	考察	23
第4節	小括	25
第3章	HCC827 細胞における <i>SNAIL</i> 遺伝子導入による MRPs および BCRP の発現および機能変動	
第1節	序	26
第2節	結果	27

3-2-1	HCC827 細胞に <i>SNAIL</i> 遺伝子を導入したときの Multidrug Resistance-Associated Proteins (MRP)2 および MRP5 の発現変動	27
3-2-2	HCC827 細胞に <i>SNAIL</i> 遺伝子を導入したときの MRP2 および MRP5 の排出能の変化	29
3-2-3	<i>SNAIL</i> 遺伝子を導入した HCC827 細胞における cisplatin に対する感受性の変化	30
3-2-4	HCC827 細胞に <i>SNAIL</i> 遺伝子を導入したときの breast cancer resistance protein (BCRP) の発現変動	31
3-2-5	<i>SNAIL</i> 遺伝子を導入した HCC827 細胞における BCRP の機能と SN-38 に対する細胞の感受性に及ぼす影響	33
第 3 節 考察		34
第 4 節 小括		37
第 4 章 ヒト肝芽腫由来細胞株 (HepG2) における <i>SNAIL</i> 遺伝子導入による P-gp の発現および機能変動		
第 1 節 序		38
第 2 節 結果		39
4-2-1	HepG2 細胞に <i>SNAIL</i> 遺伝子を導入したときの EMT マーカーの発現変動	39
4-2-2	HepG2 細胞に <i>SNAIL</i> 遺伝子を導入したときの P-gp 発現量の変化	41
4-2-3	HepG2 細胞に <i>SNAIL</i> 遺伝子を導入したときの ERM タンパク質の発現量変化	43
4-2-4	<i>SNAIL</i> 遺伝子を導入した HepG2 細胞における P-gp と Rdx の相互作用	44
4-2-5	<i>SNAIL</i> を遺伝子導入した HepG2 細胞における P-gp の排出能の変化	45
4-2-6	<i>SNAIL</i> を遺伝子導入した HepG2 細胞における paclitaxel に対する感受性の変化	46
第 3 節 考察		47
第 4 節 小括		48
第 5 章 総括		
		49

第6章 実験方法の部

第1節 細胞培養 52

第2節 試薬 52

第3節 統計解析 55

第4節 実験方法 56

参考文献 64

主論文目録 70

副論文目録 71

謝辞 72

審査員 73

略語一覽

ABC	adenosine triphosphate binding cassette
AC	adenocarcinoma
BCRP	breast cancer resistance protein
BSA	bovine serum albumin
CAR	constitutive androstane receptor
CDCF	5(6)-Carboxy-2, 7-dichlorofluorescein
CDCFDA	5(6)-Carboxy-2, 7-dichlorofluorescein diacetate
<i>CDH1</i>	cadherin-1
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
C/M ratio	cell to medium ratio
CV	coefficient of variation
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
E-cad	E-cadherin
EGFR	epidermal growth factor receptor
Elc	elacridar
EMT	epithelial to mesenchymal transition
ERM	ezrin, radixin, moesin
ESI	electrospray ionization
Ezr	ezrin
FBS	fetal bovine serum
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HBSS-HEPES	Hank's balanced salt solution buffered with 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine-ethanesulfonic acid (pH7.4)
HPLC	high performance liquid chromatography
LC-MS/MS	liquid chromatography-tandem mass spectrometry
MRP	multidrug resistance associated protein
Msn	moesin
N.C.	negative control
N.S.	not significant
PBS	phosphate buffered saline
PBST	phosphate buffered saline containing 0.05% (v/v) Tween 20
P-gp	P-glycoprotein
PXR	pregnane X receptor
Rdx	radixin

RT-qPCR	reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction
Rho123	rhodamine 123
TGF	Transforming growth factor
VIM	vimentin
VPs	virus particles

第1章 序論

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¹。2019年に本国でおこなわれた人口動態調査においても、死因別にみた死亡率は1980年代からがんが1位であり、増加の一途を辿っている。その中でも肺がんは全てのがん種の中で最も死亡者数が多く、特に転移症例における患者の生存率は非常に低い^{2,3}。肺がんの脳への転移は他のがんよりも頻繁かつ早期に発生し、これが転移性肺がん患者の予後不良の原因の一つと考えられている^{4,5}。肺がんは他のがん腫と比較して従来から使用されている白金製剤やタキサン系などの殺細胞性抗がん剤から、tyrosine kinase inhibitorなどの分子標的薬に至るまで、幅広い医薬品が適応となっている。しかしながら、抗がん薬が適応される、病期が進行した症例における患者の予後は不良である^{6,7}。

一方がんの統計'19（公益社団法人がん研究振興財団）から、臨床病期（TNM分類）で遠隔転移していることを示すIV期における患者の5年相対生存率は、肝臓がんが最も低いことが確認できる。肝臓がんについては進行した症例に対して適応を持つ抗がん剤が少なく、2009年になってようやく分子標的薬のsorafenibが適応を承認されたものの、製造販売元のBayer AGから進行性肝細胞がん患者における第II相試験において奏効率が2.2%と報告されている⁸。進行した肝臓がんに対し多くの抗がん剤が効果を示さないことや奏効率が低いことから、転移のような進行した症例では薬物に対しより強い耐性を獲得していることが考えられる。このことから、がんの転移と薬物耐性機構に関係性があるのではないかと考えた。

上皮間葉転換（epithelial-mesenchymal transition; EMT）は正常な細胞における発達過程では中胚葉形成、神経管形成や線維化を含むいくつかの重要な役割を担っているが、がん細胞においては転移に関与していることが報告されている^{9,10}。がん細胞はEMTにより、細胞極性と細胞接着の喪失を引き起こすことで、上皮系細胞から間葉系細胞へ変化することで移動能を獲得する¹¹。このとき観察される上皮系細胞マーカーのE-cadherin（E-cad）の発現低下、および間葉系細胞マーカーのvimentin（VIM）の発現増加は、EMTにおいて不可欠な現象であると考えられている¹²。この現象はTransforming growth factor（TGF）- β などの成長因子の刺激により、いくつかの転写調節因子の発現が増加することで引き起こされる。その中でも最も広く研究されているSnailは、E-cadをコードするCDH1のプロモーター領域に結合し、その転写を阻害することでEMTを誘発することが知られている^{13,14}。さらに、EMTはがんの転移だけでなく薬物耐性にも関与することが報告されており、その機序としてapoptosisシグナル伝達の阻害や、がん細胞からの薬物の排出を促進することが明らかになっている^{15,16}。

通常、がん細胞からの薬物排出の亢進は、P-gp、MRP1,2,3,5およびBCRPなどの薬物排出トランスポーターが関与することが知られている¹⁷⁻²¹。これらのタンパク質はATP-binding cassette（ABC）transporters familyに属し、それぞれABCBI、ABCCI、2、3、5およびABC2にコードされている糖タンパク質である^{22,23}。これらのタンパク質は細胞膜に局

在しており、基質認識性が低いことから医薬品を含む多くの生体外物質の細胞外排出を担っている²⁴⁻²⁷。がん細胞においてはこれらのトランスポーターの発現量が増加し、抗がん薬の細胞内蓄積を低下させることで薬物耐性に関与している²⁸。このことから、特に P-gp を阻害する医薬品を開発する取り組みがおこなわれてきたが、P-gp は血液脳関門、肝臓、腎臓、消化管を含む複数の正常組織で発現しており、副作用の観点からこれまでのところ成功していない²⁹⁻³²。

Ezrin (Ezr) , radixin (Rdx) および moesin (Msn) (ERM) などの足場タンパク質は、細胞膜においてトランスポーターを含む膜タンパク質の細胞膜局在を調節している^{33,34}。P-gp の活性についても ERM タンパク質に依存することが報告されている³⁵⁻³⁷。トランスポーターが活性を示すためには、細胞膜に局在する必要があることから、P-gp の mRNA 発現量や総タンパク質発現量が必ずしも P-gp の活性と相関しない理由の一つとして、これらの足場タンパク質の関与が考えられる。当研究室では、P-gp の細胞膜局在に関与する主な ERM タンパク質の分子種が臓器ごとに異なることを報告している^{38,39}。例えば、肺では Ezr および Msn、肝臓や結腸では Rdx が調節している。これらの発見は ERM それぞれの分子種に対して特異的な阻害をすることで、臓器特異的な P-gp の機能抑制を可能にし得ることが考えられる。このように ERM の阻害による間接的な P-gp の阻害は、直接的な阻害よりも副作用が低減されることが予想される。

本論文では、肺および肝臓がん細胞を用いて Snail 誘発性の EMT に伴う、薬物排出トランスポーターの発現量および機能の変化を検討した。また、この時の P-gp の輸送能について ERM の関与を解明することを目的とし、以下の検討をおこなった。

第 1 章の序論に続き、第 2 章ではヒト非小細胞肺癌細胞 (NSCLC) 株 HCC827 細胞に Snail をコードする *SNAIL* 遺伝子を導入したときに P-gp の細胞膜発現量および機能が変化するかを評価し、ERM の発現量変化が P-gp の機能に影響を及ぼすかについて検討をおこなった。また、肺癌患者の組織検体を用いて Snail、ERM および P-gp の mRNA 発現量について相関を評価し、*in vitro* で得られた結果が臨床でも起こり得るかを検討した。第 3 章では、HCC827 細胞に *SNAIL* 遺伝子を導入することにより、MRPs および BCRP の発現量ならびに機能が変化するか否かについて検討した。第 4 章では、肝芽腫由来細胞株 HepG2 細胞に *SNAIL* 遺伝子を導入し、P-gp の発現量および機能が変化するかを検討した。さらに、このときの P-gp 活性化機構の解明に取り組み、臓器間の違いを考察した。なお本項では Snail についてタンパク質を表す際には「Snail」、遺伝子を表す際には「*SNAIL*」を用いることとする。また、Ezr、Rdx、および Msn について遺伝子を表す際には斜体を用いた。

第2章 ヒト非小細胞肺癌 (NSCLC) 細胞株 (HCC827) における Snail 誘発性の上皮間葉転換 (EMT) に伴う P-glycoprotein (P-gp) の機能亢進に対する Moesin (Msn) の関与

第1節 序

がん細胞における EMT の制御は、特に転写調節因子が中核を担うと考えられている。これらの因子の中でも Snail ファミリーの発現は TGF- β シグナルにより亢進し、がんの悪性化に関わっている⁴⁰。そのファミリーは *SNAIL*、*SNAIL2* および *SNAIL3* 遺伝子にコードされるタンパク質 Snail、Slug および Smad により構成されている zinc-finger 型転写調節因子である。Snail は発生過程における重要な転写調節因子として 1991 年に初めて確認され、1994 年には EMT の誘導に関与する因子であることが報告された⁴¹。Snail が EMT を誘導するメカニズムは主に、細胞接着因子の E-cad をコードする *CDH1* のプロモーター領域に存在する E-Box 配列 (CAGGTG) に結合し、転写を抑制することで E-cad の発現が低下することによって考えられている⁴²。一方近年では、Snail は転写活性因子としての機能を持つという報告も増えてきている。例えば、紫外線などにより誘発され DNA 損傷の修復に関わる excision repair cross complementing group 1、好中球の走化や血管新生を促進する interleukin-8 の転写を直接促進し、また p65 とともにがんの転移にも関与する fibronectin1 を誘導することが報告されている⁴³⁻⁴⁵。当研究室ではこれまでに、HCC827 細胞に *SNAIL* を 1000 倍程高発現させることで EMT を誘導し、P-gp の発現量および輸送機能の変化について評価をおこなっている。その結果 *SNAIL* 遺伝子を導入した細胞では、*VIM* の発現量に増加が認められ (9.21 ± 1.68 -fold)、E-cad (*CDH1*) (0.70 ± 0.07 -fold)、claudin-1 (*CLDN1*) (0.34 ± 0.05 -fold) および occludin (*OCLN*) (0.69 ± 0.03 -fold) の発現量に低下が認められた (Figures 2-S1 B~E)。また、細胞の移動能を評価する migration assay により *SNAIL* 遺伝子を導入した細胞では、コントロールの Mock 細胞と比較して移動能の増加が観察された (Figure 2-S1 F, G)⁴⁶。このことから、*SNAIL* 遺伝子の導入により HCC827 細胞に EMT が誘導されたことが示唆された。この細胞において P-gp の輸送能が亢進するか否かを確認するため、P-gp の蛍光基質である rhodamine (Rho) 123 を用いて排出速度試験をおこなった。*SNAIL* 遺伝子を導入した細胞における Rho123 の細胞外排出量は、Mock 細胞と比較して増加が認められた。この排出量の増加は、P-gp を阻害する elacridar の併用によって抑制された (Figure 2-S1 H)。同様の条件下で、薬物耐性が増強し得るかを検討するため P-gp 基質である抗がん薬 paclitaxel を用いて細胞毒性試験を実施したところ、*SNAIL* 遺伝子を導入した細胞の生存率は Mock 細胞よりも高い値を示した。つまり、paclitaxel に対する感受性が低下した。この感受性の低下は elacridar の存在下で抑制されることから、P-gp の関与が示唆された (Figure 2-S1 I)。一方で、P-gp の総発現量に増加は認められなかった⁴⁷ (Figure 2-S1 K, L)。

本章では、P-gp の発現量の増加を伴わない排出能の亢進に、P-gp の細胞膜発現を調節する ERM タンパク質が関与していると仮定した。そこで、HCC827 細胞における Snail 誘発

性の EMT に伴う P-gp の活性化に、ERM タンパク質が関与するかについて明らかにすることを目的とした。また、HCC827 細胞を含む NSCLC 細胞株である A549 細胞、H441 細胞および H1975 細胞における Snail、ERM および P-gp の mRNA 発現量の相関を評価した。さらに、肺癌患者の臨床検体についても同様に mRNA 発現量を測定することにより、*in vitro* との関連性を評価した。

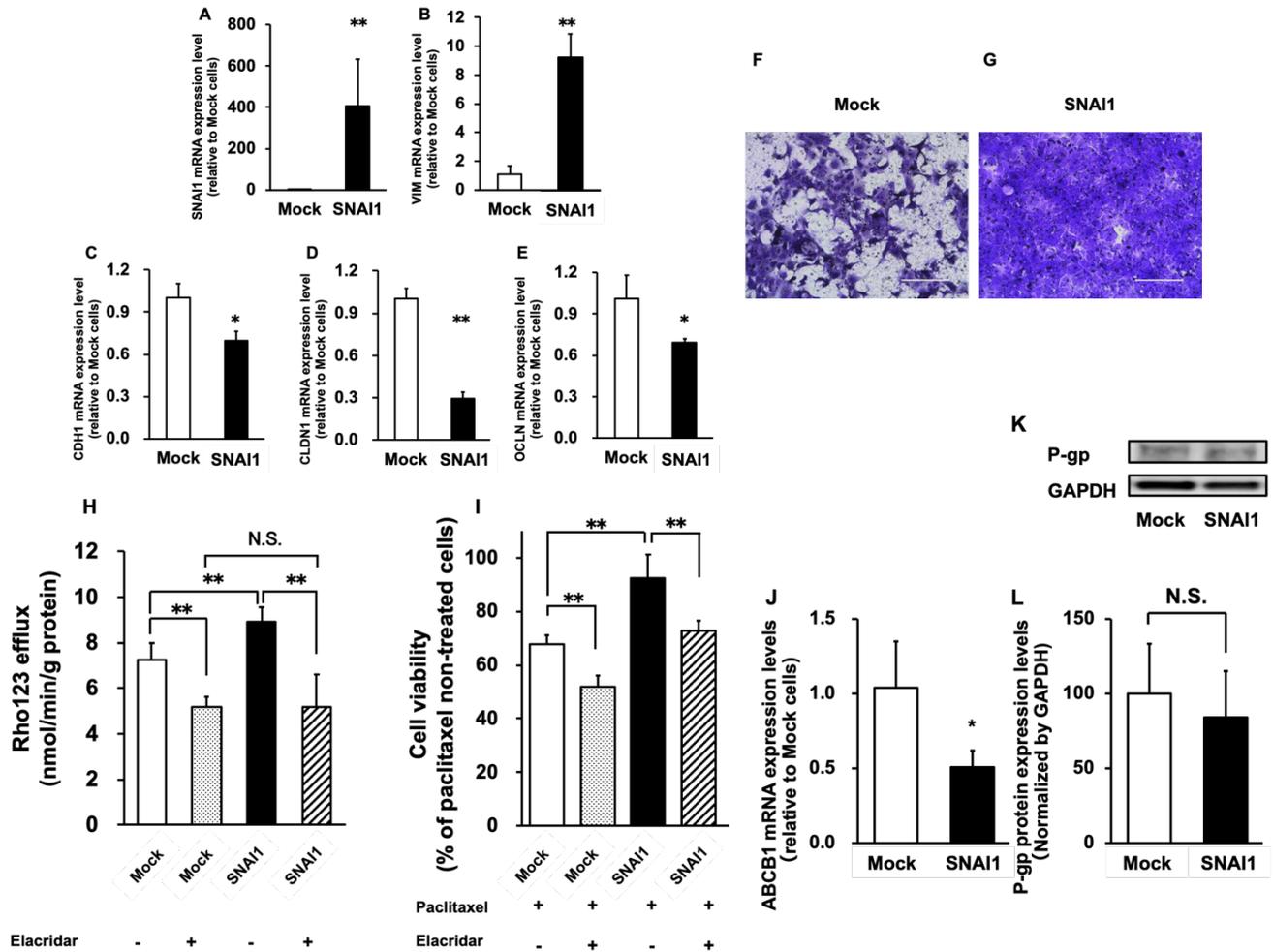


Figure 2-S1 Evaluation of EMT induction and change of P-gp function and expression caused by *SNAI1* transduction in HCC827 cells.

(A-E) mRNA expression levels of *SNAI1*, *VIM*, *CDH1*, *CLDN1* and *OCLN* in *SNAI1*-transduced cells are shown as mean \pm S.D. (n=3 or 4). (F-G) Migration assay of HCC827 cells using a Transwell system. Scale bars indicate 200 μ m. (H) 10 μ M Rho123 was loaded into HCC827 cells and the cells were incubated for 30 min at 37°C. The efflux ratio was calculated as described in the text. (I) HCC827 cells were treated with 10 μ M paclitaxel for 4 days and then MTT assay was conducted. Cell viability (%) was calculated, taking survival in the absence of paclitaxel in each group as 100%. (J) The mRNA expression levels of *ABCB1* are shown as mean \pm S.D. (n = 3 or 4). (K) Representative Western blot confirming the presence of P-gp (170 kDa) and GAPDH (37 kDa) in HCC827 whole-cell lysate. (L) Band densities were determined with a Luminescent Image Analyzer LAS-3000, and P-gp densities were normalized by GAPDH. The protein expression levels of P-gp are shown as mean \pm S.D. (n = 3). The data are mean \pm S.D. (n = 4-15). Significant differences from or Mock cells are indicated: ** : p < 0.01, * : p < 0.05. N.S. indicates no significant difference.

第2章
第2節 結果

2-2-1 HCC827 細胞に *SNAIL* 遺伝子を導入したときにおける P-gp の細胞膜発現量の変化

SNAIL 遺伝子の導入により EMT が誘導された HCC827 細胞における P-gp の細胞膜発現量の変化を確認するため、western blot 法によりタンパク質発現量を測定した。Mock 細胞と比較して、*SNAIL* 遺伝子を導入した細胞では P-gp の細胞膜発現量が増加することが確認された ($227.1 \pm 138.1\%$) (Figure 2-1 A, B)。なお、細胞膜を抽出したサンプルにおいて、細胞膜マーカーである Na^+/K^+ ATPase のバンドが homogenate よりも濃いことから、細胞膜画分が抽出されていることが確認された (Figure 2-1 A)

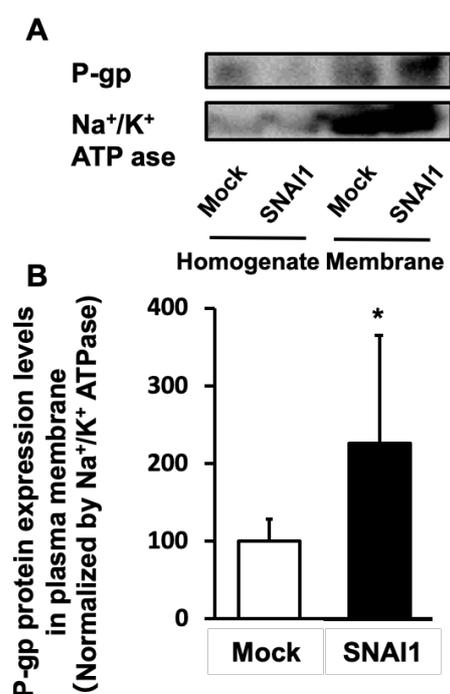


Figure 2-1 Effect of *SNAIL* on plasma membrane expression of P-gp in HCC827 cells.

(A, B) The protein expression levels of P-gp in *SNAIL*-transduced and Mock cells are shown as mean \pm S.D. (n = 3). Representative western blot confirming the presence of P-gp (170 kDa) and Na^+/K^+ ATP-ase (113 kDa) in HCC827 plasma membrane fraction. Band densities were determined with a Luminescent Image Analyzer LAS-3000, and P-gp densities were normalized by Na^+/K^+ ATP-ase (plasma membrane). Significant difference: * $p < 0.05$.

2-2-2 HCC827細胞に *SNAIL* 遺伝子を導入したときの ezrin, radixin(Rdx)およびMsn(ERM)の発現量変化

HCC827 細胞に *SNAIL* 遺伝子を導入することで、P-gp の総発現量は変わらないものの、膜発現が増加することについて、P-gp の細胞膜発現を調節することが知られている ERM に着目した。Snail が ERM の発現量に及ぼす影響を調べるために、*SNAIL* 遺伝子を導入した細胞と Mock 細胞における mRNA 発現量を測定した。*Msn* の mRNA 発現量は Mock 細胞と比較して *SNAIL* 遺伝子を導入した細胞で 2.3 倍に増加したが、*Ezr* と *Rdx* の発現量は変化しなかった (Figure 2-2 A~C)。*SNAIL* 遺伝子を導入した細胞では、Mock 細胞と比較して、Msn のタンパク質発現量についても 2.7 倍の増加が認められた (Figure 2-2 D, E)。

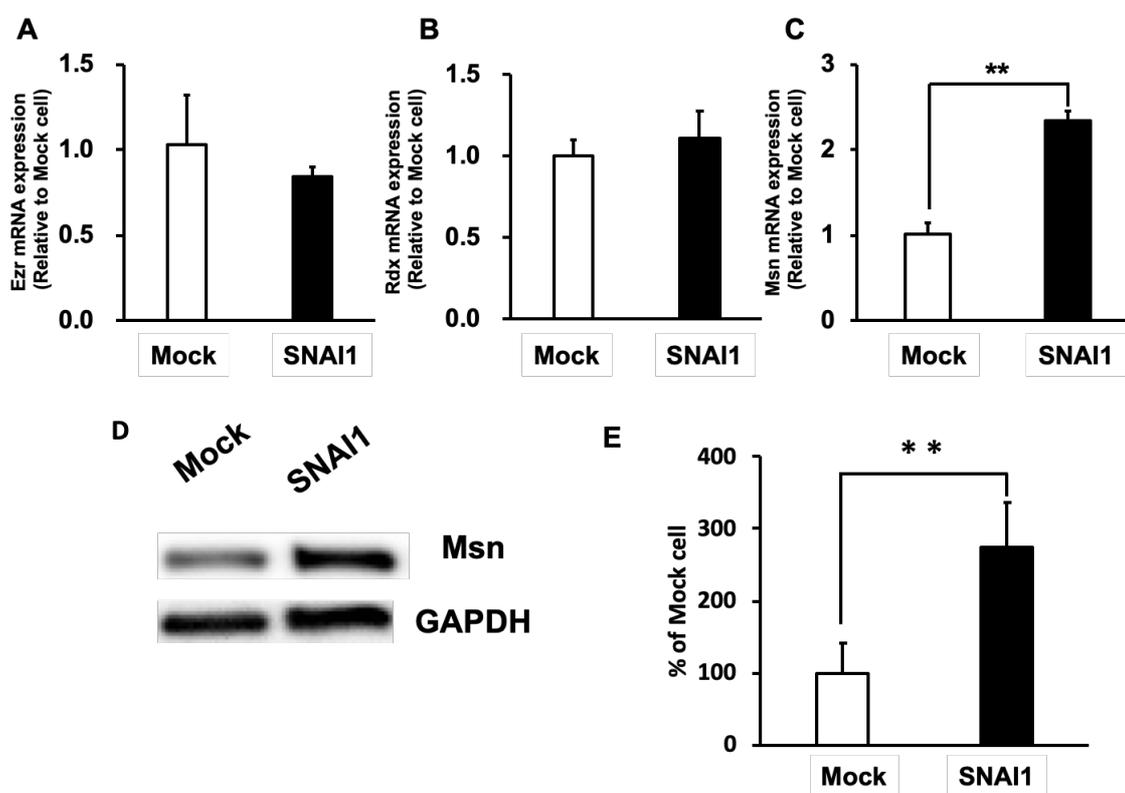


Figure 2-2 Effect of *SNAIL*-transduction on expression levels of *Ezr*, *Rdx*, and *Msn* in HCC827 cells.

The mRNA expression levels of *Ezr* (A), *Rdx* (B), and *Msn* (C) in *SNAIL*-transduced and Mock cells are shown as mean \pm S.D. (n = 3 or 4). Western blot (D) and densitometric analysis (E) of *Msn* (77 kDa) and *GAPDH* (37 kDa) proteins in HCC827 whole-cell lysate (n = 5). Band densities were determined with a Luminescent Image Analyzer LAS-3000, and *Msn* densities were normalized by *GAPDH*. Significant difference: **p < 0.01; other differences were not significant.

2-2-3 HCC827 細胞における siRNA 処理による Msn の発現抑制

前項より、*SNAIL1* 遺伝子の導入することで HCC827 細胞における *Msn* の発現量が増加することが確認された。そこで、増加した *Msn* の P-gp への影響を評価することを目的に、まず siRNA を用いて *Msn* を knockdown させた。HCC827 細胞に siMsn を処理することで *Msn* の mRNA 発現量は、それぞれの Negative control (N.C.) と比較して Mock 細胞では 19%、*SNAIL1* 遺伝子を導入した細胞では 15% まで抑制された (Figure 2-3)。

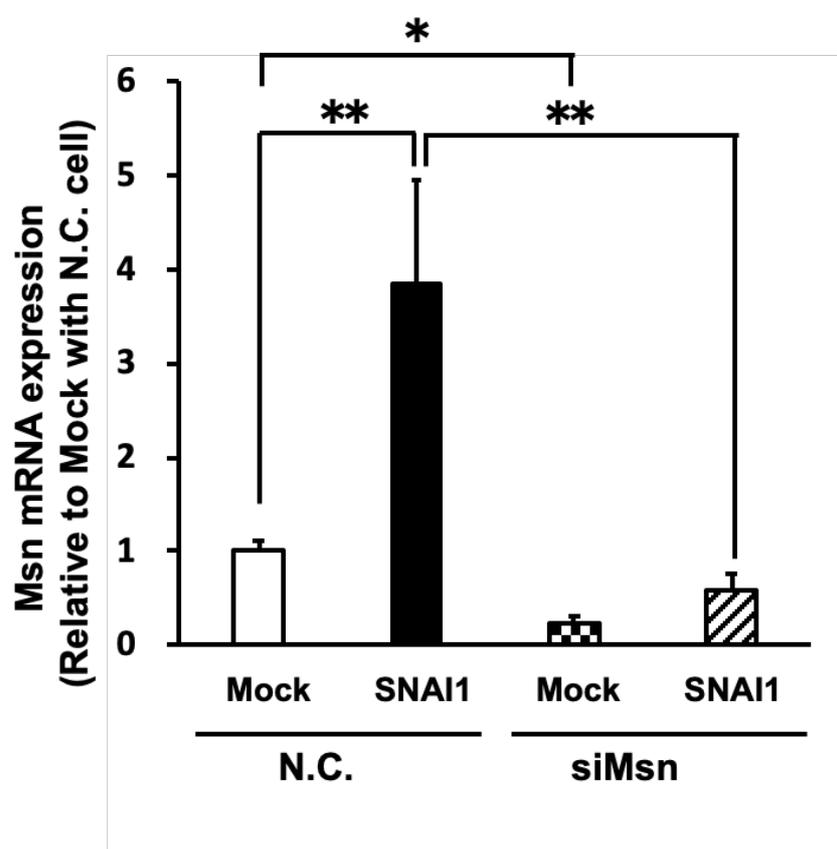


Figure 2-3 siRNA silencing of *Msn* mRNA expression in HCC827 cells.

Mock and *SNAIL1*-transduced HCC827 cells were treated with negative control siRNA (N.C.) or *Msn* targeting siRNA (siMsn) for 3 days and then cultured with fresh medium for 3 days. Expression of *Msn* mRNA is shown as mean \pm S.D. (n = 3 or 4). Significant difference: *p < 0.05, **p < 0.01.

2-2-4 HCC827 細胞に *SNAIL* 遺伝子を導入したときの P-gp の排出能の亢進および paclitaxel に対する感受性の低下に対する Msn の関与

SNAIL 遺伝子を導入した HCC827 細胞における P-gp の輸送能の亢進に Msn の発現増加が関与するかを明らかにするために、siRNA N.C. または siMsn で処理した細胞を使用して、Rho123 を用いた排出速度試験と paclitaxel による細胞毒性試験を実施した。*SNAIL* 遺伝子を導入した細胞では、Rho 123 の排出率が Mock 細胞と比較して 4.1 倍に増加し、この増加は Msn の knockdown によって 50% 抑制された (Figure 2-4 A)。さらに、paclitaxel の曝露により、Mock 細胞の生存率は未処理の細胞と比較して 52.1% に減少した。一方で、*SNAIL* 遺伝子を導入した細胞の生存率は 72.8% に減少し、Msn の knockdown によって 33.4% まで減少した (Figure 2-4 B)。

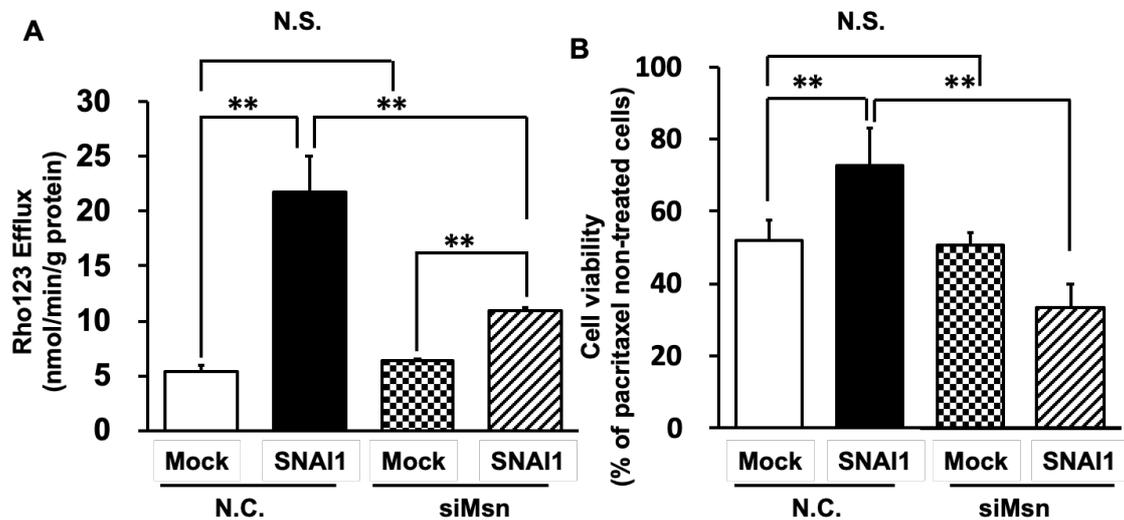


Figure 2-4. Effect of *Msn* silencing on Snail-induced upregulation of P-gp efflux activity in HCC827 cells, evaluated in terms of Rho 123 efflux and paclitaxel resistance.

Mock and *SNAI1*-transduced HCC827 cells were transduced with negative control siRNA (N.C.) or *Msn* targeting siRNA (siMsn) for 3 days. Cells were then cultured with fresh medium for 3 days. (A) In efflux assay, 10 μ M Rho123 was loaded into HCC827 cells for 30 min at 4°C and then the cells were incubated in Opti-MEM without Rho123 for 10 min at 37°C (n = 4-6). (B) Cells were incubated with 3 μ M paclitaxel for 4 days under the same conditions. Cell viability (%) was calculated, taking survival in the absence of paclitaxel in each group as 100%. The data are mean \pm S.D. (n = 5). Significant difference: **p < 0.01. N.S. indicates no significant difference.

2-2-5 NSCLC 細胞株における *SNAIL1*、ERM および P-gp の mRNA 発現量の相関

次に、NSCLC 細胞株における *SNAIL1*、ERM および P-gp の mRNA 発現量の相関を調べるために、HCC827 細胞および EMT 研究で使用が報告されている^{31,32}他の 3 種類の NSCLC 細胞株である A549、H441 および H1975 における mRNA 発現量を測定した。4 つの NSCLC 細胞株間における *SNAIL1* の発現は、*Ezr* ($r = 0.842$)、*Rdx* ($r = 0.868$) および *Msn* ($r = 0.809$) の発現と有意な正の相関を示した。一方、P-gp の発現とは負の相関を示した ($r = -0.666$) (Figure 2-5)。

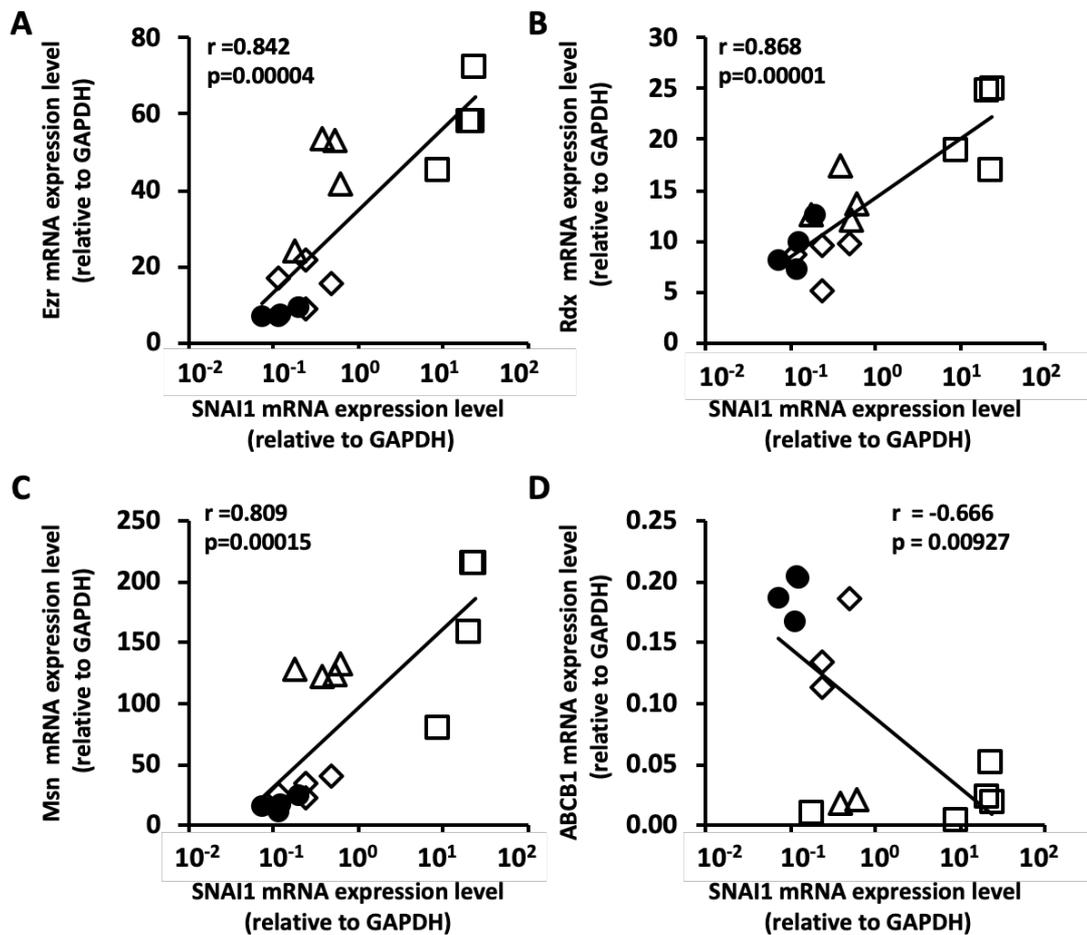


Figure 2-5. Correlations between expression level of *SNAIL1* mRNA and those of *Ezr*, *Rdx*, *Msn*, and *ABCB1* mRNAs in 4 NSCLC cell lines.

Cells were incubated for 4 days under the usual culture conditions and the mRNA levels of *Ezr* (A), *Rdx* (B), *Msn* (C), *ABCB1* (D), and *SNAIL1* were determined. mRNA expression levels are shown as relative values with respect to *GAPDH* expression (*GAPDH* = 1000). Circles, HCC827 cells; squares, H1975 cells; triangles H441 cells; and diamonds, A549 cells. Correlation coefficient (r) and p value are shown in each panel.

2-2-6 肺がん患者の組織検体における *SNAIL*、ERM および P-gp 発現量の相関

HCC827 細胞に *SNAIL* 遺伝子を導入した際に観察された ERM の発現量変化や 4 種の NSCLC 細胞株でみられた *SNAIL* および ERM または P-gp の発現量の相関関係が臨床検体でも認められるかを評価するため、肺がん患者の腫瘍および正常組織検体の mRNA 発現量を測定した。腫瘍組織における *SNAIL* の mRNA 発現量は、*Ezr* ($r = 0.769$)、*Rdx* ($r = 0.831$)、*Msn* ($r = 0.803$) および *ABCB1* ($r = 0.776$) と有意に正の相関を示した (Figure 2-6 A~D)。一方正常組織では同様の相関は見られなかった (Figure 2-6 E~G)。なお、P-gp の mRNA は検出されなかった。

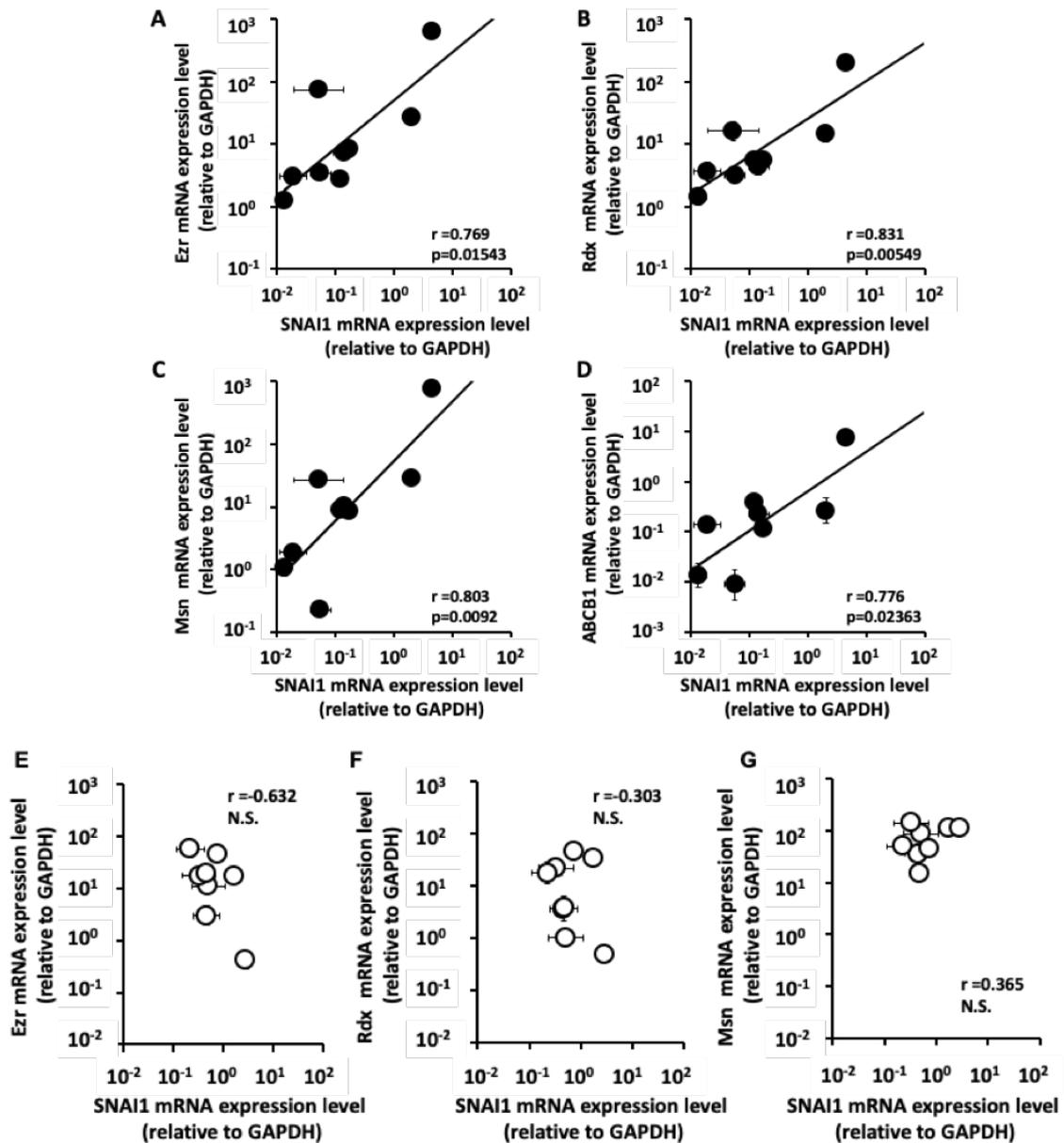


Figure 2-6 Correlations between mRNA expression levels of *SNAIL1* and those of *Ezr*, *Rdx*, *Msn*, and *ABCB1* in cancer tissue and normal tissue from 9 patients with lung cancer.

One sample of noncancer tissue could not be measured because the expression level of *SNAIL1* was too low. Significant positive correlations were found between expression of *SNAIL1* mRNA and *Ezr* (a), *Rdx* (b), *Msn* (c), and *ABCB1* (d) mRNAs in cancer tissues. However, no correlation between *SNAIL1* mRNA and *Ezr* (e), *Rdx* (f), or *Msn* (g) mRNA was found in normal tissues from the patients. *ABCB1* mRNA was not detectable in normal tissues. mRNA expression levels are shown as relative values with respect to *GAPDH* expression (*GAPDH* = 1000). The data are mean values of triplicate measurements \pm S.D. N.S. indicates no significant difference.

2-2-7 肺がん患者の正常およびがん組織間における *SNAIL* および ERM の発現量および発現量比の比較

前項で、腫瘍組織における *SNAIL* と ERM および P-gp の mRNA 発現量は正の相関を示した。これらは各患者の発現量の個体差やがん化に伴う発現量の増減が反映されない可能性が考えられることから、正常およびがん組織における *SNAIL* および ERM の発現量および発現量比の比較をおこなった。なお、P-gp に関しては正常組織で測定できなかったため比較の対象から外した。正常およびがん組織における *SNAIL* と ERM の mRNA 発現量の平均に有意な差は認められなかった。一方、正常およびがん組織における発現量比の相関を評価したところ、*SNAIL* と *Msn* に正の相関が認められた (Figure 2-7)。

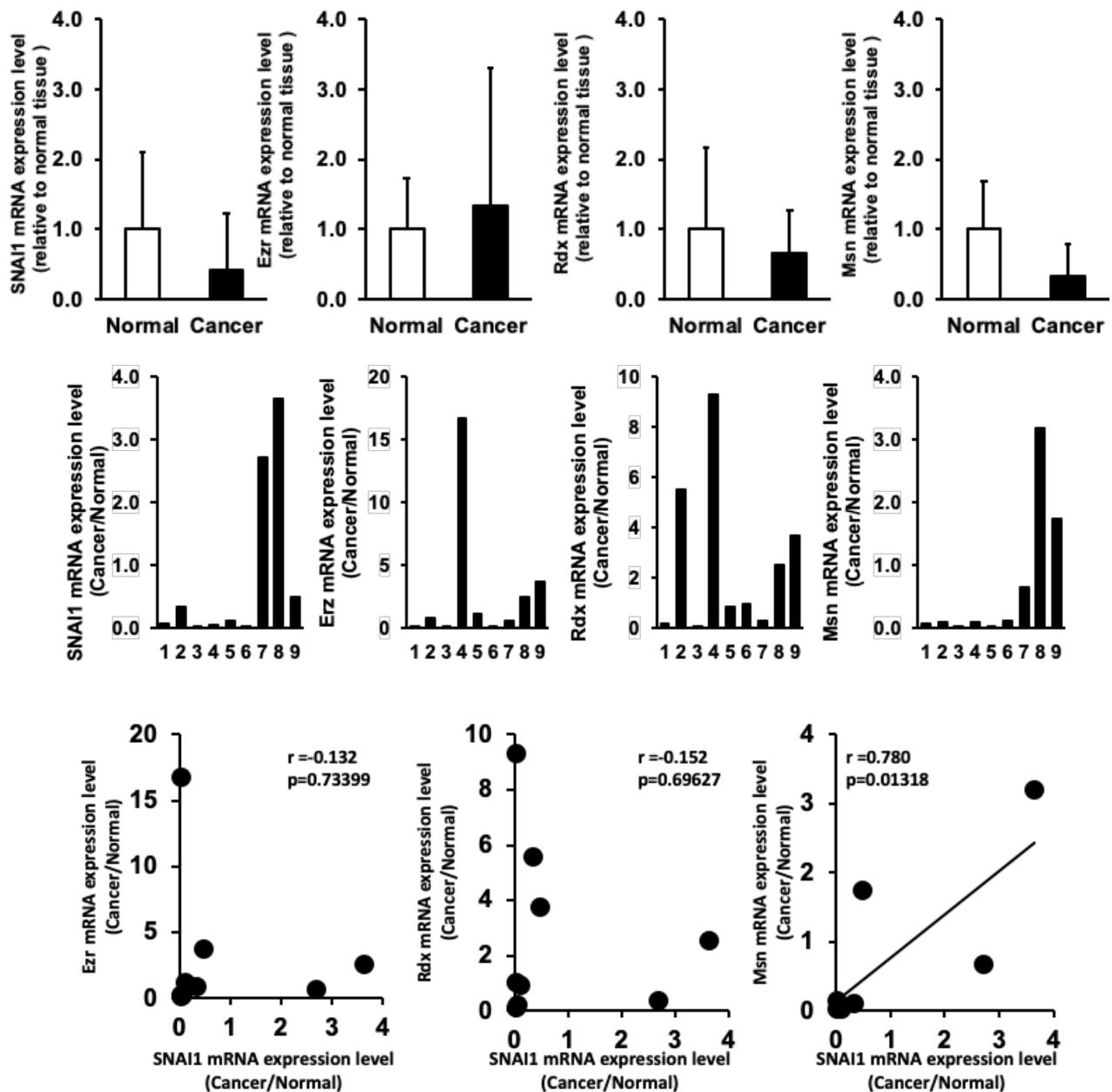


Figure 2-7 Comparison of mRNA expression levels of *SNAIL1* and those of ERM and correlations between mRNA expression ratio of *SNAIL1* and those of ERM in cancer and normal tissue.

(Upper stage) The mRNA expression levels of *SNAIL1* and ERM in normal and cancer tissue are shown as mean ± S.D. (n = 9). (Middle stage) mRNA expression ratio of *SNAIL1* and ERM in cancer and normal tissue. (Lower stage) correlations between mRNA expression ratio of *SNAIL1* and those of ERM in cancer tissue/normal tissue ratio. mRNA expression levels are shown as relative values with respect to *GAPDH* expression (*GAPDH* = 1000)

2-2-8 肺がん患者の正常およびがん組織間と NSCLC 株における *SNAIL* および ERM の発現量比較

細胞株と臨床組織における *SNAIL* の発現量の違いを比較するため、肺がん患者の正常およびがん組織と NSCLC 細胞株における *SNAIL* の発現量を比較した。H1975 細胞における *SNAIL* の発現量は肺がん患者の正常およびがん組織より有意に高かった。一方で、HCC827 細胞、A549 細胞および H441 細胞における *SNAIL* の発現量は肺がん患者の正常およびがん組織と差が認められなかった (Figure 2-8)。

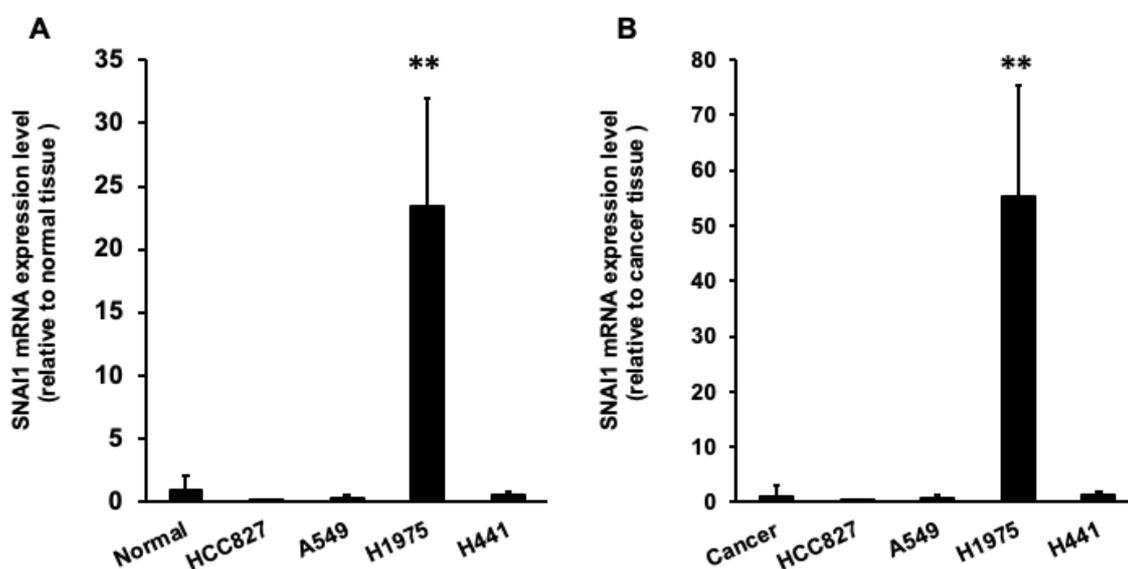


Figure 2-8 Correlations between mRNA expression levels of *SNAIL* in clinical tissue and NSCLC cell lines.

The mRNA expression levels of *SNAIL* in NSCLC cell lines and (A) normal or (B) cancer tissue are shown as mean \pm S.D. (n = 4-9). mRNA expression levels are shown as relative values with respect to *GAPDH* expression (*GAPDH* = 1000). Significant difference: **p<0.01 compared with normal or cancer tissue.

第3節 考察

当研究室では *Snail* 誘発性の EMT に伴う P-gp の輸送能の亢進は、P-gp の総発現量と必ずしも相関するとは限らないこと、⁴⁷ および P-gp の機能が ERM タンパク質によって調節されていること^{30,31} を報告している。本稿では、*Snail* 誘発性 EMT に伴う P-gp の輸送能の亢進について ERM タンパク質の関与を検討した。

これまでの検討で *SNAIL* 遺伝子を導入した HCC827 細胞において間葉系細胞マーカーの VIM の上昇、上皮系細胞マーカーの E-cad 等の低下、および migration assay による移動能の増加は観察されており、これまでの報告と一致していることから、EMT が誘導されたと考えられた (Figure 2-S1)。その HCC827 細胞において、P-gp の細胞膜発現量の増加が認められた (Figure 2-1)。また、ERM タンパク質のうち Msn の発現量が増加していることが確認された (Figure 2-2)。さらに、Rho123 の排出率増加および paclitaxel に対する感受性の低下が認められた。この Rho123 の輸送量の増加および paclitaxel への感受性の低下は、siMsn 処理によって抑制された (Figure 2-4)。これらの結果から、*SNAIL* 遺伝子を導入した HCC827 細胞では、P-gp 細胞膜発現量が増加することで輸送能が亢進し、paclitaxel に対する耐性が增強することが示唆された。また、この機構の一部に肺において P-gp の膜局在を調節する Msn の発現増加が関与する可能性が考えられた。Yao 氏らは口腔がん細胞株において、siRNA 処理により *Snail* の発現を抑制することで ERM の発現が抑制されることを報告しており、我々の結果と一部相違する⁴⁸。我々の HCC827 細胞を用いた試験系では *Snail* により Msn のみの発現が増加したことに対し、Yao 氏らが用いた細胞株では ERM 全ての発現が影響を受けたことから、*Snail* は ERM の発現を制御しているものの細胞や実験条件により制御する分子種が異なる可能性がある。これまでに *Snail* が Msn の発現を直接制御しているという報告は乏しい。また、我々の検討は *Snail* 誘発性の EMT の結果なのか、または *Snail* による独立した現象なのかは不明であるため、これを明らかにするためには *Snail* 以外の複数の EMT 調節因子による検討が必要と考えられた。一方で、横紋筋肉腫細胞株を用いた研究で、クロマチン免疫沈降法により E2f のプロモーター領域に *Snail* が結合することが報告されている⁴⁹。本検討においても、*Snail* が Msn を直接的に制御しているか否かは、これらの実験により明らかにできると考えられた。HCC827 細胞を用いた試験で得られた現象が、他の NSCLC 細胞株や実際の臨床においても生じうるかを検討するため、4 種類の NSCLC 細胞株 (HCC827、A549、H441 および H1975) ならびに肺がん患者組織における *Snail*、P-gp および ERM タンパク質の mRNA 発現量を測定し、それぞれの相関を評価した。肺がん患者のがん組織における *SNAIL* の発現量は、ERM および P-gp の発現量と強く相関したが、正常組織では相関が認められなかった (Figure 2-6)。また、*SNAIL* および ERM 各々の発現量は平均的にはがん化によって有意に変化しなかった。一方、これらの結果には各患者の発現量の個体差やがん化に伴う発現量の増減が反映されていない。そこで、*SNAIL* および ERM について、がん組織の正常組織に対する発現量の比 (がん組織/正常組織) を検討し

た。その結果 *SNAIL* と *Ezr* および *Rdx* の発現量には相関が認められなかったのに対し、*SNAIL* の発現量が多い患者は *Msn* の発現も多く、*SNAIL* と *Msn* の発現量に有意な正の相関が確認された ($r=0.780$) (Figure 2-7)。この結果は *in vitro* による検討と矛盾せず、*SNAIL* の発現量の増加は *Msn* の発現量の増加に関与している可能性が補強されたものと考えられた。すなわち、臨床で起きている事象の少なくとも一部は、*in vitro* による結果で説明できことが示唆された。なお、P-gp についても正常組織における発現を検出限界以下と考えると、*SNAIL* と P-gp の発現量比は相関していることが想定されるが、*in vitro* ではこの結果を再現できていないことから、臨床検体における P-gp の発現は *Snail* に依存しない事象であると考えられた。

NSCLC 細胞株において *SNAIL* の発現量は、*Ezr*、*Rdx*、*Msn* と正の相関が示したが、P-gp とは負の相関を示した (Figure 2-5)。*Snail* は、結腸および直腸において P-gp 発現の調節に関与する β -catenin、signal transduction and activator of transcription 3、pregnane X receptor (PXR)、constitutive androstane receptor (CAR) または forkhead box O 3a を増加させないことが報告されている³⁹。さらに、NSCLC 細胞株 A549 では PXR と CAR の発現がほとんどないことが報告されている⁴⁰。これらの知見は、*Snail* による P-gp の発現調節は PXR や CAR を介さず、臨床における P-gp 活性化は、*Snail* のみに帰することはできないと考えられた。なお、NSCLC 細胞株における *SNAIL* の発現について正常組織およびがん組織を比較したところ、H1975 細胞以外に有意な差は認められなかった。これは、H1975 細胞以外の細胞株では *SNAIL* の発現量が低いこと、臨床における *SNAIL* の発現量はがんが悪性化したときに増加するが、提供される検体は臨床病期が早期の患者のものであるため、差が認められなかったと考えられた (Figure 2-8)。

第4節 小括

第2章の結果より、以下の知見が得られた。

1. *SNAIL* 遺伝子を導入した HCC827 細胞において、P-gp の細胞膜発現量に増加が認められた。
2. *SNAIL* 遺伝子を導入した HCC827 細胞において、ERM タンパク質のうち Msn の発現量に増加が認められた。
3. Msn の発現を siRNA 処理により低下させることで、*SNAIL* 遺伝子の導入による Rho123 の細胞外排出量の増加および paclitaxel に対する感受性の低下が抑制された。
4. 4 種の異なる NSCLC 株における *SNAIL* と ERM の mRNA 発現量に正の相関が認められた一方で、*SNAIL* と P-gp の mRNA 発現量は負の相関が認められた。
5. 肺がん患者のがん組織における *SNAIL* と ERM および P-gp の mRNA 発現量に正の相関が認められた一方で、正常組織では相関が認められなかった。また、がん組織と正常組織における発現量比（がん組織/正常組織）は *SNAIL* と Msn のみの発現に相関が認められた。

以上から

HCC827 細胞では Snail 誘発性の EMT に伴い Msn の発現量が増加することで、P-gp の細胞膜発現量および P-gp の活性が増強することが示唆された。一方、肺がん患者のがん組織と正常組織における発現量比（がん組織/正常組織）は *SNAIL* と Msn が相関を示したことから、Snail は少なくとも Msn の発現量を増加させることで P-gp 基質の輸送量の増加に間接的に関与することが示唆された。また、Snail との関係性は明らかではないが、P-gp は正常組織で発現を測定されず、がん組織で測定されたことから、がん化により発現が増加することが考えられた。実際の臨床においては Snail の発現増加に伴い変化する他の因子が ERM タンパク質および P-gp の発現を増加させる可能性が考えられ、これにより肺がん細胞における薬物耐性をより強くする可能性が考えられた。⁵⁰

第3章 HCC827細胞における *SNAIL* 遺伝子導入による MRP_s および BCRP の発現 および機能変動

第1節 序

これまでに我々の研究室では、HCC827細胞に *Snail* 誘発性の EMT を生じさせることで P-gp 基質の排出量が発現量の変化を伴わず増加し、paclitaxel に対する耐性を増強させることを報告している。第2章では、このとき ERM タンパク質の Msn の発現量が増加し、P-gp を介した薬物耐性に関与することが示唆された。

P-gp と同様に薬物の細胞外排出を担う MRP_s および BCRP もがん細胞における薬物耐性に関与している。しかしながら、P-gp 以外の排出系トランスポーターが EMT によって機能亢進するか否かの詳細は明らかとなっていない。そこで、本章では MRP および BCRP の機能が *Snail* 誘発性の EMT に伴い増強されるかを評価した。

非小細胞肺癌の治療に広く使用されている cisplatin は、MRP₂ の基質であることがよく知られており、MRP₅ もこの薬物に対する耐性に関連している^{20,21}ことから、本試験では抗がん薬として cisplatin を使用し、MRP family の中で MRP₂ および MRP₅ に焦点をあてた。同様に非小細胞肺癌の治療で頻繁に使用される irinotecan の活性代謝物である SN-38 は、主に BCRP によって排出されることが知られている⁵¹⁻⁵³。そこで、SN-38 を用いて BCRP 機能の変化を評価した。これらの試験により、HCC827細胞における *Snail* 誘発の EMT に伴う MRP₂、MRP₅ および BCRP を介した薬物耐性について評価した。

第3章
第2節 結果

3-2-1 HCC827 細胞に *SNAIL1* 遺伝子を導入したときの Multidrug Resistance-Associated Proteins (MRP)2 および MRP5 の発現変動

SNAIL1 遺伝子を導入した HCC827 細胞では、上皮系細胞マーカーである E-cad (*CDH1*) の mRNA 発現量の低下が認められ、間葉系細胞マーカーである VIM の mRNA 発現量の増加が認められた (Figure 3-1 A)。また、MRP2 の mRNA 発現量に低下が認められた。一方、MRP5 の mRNA 発現量に変化は認められなかった。(Figure 3-1 B)。このとき、*SNAIL1* 遺伝子を導入した細胞における homogenate および細胞膜画分における MRP2 のタンパク質発現量は変化しなかった。一方、MRP5 のタンパク質発現量は細胞膜画分で増加が認められ、homogenate では変化しなかった (Figure 3-2)。

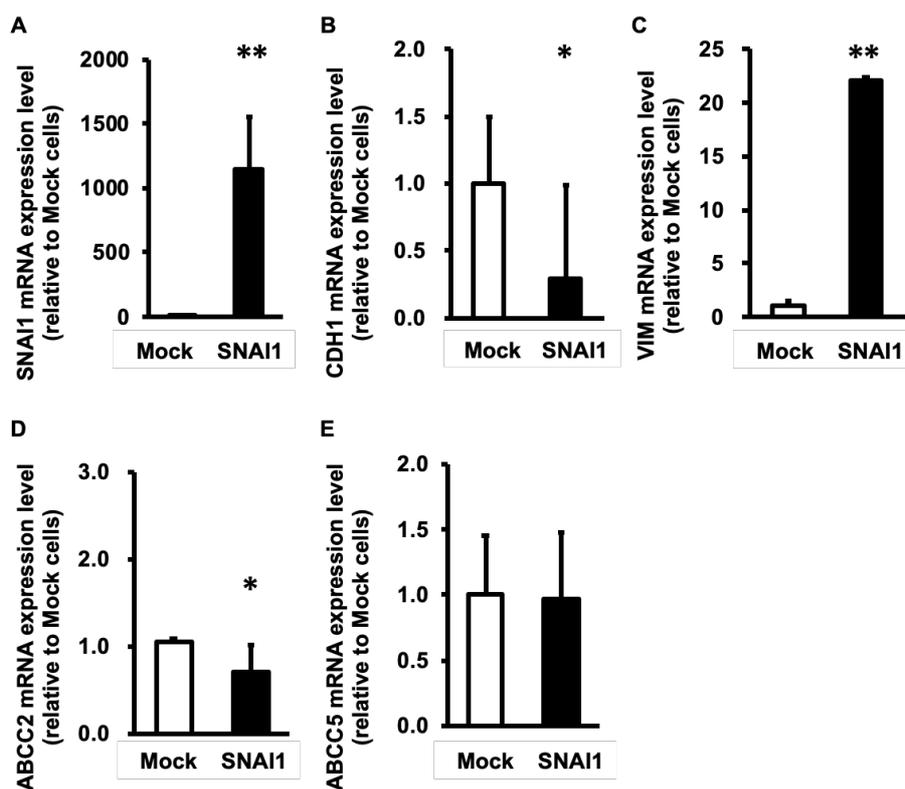


Figure 3-1 mRNA expression of *SNAIL1*, EMT markers, *ABCC2* and *ABCC5* at 2 days after *SNAIL1*-transduction

Open and closed bars show Mock and *SNAIL1*-transduced cells, respectively. mRNA expression levels of (A) *SNAIL1*, the EMT markers (B) *CDH1* and (C) *VIM*, (D) *ABCC2* and (E) *ABCC5* were normalized to *GAPDH*. Results are shown as the mean \pm coefficient of variation (CV) (n = 6-8). Significant difference: *p<0.05, **p<0.01.

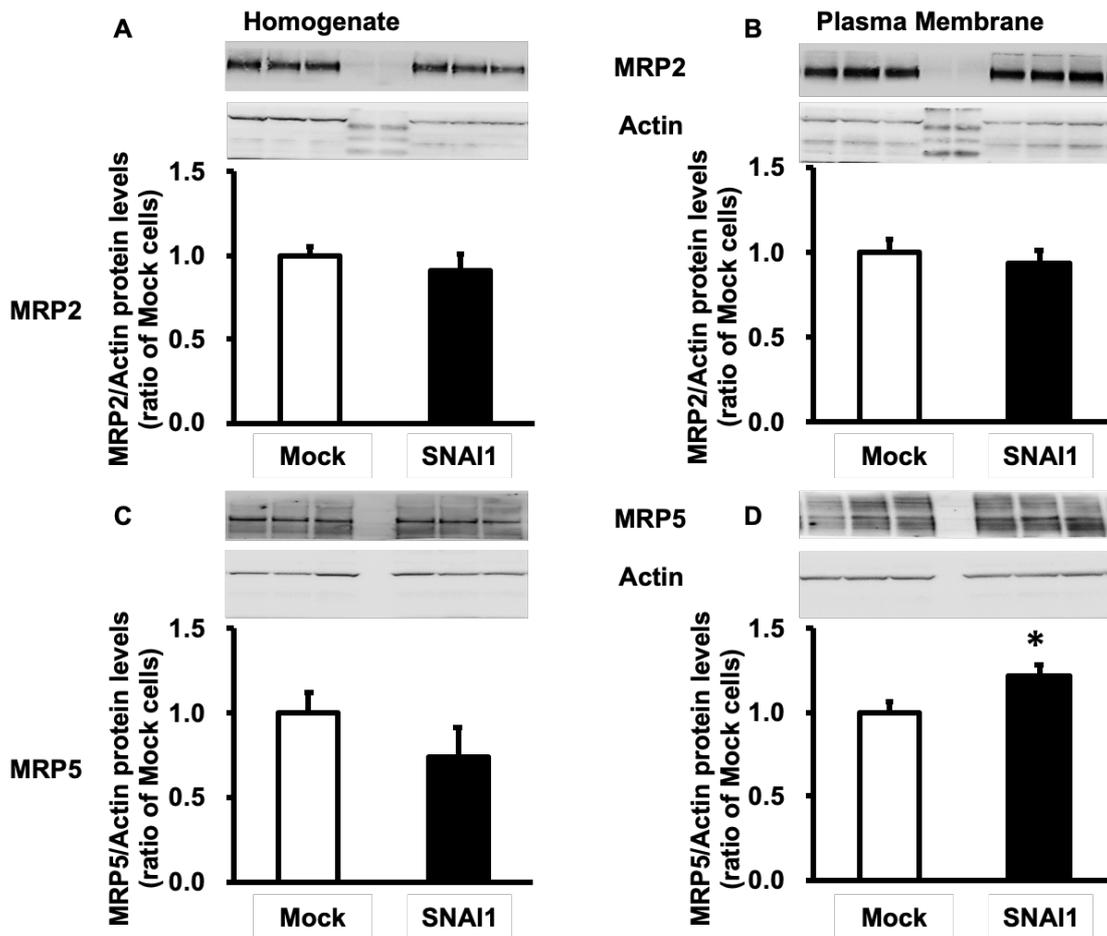


Figure 3-2 Protein expression levels of MRP2 and 5 in whole-cell homogenate and plasma membrane fraction at 2 days after *SNAI1*-transduction

Open and closed bars show Mock and *SNAI1*-transduced cells, respectively. Amounts of (A, B) MRP2 and (C, D) MRP5 in the homogenate and in the plasma membrane fraction were normalized to actin in each fraction. Samples from Mock- and *SNAI1*-transduced cells were loaded in triplicate lanes. Molecular marker was loaded in two lanes between Mock and *SNAI1* for MRP2 and in one lane between Mock and *SNAI1* for MRP5. Results are given as the mean \pm S.E. ($n = 4$). Significant difference: * $p < 0.05$.

3-2-2 HCC827 細胞に *SNAI1* 遺伝子を導入したときの MRP2 および MRP5 の排出能の変化

前項より、*SNAI1* 遺伝子の導入することで HCC827 細胞に EMT が誘導されることが確認された。また、MRP5 について細胞膜発現の増加が確認された。そこで、MRP2、MRP3 および MRP5 の基質となることが知られている 5-Carboxy-2',7'-dichlorofluorescein (CDCF)⁵⁴⁻⁵⁶ の前駆体である 5-Carboxy-2',7'-dichlorofluorescein diacetate (CDCFDA) を曝露し、MRP の活性を評価した。CDCF は細胞内に取り込まれにくいいため、予め細胞内に吸収されやすい diacetate 体を取り込ませ、代謝され生成された CDCF が MRP によって細胞外に排出されることを利用し、取り込み試験をおこなった。CDCF の C/M ratio (細胞内取り込み量) は、Mock 細胞と比較して *SNAI1* 遺伝子を導入した細胞で有意に減少し、efflux 試験における排出率は大幅に増加した。同条件下にて MRP1、MRP2 および 5 を阻害することが知られている MK571 を共に曝露したところ、低下した CDCF の C/M ratio が有意に増加した。また、増加した CDCF の排出率が低下することが確認された (Figure 3-3)

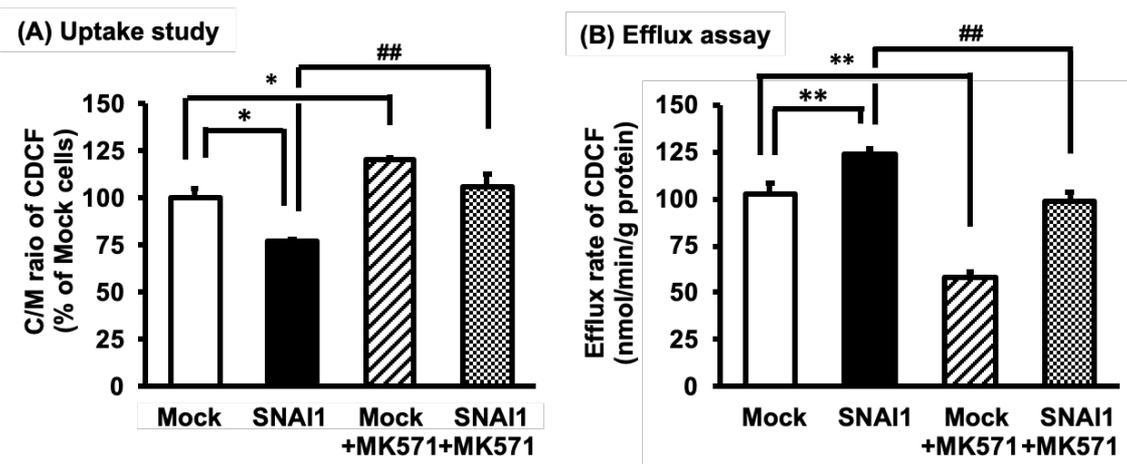


Figure 3-3 Changes of MRP2 and MRP5 transport functions at 2 days after *SNAI1*-transduction

Uptake and efflux of the MRPs substrate CDCF were evaluated at 2 days after transduction. Open and closed bars show Mock and *SNAI1*-transduced cells, respectively. Uptake study and efflux assay were conducted using 5 μ M CDCFDA at 37°C. Cells were preincubated with Opti-MEM containing or not containing 10 μ M MK571 for 30 min. (A) In the uptake study, the C/M ratio of CDCF was determined. Results are shown as the mean \pm S.E. (n = 3) (B) In the efflux assay, cells were treated with CDCFDA for 30 min on ice, then incubated with Opti-MEM containing or not containing 10 μ M MK571 for 2 min at 37°C. Results are shown as the mean \pm S.E. (n = 6). Significant difference: *p<0.05, **p<0.01 compared with Mock cells. ##p<0.01 compared with *SNAI1*-transduced cells.

3-2-3 *SNAIL* 遺伝子を導入した HCC827 細胞における cisplatin に対する感受性の変化

SNAIL 遺伝子を導入した細胞において CDCF の細胞内取り込み量の低下および細胞外排出量の増加が確認された。このとき、MRP の基質となる抗がん薬の cisplatin を用いて薬物耐性が增強されるかを評価した。Cisplatin の曝露により、Mock 細胞と *SNAIL* 遺伝子を導入した細胞の両方において細胞生存率がわずかに 20%程度低下した。一方、*SNAIL* 遺伝子を導入した細胞の生存率は、Mock 細胞の生存率よりも有意に高かった (Figure 3-4)。

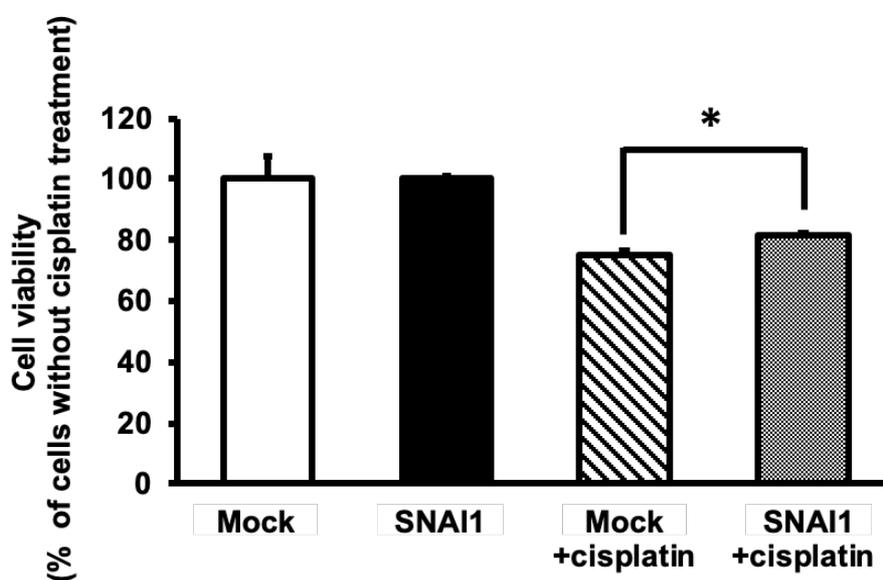


Figure 3-4 Change of cisplatin resistance at 2 days after *SNAIL*-transduction

Cells were treated with 20 μ M cisplatin in Opti-MEM for 72 h. Open and closed bars show Mock and *SNAIL*-transduced cells, respectively. Hatched and dotted bars show Mock and *SNAIL*-transduced cells with cisplatin treatment, respectively. Mock and *SNAIL* groups were normalized to each cell without cisplatin treatment. Results are shown as the mean \pm S.E. (n = 4-6). Significant difference: * $p < 0.05$ compared with Mock+cisplatin cells.

3-2-4 HCC827 細胞に *SNAIL* 遺伝子を導入したときの breast cancer resistance protein (BCRP) の発現変動

これまでの結果から、*Snail* 誘発性の EMT を生じた HCC827 細胞では、P-gp ならびに MRP5 基質薬物の排出量の増加により薬物耐性が増強されることが示された。本項ではさらに BCRP の発現量変化を評価した。

HCC827 細胞に *SNAIL* 遺伝子を導入後 5 日目における、E-cad の mRNA 発現量は有意に減少し、VIM の mRNA 発現量は有意な増加が確認された。また、*SNAIL* 遺伝子を導入した細胞における BCRP の mRNA 発現量は、Mock 細胞よりも有意に低かった (Figure 3-5 A)。さらに、homogenate および細胞膜の BCRP のタンパク質発現量はいずれも *SNAIL* 遺伝子の導入によって有意に減少した (Figure 3-5 B)

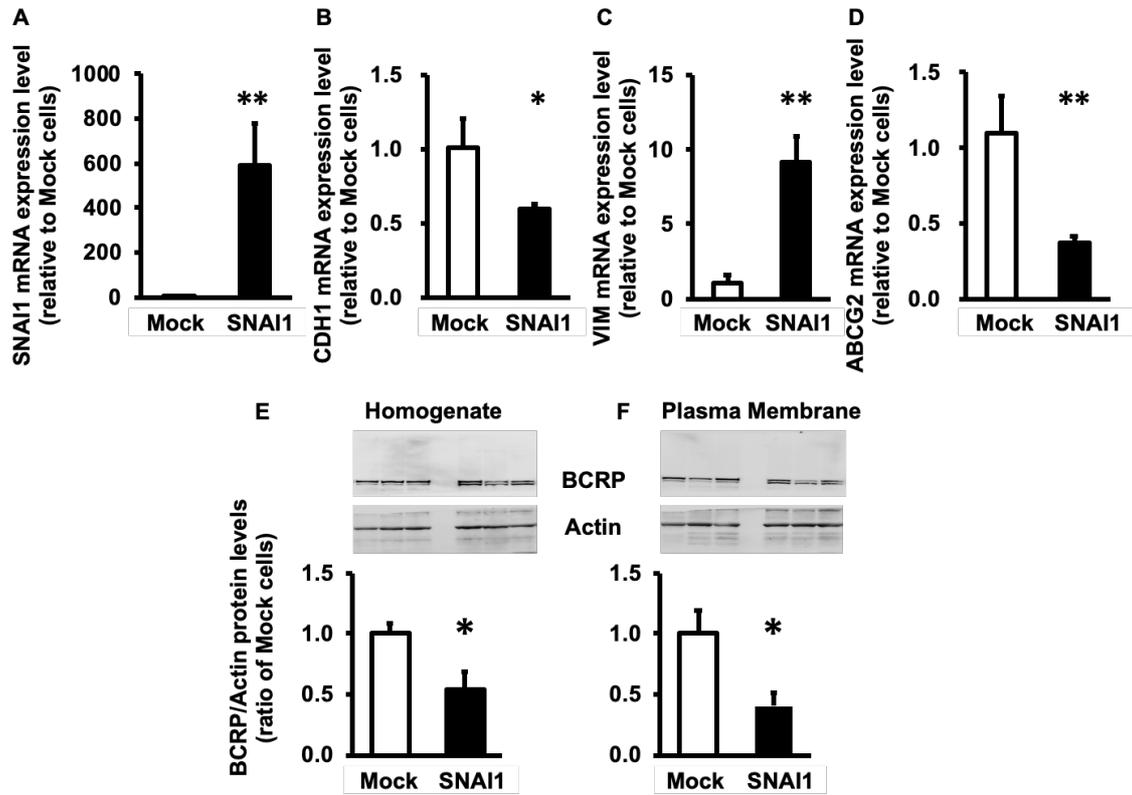


Figure 3-5 Expression of *SNAI1*, EMT markers and *ABCG2* at 5 days after transduction

Open and closed bars show Mock and *SNAI1*-transduced cells, respectively. mRNA expression levels of (A) *SNAI1*, the EMT markers (B) *CDH1* and (C) *VIM*, and (D) *ABCG2* were normalized to *GAPDH*. Results are given as the mean \pm CV (n = 3~4). Amounts of BCRP in the (E) homogenate and (F) the plasma membrane fraction were normalized to actin in each fraction. Results are given as the mean \pm S.E. (n = 3-4). Significant difference: *p<0.05, **p<0.01

3-2-5 *SNAIL* 遺伝子を導入した HCC827 細胞における BCRP の機能と SN-38 に対する細胞の感受性に及ぼす影響

前項より、BCRP について homogenate および細胞膜発現の低下が確認された。この発現量の変化が、BCRP 基質薬物の排出量の変化ならびに薬物耐性を変化させるかについて評価した。初めに SN-38 の細胞内取り込みについて評価したところ、C/M ratio は Mock 細胞と比較して Snail 発現細胞で有意に増加した (Figure 3-6 A)。一方、Snail 発現細胞の生存率は、Mock 細胞の生存率よりも有意に低かった (Figure 3-6 B)。

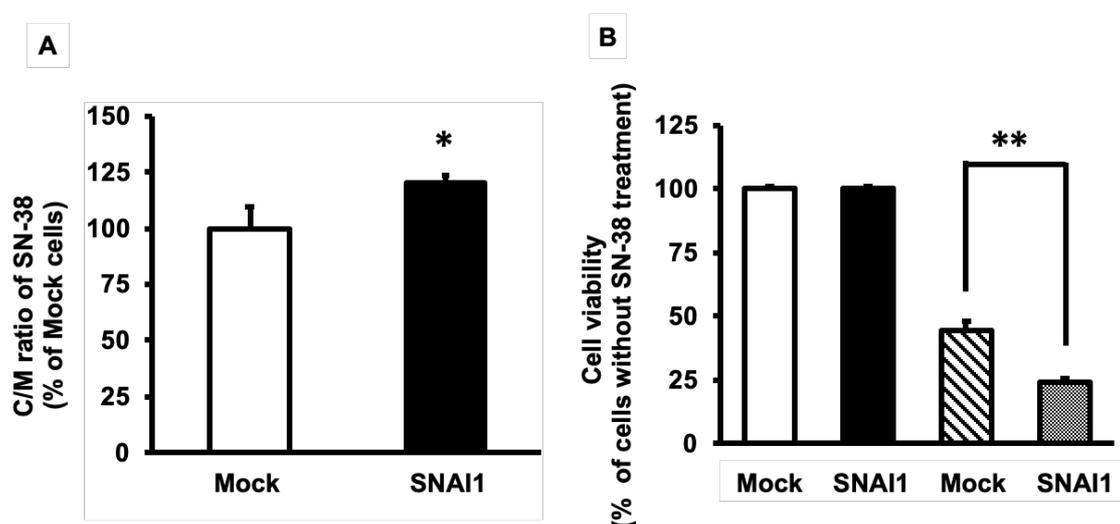


Figure 3-6 Functional change of BCRP at 5 days after *SNAIL*-transduction

Uptake and cell viability were evaluated at 5 days after transduction. Open and closed bars show Mock and *SNAIL*-transduced cells, respectively. (A) Uptake study was conducted to evaluate BCRP transport function using 2 μ M SN-38 at 37°C. After 1 h, C/M ratio of SN-38 was determined. (B) Cells were treated with 1 μ M SN-38 for 48 h. The cytotoxicity of SN-38 was determined. Hatched and dotted bars show Mock and *SNAIL*-transduced cells with SN-38 treatment, respectively. Mock and *SNAIL* groups were normalized to each cell without SN-38 treatment. Results are given as the mean \pm S.E. (n = 3-4). Significant difference: **p < 0.01 compared with Mock+SN-38 cells.

第3節 考察

本章では、HCC827 細胞に *SNAIL* 遺伝子を導入し、2 日および 5 日後に *SNAIL*、VIM および E-cad の mRNA 発現量を測定した (Figure 3-1, 5)。培養期間は MRP と BCRP で各々の機能を評価できる適切な時点を選択したため、異なる日数で評価した。*SNAIL* 遺伝子を導入した細胞では、コントロールの Mock 細胞と比較して *SNAIL* の mRNA 発現量が数百から千倍近くの発現増加が認められたが、EMT マーカーの E-cad や VIM の発現量の増加は、Hien 氏や Amparo 氏らの報告にある変化量と類似している^{13,57)}。さらに、以前の我々の報告で同様の方法により、migration assay にて細胞の転移能が増加していることを確認していることから、*SNAIL* 遺伝子の導入により EMT が誘導されたことが示された^{12,13,46)}。

SNAIL 遺伝子を導入した細胞における MRP の mRNA 発現量は、MRP2 の発現量が大幅に低下し、MRP5 の発現量は変化しなかった (Figure 3-1)。Homogenate 中のタンパク質発現量はいずれも変化は認められなかったが、MRP5 の膜発現量が *SNAIL* 遺伝子を導入した細胞で有意に増加した (Figure 3-2)。これらの結果から、MRP5 がその機能を発揮する細胞膜への移行が増加したことが示唆された。

SNAIL 遺伝子の導入は MRP (MRP 2, 3, 5) の基質である CDCF の C/M ratio を大幅に低下させ、さらに排出率を増加させた (Figure 3-3)。CDCF の輸送は、*SNAIL* 遺伝子の導入により約 20%増加し、この増加は MRP1, 2 および 5 の阻害薬である MK571 によって抑制され、未処理の Mock と同等の値となった。MK571 による CDCF の排出阻害について MRP2 と MRP5 の双方が関与しているという報告ある²⁸⁾。したがって、我々の結果は、MRP2 および/または MRP5 の機能が *SNAIL* 遺伝子の導入によって増強される可能性があることを示している。Cisplatin に対する耐性は、*SNAIL* 遺伝子を導入した細胞が Mock 細胞よりもわずかではあるが有意に大きいことが認められた (Figure 3-4) が、この変化が臨床状況に影響を与えるかどうかを判断するにはさらなる検討が必要となる。

Cisplatin は MRP2 の基質であることがよく知られており、MRP5 を強制発現させた細胞における cisplatin 耐性は、コントロール細胞よりも有意に高いことが報告されている²¹⁾。さらに、肺癌患者の剖検サンプルにおける MRP5 の遺伝子発現は、プラチナ系抗がん薬に曝露された患者において、曝露されていない患者のサンプルよりも高いという報告がある⁵⁸⁾。また、NSCLC 細胞株および NSCLC 臨床サンプルの MRP2 発現量は非常に低い、MRP5 はすべてのサンプルで十分に発現していると報告されている⁵⁹⁾。一方、CDCF の輸送では、これら 2 つの輸送体の輸送活動に大きな違いはないことが示されている⁵⁴⁾。したがって、本試験では、MRP5 は MRP2 よりも CDCF および cisplatin の輸送に寄与していることが考えられた。これらのことから、Snail は MRP5 を介した基質の排出増加により cisplatin 耐性を誘発する可能性があるものと示唆された。今回の結果とこれまでの報告から、MRP2 が細胞膜発現量の増加以外のメカニズムによって活性化された可能性を除外することはできないが、MRP5 の細胞膜発現の増加が cisplatin 耐性の増強の主要な要因である可能性を示唆され

た。

BCRP について mRNA 発現量の変化と共に、homogenate および細胞膜画分でタンパク質発現量が低下することが明らかとなった (Figure 3-5)。また、*SNAIL* 遺伝子を導入した細胞では、BCRP の基質である SN-38 の C/M ratio が、Mock 細胞に比べて大幅に増加した (Figure 3-6)。さらに SN-38 の細胞毒性は *SNAIL* 遺伝子を導入した細胞で強く増強された。つまり、*Snail* 発現細胞の生存率は、SN-38 の存在下で Mock 細胞の生存率よりも有意に低かった (Figure 3-6)。これらの結果から、*Snail* が BCRP の機能を低下させ、それにより基質抗がん薬の細胞内蓄積と感受性を高めることが示唆された。

本章の結果から、*SNAIL* 遺伝子の導入によって誘発された EMT は MRP5 の発現量を増加させることにより、MRP の基質である cisplatin に対する HCC827 細胞の感受性を低下させることが示唆された。対照的に、BCRP については発現量の低下により、基質薬物の SN-38 に対する感受性を増強させた。これらのトランスポーターを介した排出量の違いを引き起こすメカニズムの 1 つは、*Snail* による MRP と BCRP の遺伝子発現の調節である可能性がある。PXR と CAR は MRP2-4 遺伝子発現を誘導し、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体ガンマ (PPAR γ) は BCRP 遺伝子発現を誘導する⁶⁰。さらに、核因子 E2 関連因子 2 (Nrf2) は MRP および BCRP を誘導することが示されている^{61,62}。また、*Snail* は PPAR γ の発現を抑制する⁶³。この報告は、*SNAIL* 遺伝子を導入した細胞における BCRP 発現の低下の結果と一致している。ただし、*Snail* は PXR や CAR などの一部の転写因子を増加させない⁶⁴。また *Snail* が Nrf2 に影響を与えるかどうかについての報告は乏しい。*Snail* が Nrf2 の発現または活性を阻害する場合、MRP ファミリーの発現を低下させる可能性があり得るが、今回の結果はこれを示さなかった。さらに、MRP5 の遺伝子発現メカニズムに関与する要因についてはほとんど知られていない⁶⁵ ため、*Snail* は MRP と BCRP の遺伝子発現を別々に調節していると考えられた。あるいは、*SNAIL* 遺伝子導入後の培養時間の違いが、MRP と BCRP の発現に違いをもたらした可能性がある。ある報告では、*Snail* は MCF-7 細胞において BCRP の発現を増強することが報告されている⁶⁶。一方、他の報告によると TGF- β が MCF-7 において *Snail* の刺激を介して EMT を誘導し、BCRP の発現が低下していることが示されている⁶⁷。さらに、EMT 様の細胞が間葉-上皮移行 (MET) を受けると、BCRP の発現が再び現れることも示されている。これらの報告は、EMT のタイミングによって BCRP の発現が変化することを示唆している。翻訳後修飾に焦点を当てて考察すると、これまでに我々の研究では、いくつかの細胞株における P-gp の機能が、mRNA 発現量だけでなく ERM タンパク質を介した膜局在化によっても調節されることを示してきた^{37,38,68,69}。特に近年、HCC827 細胞の BCRP および P-gp 輸送機能が Ezr および Msn によって調節されることを報告した^{39,70}。さらに、*Snail* 誘発性の EMT を生じた HCC827 細胞において、mRNA の発現量を増加させることなく P-gp 基質薬物の排出量が増加することを示した。また、*Snail* による Msn 発現の増加は、P-gp の機能亢進のメカニズムに関与している⁵⁰。しかし、*Snail* による BCRP 基質の輸送の低下は、Msn の発現の増加と一致していなかった。これは、Msn が大幅に増加

した場合でも、細胞全体の BCRP が大幅に低下したことにより、膜上の BCRP 発現量が低下したためと考えられた。複数の研究者が、Snail は ERM タンパク質の発現を調節することを示している^{48,71,72}。これらの発見はすべて、MRP5 の排出輸送機能が Snail を介した膜局在の変化に依存するが、転写調節には依存しないという考えと一致する。さらに、以前の報告で Rdx は肝臓で MRP の足場として機能するが、PDZK1 は消化管で BCRP の足場として機能することが示されている^{51,68}。したがって、MRP および BCRP の足場として機能する因子は異なり、Snail がこれらの発現量の変化に関与していると考えられた。

第4節 小括

第3章の結果より、以下の知見が得られた。

1. HCC827 細胞に *SNAIL* 遺伝子を導入することで、MRP5 の細胞膜発現が増加することが明らかとなった。
2. MRP5 の細胞膜発現が増加に伴い、HCC827 細胞における CDCF の排出量および cisplatin 耐性が亢進することが確認された。
3. HCC827 細胞に *SNAIL* 遺伝子を導入することで、BCRP の発現量が homogenate および細胞膜発現で減少することが明らかとなった。
4. BCRP の発現量が低下したことに伴い、HCC827 細胞における SN-38 の排出量および耐性が減少することが確認された。

以上から

HCC827 細胞に *SNAIL* 遺伝子を導入することで、以前に報告した P-gp だけでなく MRP5 基質の排出量が増加することにより薬物耐性がさらに亢進されることが示唆され、BCRP は Snail 依存的な排出量の増加は示さないことが確認された。

第4章 ヒト肝芽腫由来細胞株 (HepG2) における *SNAIL* 遺伝子導入による P-gp の発現および変動

第1節 序

第2章では、非小細胞肺癌株 HCC827 細胞における *SNAI* 誘発性の EMT に伴い、ERM タンパク質のうち *Msn* の発現量が増加することで P-gp 基質の細胞外排出量が増加し、薬物耐性が増強されることが示唆された。また第3章では、P-gp だけでなく MRP5 基質の細胞外排出量の増加および細胞内取り込み量の減少が亢進していることが示唆された。

本章では、肺癌と同様に転移症例における生存率が著しく低い肝臓がん⁷³でも *SNAIL* 誘発性の EMT に伴い、P-gp の機能に影響をおよぼすか否かについて検討した。また、その機構について肝臓で P-gp の細胞膜発現を調節している *Rdx* が関与しているかについて検討した。

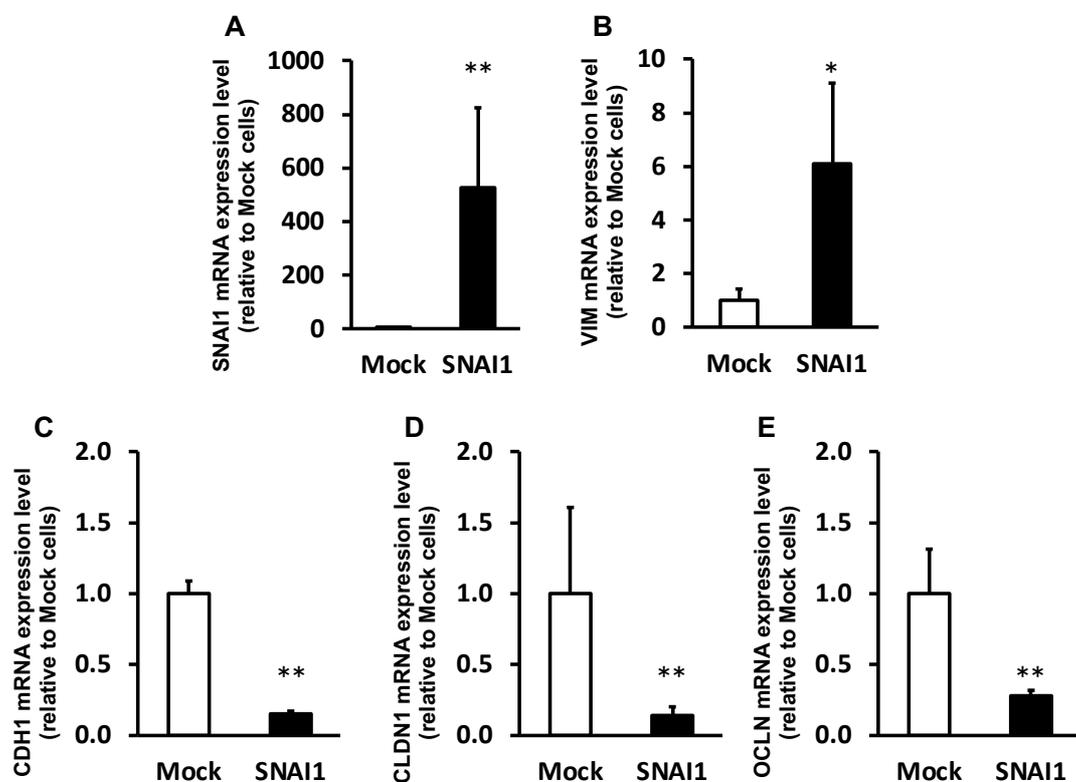
第4章

第2節 結果

4-2-1 HepG2 細胞に *SNAIL* 遺伝子を導入したときの EMT マーカーの発現変動

HCC827 細胞と同様に、HepG2 細胞においても、Snail 誘発性の EMT マーカーの発現量変化が生じるかを確認するため、HepG2 細胞に *SNAIL* 遺伝子を導入し、RT-qPCR により EMT マーカーの発現量を測定した。

SNAIL 遺伝子を導入した細胞では、間葉系細胞マーカーである *VIM* の発現量の増加が認められた (6.09 ± 3.02 -fold) (Figure 4-1 B)。また、上皮系細胞マーカーである E-cad (*CDH1*) (0.15 ± 0.02 -fold)、claudin-1 (*CLDN1*) (0.14 ± 0.06 -fold) および occludin (*OCLN*) (0.28 ± 0.04 -fold) の発現量の低下が認められた (Figures 4-1 C~E)。



2

Figure 4-1 Expression change of EMT-related factors caused by *SNAI1* transduction.

mRNA expression levels of (A) *SNAI1*, (B) *VIM*, (C) *CDH1*, (D) *CLDN1* and (E) *OCLN* in *SNAI1*-transduced cells are shown as mean \pm S.D. (n=3 or 4). Significant differences from Mock cells are indicated *p < 0.05, **p < 0.01.

4-2-2 HepG2 細胞に *SNAIL* 遺伝子を導入したときの P-gp 発現量の変化

SNAIL 遺伝子導入が HepG2 細胞において P-gp の発現量を変化させるか否かを調べるため、P-gp の mRNA とタンパク質の発現量を測定した。Mock 細胞と比較して、*SNAIL* を遺伝子導入した細胞全体で P-gp の mRNA またはタンパク質の発現量に変化は認められなかった (Figure 4-2 A~C)。P-gp は細胞膜でその機能を発揮するため、細胞膜抽出物中の P-gp の発現を測定した。P-gp の細胞膜発現量は、Mock 細胞と比較し *SNAIL* 遺伝子を導入した細胞で高いことが確認された ($170.3 \pm 79.2\%$) (Figure 4-2 D, E)。なお、細胞を膜抽出したサンプルにおいて、細胞膜マーカーである Na^+/K^+ ATPase のバンドが homogenate よりも濃いことから、細胞膜画分が抽出されていることが確認された (Figure 4-2 D)。

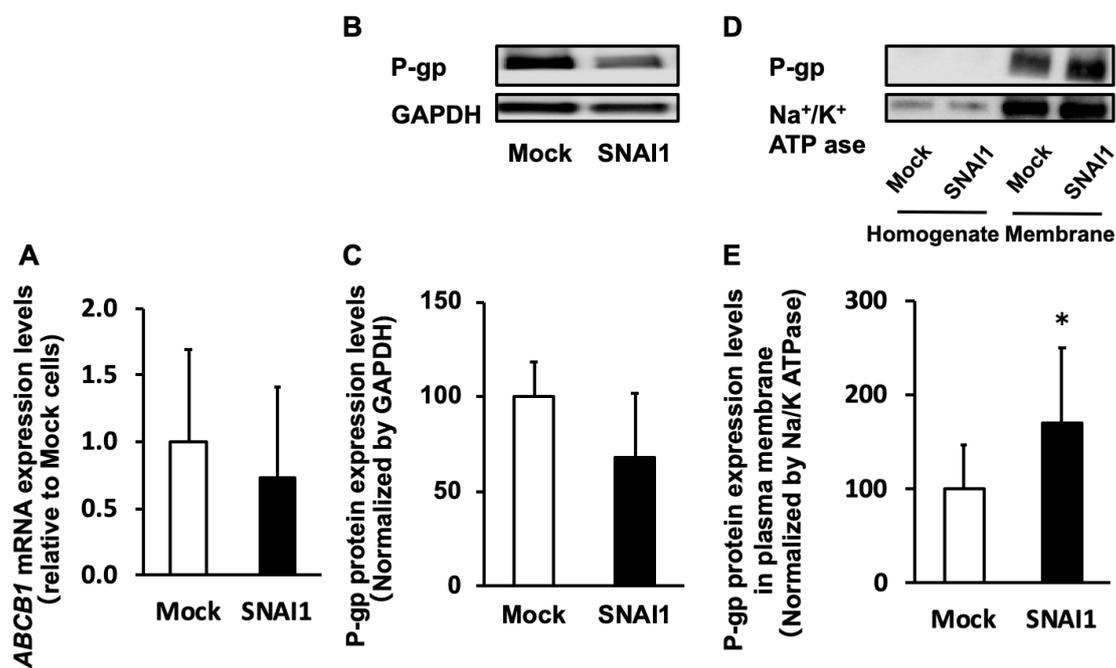


Figure 4-2 Effect of *SNAI1*- transduction on P-gp expression in HepG2 cells. (A) The mRNA expression levels of P-gp in *SNAI1*- transduced and Mock cells are shown as mean \pm S.D. (n = 3 or 4). (B-E) The protein expression levels of P-gp in *SNAI1*- transduced and Mock cells are shown as mean \pm S.D. (n = 3-7). (B) Representative Western blot confirming the presence of P-gp (170 kDa) and GAPDH (37 kDa) in HepG2 whole-cell lysate and (D) P-gp (170 kDa) and Na⁺/K⁺ ATP-ase (113 kDa) in HepG2 plasma membrane fraction. Band densities were determined with a Luminescent Image Analyzer LAS-3000, and P-gp densities were normalized by (C) GAPDH (whole cells) or (E) Na⁺/K⁺ ATP-ase (plasma membrane). Significant difference: *p<0.05.

4-2-3 HepG2 細胞に *SNAIL1* 遺伝子を導入したときの ERM タンパク質の発現量変化

P-gp の細胞膜発現増加に ERM タンパク質が関与するかを確認するため、ERM の発現量を測定した。*SNAIL1* を遺伝子導入した細胞では *Rdx* の発現量は有意に増加したが (1.62 ± 0.31 倍)、*Ezr* と *Msn* の発現量に変化は認められなかった (Figure 4-3)。

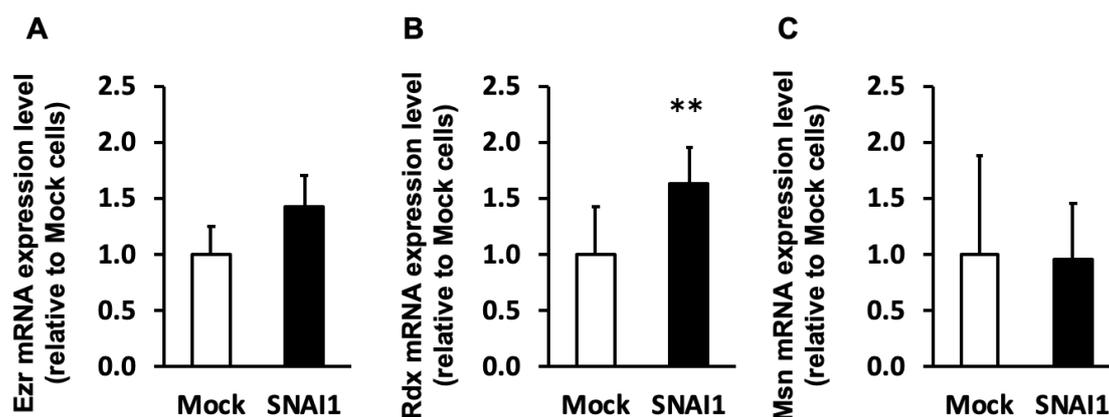


Figure 4-3 Effect of *SNAIL1* on expression levels of *Ezr*, *Rdx*, and *Msn* in HepG2 cells. The mRNA expression levels of (A) *Ezr*, (B) *Rdx*, and (C) *Msn* in *SNAIL1*-transduced and Mock cells are shown as mean \pm S.D. (n = 3 or 4). Significant difference: **p<0.01; other differences were not considered significant. These data were normalized by *GAPDH*.

4-2-4 *SNAI1* 遺伝子を導入した HepG2 細胞における P-gp と Rdx の相互作用

P-gp の細胞膜発現増加に Rdx の発現量の増加が関与するかを調べるため、共免疫沈降法により P-gp に結合している Rdx の量を測定した。*SNAI1* 遺伝子を導入した細胞における P-gp に結合している Rdx は、Mock 細胞と比較して増加していることが確認された。(1.53±0.18 fold) (Figure 4-4)。

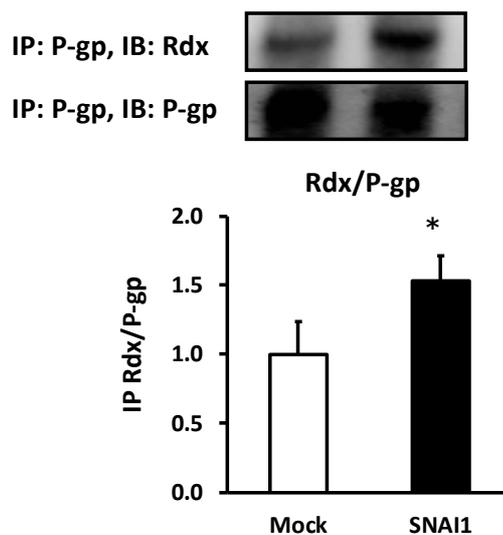


Figure 4-4 Interaction of P-gp and Rdx on the plasma membrane in *SNAI1* transduced cells

The protein expression levels of Rdx which interacted with P-gp on plasma membrane in *SNAI1*-transduced and Mock cells are shown as mean ± S.D. (n = 3 or 4). Significant difference: *p<0.05; These data were normalized by P-gp.

4-2-5 *SNAIL* を遺伝子導入した HepG2 細胞における paclitaxel に対する感受性の変化

SNAIL 遺伝子の導入によって P-gp 機能が增強されるか否かを明らかにすることを目的に、Rho123 および抗がん薬 paclitaxel を用いて取り込み試験をおこなった。まず、P-gp が HepG2 細胞で機能し得るかを判断するために、siRNA 処理による P-gp knockdown 後に Rho123 の取り込みを測定した。Rho123 の取り込みは、P-gp knockdown により増加した (Figure 4-5 A)。さらに、Rho123 の細胞内取り込みは、Mock 細胞と比較して *SNAIL* 遺伝子を導入した細胞で減少した。この取り込み量の減少は、P-gp を阻害する verapamil の併用によって抑制された (Figure 4-5 B)。同様に、*SNAIL* 遺伝子導入による paclitaxel の細胞内取り込みの減少は、verapamil によって抑制された (Figure 4-5 C)。

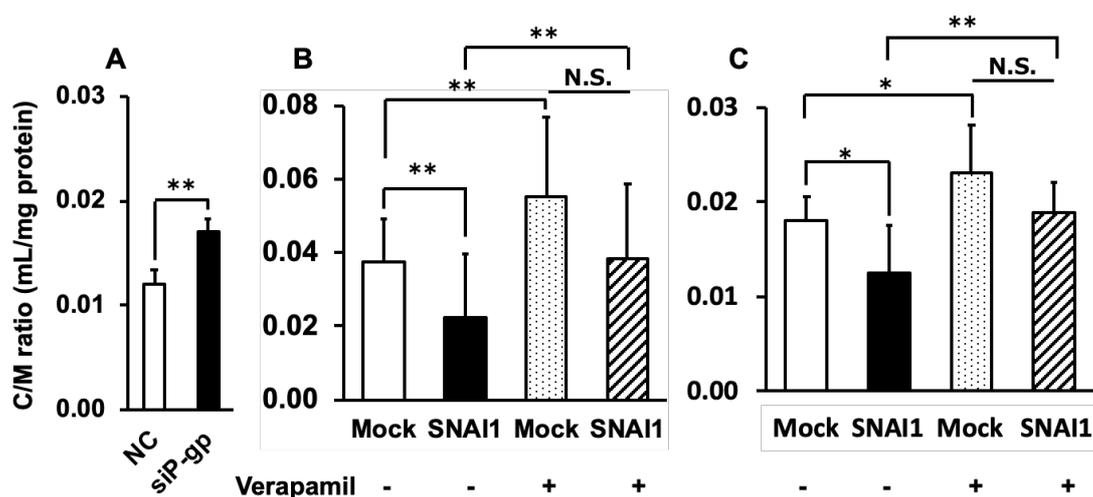


Figure 4-5 Evaluation of P-gp functional changes during *SNAIL*-induced EMT in HepG2 cells. (A) Uptake of P-gp substrates by HepG2 cells treated with P-gp siRNA or (B and C) transduced with *SNAIL*. In uptake assay, (A and B) 10 μ M Rho123 or (C) 10 μ M paclitaxel was loaded into HepG2 cells and the cells were incubated for 30 min at 37°C. The C/M ratio was calculated as described in the text. The data are mean \pm S.D. (n = 4-15). Significant differences from NC or Mock cells are indicated: ** : p < 0.01. NC indicates negative control siRNA treatment.

4-2-6 *SNAI1* を遺伝子導入した細胞の薬物耐性の増強

EMT が誘導された HepG2 細胞における P-gp 基質の排出量の増加により、paclitaxel 耐性が増強されるかを検討するため細胞毒性試験を実施した。Mock および *SNAI1* 遺伝子を導入した細胞の生存率は、paclitaxel 未処理の細胞と比較して、10 μ M paclitaxel の曝露により、それぞれ 74.4 \pm 4.10% および 82.5 \pm 4.31% に減少した。paclitaxel に対する薬物耐性は、Mock 細胞と比較して *SNAI1* 遺伝子を導入した細胞で 1.1 倍増加した。この薬物耐性の増加は、P-gp 阻害剤 elacridar の存在下で抑制され、細胞生存率の低下が確認された (Figure 4-6)。

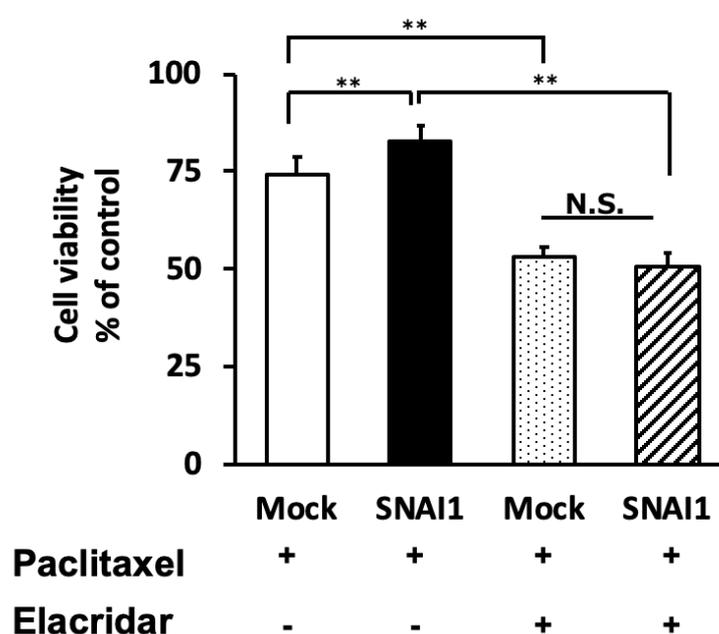


Figure 4-6 Evaluation of drug resistance to paclitaxel during *SNAI1*-induced EMT in HepG2 cells. Mock and *SNAI1*- transduced HepG2 cells were treated with 10 μ M paclitaxel for 4 days and then MTT assay was conducted. Cell viability (%) was calculated, taking survival in the absence of paclitaxel in each group as 100%. The data are mean \pm S.D. (n = 5). Significant difference: ** : p < 0.01.

第3節 考察

SNAIL 遺伝子を導入し EMT を誘導した HepG2 細胞において、*ABCB1* の mRNA の発現に変化は認められなかった (Figure 4-2 A)。Homogenate における P-gp の発現量は Mock 細胞と比較して差が観察されなかったが、細胞膜上の P-gp 発現量は *SNAIL* 遺伝子を導入した細胞で高かった (Figure 4-2 B~E)。そこで ERM の発現量を測定したところ、*SNAIL* 遺伝子導入した HepG2 細胞では ERM タンパク質の中で Rdx のみの発現量が増加することが確認された (Figure 4-3)。

これらの結果は、Snail の発現増加が Rdx の発現量を増加させることにより、P-gp の細胞質膜移行を増加させることを示唆している。増加した Rdx が P-gp の膜発現に関与するかを確認するため、共免疫沈降法により P-gp と Rdx の相互作用を評価した。その結果、*SNAIL* 遺伝子を導入した細胞において、P-gp と相互作用している Rdx は Mock 細胞より多いことが確認された (Figure 4-4)。このことから、*SNAIL* 遺伝子の導入により Rdx の発現増加を介し、P-gp の膜発現が増加することが明らかとなった。P-gp の膜発現の増加が P-gp の機能を亢進し得るかを調べるため P-gp の輸送機能を評価したところ、*SNAIL* を遺伝子導入した細胞では Rho123 の細胞内取り込みが減少し、その減少は P-gp 阻害剤 verapamil によって抑制された (Figure 4-5 B)。Paclitaxel を用いた検討でも同様の結果が得られた (Figure 4-5 C)。したがって、*SNAIL* 遺伝子を導入した細胞は、P-gp 基質の排出量を増加させることが示唆された。また、*SNAIL* を遺伝子導入した HepG2 細胞に paclitaxel を用いて細胞毒性試験をおこなったところ、Mock 細胞よりも高い生存率を示し、この生存率は P-gp 阻害剤 elacridar によって抑制された (Figure 4-6)。

本章の結果から、HepG2 細胞では *SNAIL* 誘発性の EMT に伴い Rdx の発現量および P-gp と Rdx の相互作用を増加させ、P-gp の細胞膜発現を増加させることで、その輸送量および薬物耐性の増加を引き起こすことが考えられた。

第4節 小括

第4章の結果より、以下の知見が得られた。

1. HepG2 細胞に *SNAIL* 遺伝子を導入することで、P-gp の総発現量に変化はなく細胞膜発現が増加した。
2. HepG2 細胞に *SNAIL* 遺伝子を導入することで、ERM タンパク質のうち Rdx の発現量が増加した。また、P-gp と結合している Rdx の量に増加が認められた。
3. P-gp の細胞膜発現の増加に伴い、HepG2 細胞における P-gp の輸送活性および薬物耐性が増加することが確認された。

以上から、HepG2 細胞では *SNAIL* 遺伝子の導入により、Rdx の発現量が増加し P-gp と相互作用が増加することで、P-gp の細胞膜上における発現量が増加することが示唆された。これにより、P-gp の膜発現が増加することで薬物耐性が増強されること考えられた。

第5章 総括

本研究では、がんの転移機構の一つと考えられる EMT を転写調節因子の Snail を用いて誘導した際に、がん細胞の薬物耐性に関わる排出系トランスポーターの輸送量が影響されるか、さらに、その調節機構を解析することを目的に検討をおこなった。第2章の検討により、*SNAIL* 遺伝子を導入した HCC827 細胞では、*Msn* の発現量が増加していることが確認された。さらに増加した *Msn* の発現を抑制することで抗がん薬の paclitaxel に対する耐性が抑制された。このことから、HCC827 細胞では Snail 誘発性の EMT に伴い ERM タンパク質のうち *Msn* が P-gp を介した排泄量の亢進に関与することが考えられた。また、4 種の異なる NSCLC 株における *SNAIL* と ERM の mRNA 発現量に正の相関が認められ、*SNAIL* と P-gp の mRNA 発現量には負の相関が認められた。肺癌患者のがん組織における *SNAIL* と ERM および P-gp の mRNA 発現量に正の相関が認められたが、正常組織では相関が認められなかった。一方、がん組織と正常組織における発現量比（がん組織/正常組織）は *SNAIL* と *Msn* のみの発現に相関が認められた。このことから、Snail は *Msn* の発現増加により関与している可能性が示唆された。また、Snail との関係性は明らかではないが、P-gp は正常組織で発現を測定されず、がん組織で測定されたことから、がん化により発現が増加することが考えられた。実際の臨床においては Snail の発現増加に伴い変化する他の因子が ERM タンパク質および P-gp の発現を増加させる可能性が考えられ、これにより肺癌細胞における薬物耐性をより強くする可能性が考えられた。

第3章では、*SNAIL* 遺伝子を導入した HCC827 細胞において、MRP5 の細胞膜発現および基質薬物の排出量が増加していることが確認された。しかしながら、cisplatin に対する耐性能の増加はわずかであり、これが臨床におけるがん細胞の耐性を亢進させるかについてはさらなる研究が必要である。一方、BCRP については *SNAIL* 遺伝子を導入した HCC827 細胞で細胞膜発現および輸送量が低下していることが認められ、薬物耐性には関与しないことが示唆された。

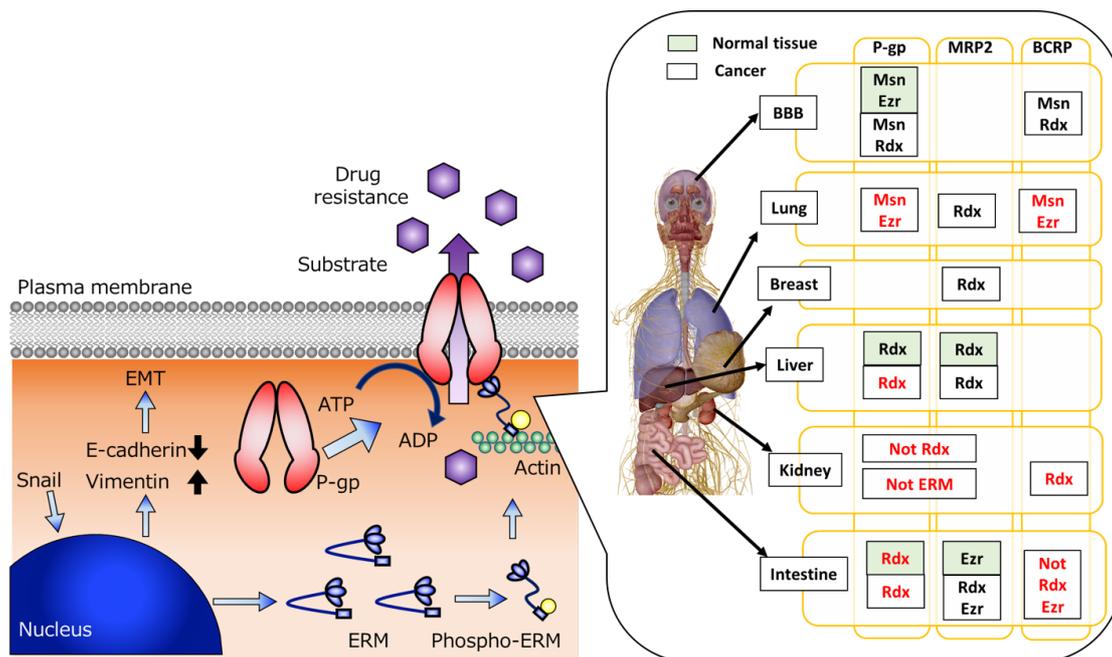
第4章では、HepG2 細胞に *SNAIL* 遺伝子を導入し P-gp を介した排出量の変化が生じるか否かについて評価した。また、その排出量増加に対する ERM の影響を評価し、臓器毎に関与する分子種の違いを解析した。その結果、*SNAIL* 遺伝子を導入した HepG2 細胞では P-gp の総タンパク質量は変化しなかった一方で、細胞膜発現が増加することで細胞の薬物排出能が亢進した。この時、ERM タンパク質のうち、Rdx の発現量に増加が認められた。さらに P-gp と Rdx の相互作用を共免疫沈降法により調べたところ、*SNAIL* 遺伝子導入細胞では、P-gp と結合している Rdx が増加していることが確認された。

当研究室ではこれまでに、P-gp の機能調節に関与する ERM が臓器毎に異なること、および *SNAIL* を高発現させた細胞では P-gp の機能が亢進することを報告している^{37,39,47}。本研究では、Snail 誘発性の EMT に伴い、少なくとも臓器毎に P-gp の機能調節を担っている ERM が増加し、これが薬物耐性の増強に関与することを見いだした。さらに、これまでがん細

胞における排出系トランスポーターを介した薬物耐性は、がん細胞が薬物に曝露されることで、排出系トランスポーターの発現量が多い細胞が生き残ることが契機と考えられてきたが、転移に伴って EMT を誘導する Snail などの転写調節因子が高発現することにより、薬物非依存的に薬物耐性が増強する可能性が示唆された。一方、ERM の中で Ezr や Msn はトランスポーターの機能調節だけでなく、EMT にも関与することが報告されている^{74,75}。Takahashi 氏らはヒト網膜色素上皮細胞において、Msn の活性化が細胞骨格のリモデリングと細胞接着の低下を引き起こすことを報告している⁷⁶。また、ERM 阻害剤は臨床応用に至っていないものの、開発がおこなわれている。例えば、NSC305787 は Ezr および Msn に対する阻害効果が認められており、マウスを用いた *in vivo* の実験で骨肉腫における Ezr 依存性の転移を抑えたことが報告されている⁴⁹。これらのことから、ERM の阻害は排出系トランスポーターを介した薬物耐性だけでなく、EMT を抑制できることが期待される。

これまでに様々な排出系トランスポーターの阻害剤が多剤耐性克服剤として開発が試みられてきたが、いずれも医薬品としては承認されていない。これは、排出系トランスポーターの活性発現は、それ自身の mRNA 量やタンパク量に必ずしも依存せず膜上発現量に依存すること、これらのトランスポーターは正常組織を含む様々な組織に発現しており、副作用が回避されにくいことが主因と考えられる。排出系トランスポーターの膜上発現は、それぞれのトランスポーターが異なる因子によって制御されており、ERM の他に PDZ ファミリー⁵¹ や CD44⁷⁷ などの組織特異的な因子の介在も示唆されている。これらの因子を制御することにより、副作用の少ない組織特異的な多剤耐性に関わるトランスポーター阻害剤の開発に寄与することが期待される。

本研究では EMT を引き起こす主要な因子として Snail に着目して検討をおこなったが、臨床では複数の因子の関与により EMT が引き起こされることが推測される。肺がん患者における mRNA 発現量の結果から、Snail と直接的または間接的に ERM 全ての分子種および P-gp の総発現量が増加していることから、*in vitro* で得られた結果と比較して薬物に対する強い抵抗性を獲得している可能性がある。従って、どの因子ががん細胞の転移や薬物耐性に強く関与しているかについて明らかにするために今後さらなる解明が求められる。



Scheme 1

(左) Snail誘発性EMTを伴う薬物排出系トランスポーターを介した薬物耐性機構
 (右) 各臓器における排出系トランスポーターの機能に関与するERMタンパク質

第6章 実験方法の部

第1節 培養細胞

ヒト NSCLC 細胞株 HCC872 A549、H441 および H1975 ならびにヒト肝芽腫由来細胞株 HepG2 細胞は American Type Culture Collection より購入した。細胞の培養には Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)に fetal bovine serum(FBS)を終濃度 10%、penicilin を終濃度 100 U/mL および streptomycin を終濃度 100 µg/mL となるように加えたものを用いた (DMEM,10%FBS, penicillin-streptomycin)。siRNA を用いた検討の際には、penicilin および streptomycin を添加してない培地を用いた。

第2節 試薬

本研究で用いた主な試薬を以下に示す。塩類などの一般的な試薬については記載を省略した。すべての試薬は特級あるいは生化学用、細胞培養用等級の試薬を用いた。

Rhodamine123	Sigma Aldrich
Elacridar	Santa Cruz Biotechnology
Pacritaxel	Tokyo Chemical Industry
Dulbecco's Modified Eagle's Medium low glucose	Sigma Aldrich
Opti-MEM®	Gibco
Fetal Bovine Serum	Biowest, Biosera
TRIzol™ Reagent	Invitrogen
NucleoSpin® RNA XS	Macherey-Nagel
NucleoSpin® RNA Midi	Macherey-Nagel
ReverTra Ace®	Toyobo
5 × Transcriptor RT 反応 Buffer	Toyobo
Primer random p(dN) ₆	Roche Diagnostics
Power SYBR™ Green PCR Master Mix	Applied Biosystems
Lipofectamine™ RNAiMAX Transfection Reagent	Invitrogen
Ripa Buffer	Wako
cOmplete Mini, EDTA-free	Roche
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma Aldrich
DC™ Protein Assay	BIO-RAD
4-20% Mini-PROTEAN®TGX™ Gels	BIO-RAD

BlueStar PLUS Prestained Protein Marker

NIPPON Genetics

Skim milk

Wako

Clarity™ Western ECL substrate

BIO-RAD

Western blotting に用いた抗体を Table 1 に示した。

Table 1 List of antibodies used for Western blotting

Antibodies	Dilution	Company
C219 Monoclonal Antibody, Purified	1 : 500	COVANCE
Actin (I-19):sc-1616	1 : 1000	Santa Cruz Biotechnology
GAPDH (G-9):sc-365062	1 : 1000	Santa Cruz Biotechnology
Moesin (38/87):sc-58806	1 : 1000	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Radixin/RDX Antibody [EP1862Y]:ab52495	1 : 1000	abcam
Anti Human MRP2(ABCC2) MON9027	1 : 50	MONOSAN
Anti-MRP5 抗体 [M5II-54] (ab24107)	1 : 1000	abcam
Anti-brest cancer resistance protein (B7185)	1 : 100	SIGMA
goat anti-rabbit IgG-HRP:sc-2004	1 : 5000	Santa Cruz Biotechnology
goat anti-mouse IgG-HRP:sc-2005	1 : 2000	Santa Cruz Biotechnology

RT-qPCR に用いた primer は eurofins genomics より購入した。各遺伝子の定量に用いた primer を以下の表に示した(Table 2)。

Table 2 List of oligonucleotides used as gene-specific primers for RT-PCR

Taeget	F/R	primer sequence
ABCB1	Forward	5'-CCCATCATTGCAATAGCAGG-3'
	Reverse	5'-GTTCAAACCTTCTGCTCCTGA-3'
ABCC2	Forward	5'-ATTGCTTCCATTGGGCTCCA-3'
	Reverse	5'-GGCTGGCCACAAAAGACTTG-3'
ABCC5	Forward	5'-GGGAATGCTTTGTGCAGCG-3'
	Reverse	5'-CACATCAGAATTCCTGCGCC-3'
ABCG2	Forward	5'-ACTGGCTTAGACTCAAGCACA-3'
	Reverse	5'-ATAGGCCTCACAGTGATAACCA-3'
CDH1	Forward	5'-CAGCACGTACACAGCCCTAA-3'
	Reverse	5'-ACCTGAGGCTTTGGATTCCT-3'
CLDN1	Forward	5'-TTTACTCCTATGCCGGCGAC-3'
	Reverse	5'-TTGCTTGCAATGTGCTGCTC-3'
EZR	Forward	5'-CACGCTTGTGTCTTTAGTGCTCC-3'
	Reverse	5'-ACTCAGACTTTACAGGCATTTTCC-3'
MSN	Forward	5'-GCCCTGGGTCTCAACATCTA-3'
	Reverse	5'-GACGGCGCATGTATAGTTCA-3'
OCLN	Forward	5'-AATTGGTCACCGAGGGAGGA-3'
	Reverse	5'-GATAAACCAATCTGCTGCGTCC-3'
RDX	Forward	5'-TGCACCTCGTCTGAGAATCA-3'
	Reverse	5'-CTCTAATTGTGCCCTTTCCAAC-3'
SNAI1	Forward	5'-GAAAGGCCTTCAACTGCAA-3'
	Reverse	5'-TGACATCTGAGTGGGTCTGG-3'
VIM	Forward	5'-CGGGAGAAATTGCAGGAGGA-3'
	Reverse	5'-AAGGTCAAGACGTGCCAGAG-3'
GAPDH	Forward	5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3'
	Reverse	5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3'

第3節

統計解析 実験データは平均値±標準偏差または変動係数で示した。有意差検定は2群間の比較には Student's t-test を用い、2群以上の検定については Holm test を用いた。肺癌患者由来の組織を用いた相関解析は、各サンプルを3回ずつ測定し、その平均値を用いて *SNAIL* と各遺伝子間の pearson の積率相関係数(r)を算出し相関を評価した。また肺正常組織および肺癌組織間での遺伝子発現の比較には paired t-test を用いた。各検定における有意水準は5%あるいは1%とし、有意確率 $p < 0.05$ または 0.01 を有意差ありとした。

第4節 実験方法

【Adenovirus vector の調製】

本研究に用いた Mock および *SNAIL* 発現 Ad vector は梶田昌裕 博士(メルクバイオファーマ株式会社)より譲渡して頂いた。Ad vector は HEK293A 細胞中にて増幅させた後、細胞を回収し塩化セシウムを用いた 2 段階の密度勾配遠心法により Ad vector の画分を採取した。採取した画分を Slide-A-Lyzer G2 Dialysis Cassettes(Thermo Fisher Scientific)を用いた透析により濃縮した。濃縮後の Ad vector の virus particle(VPs)は、既存の方法を参考にした吸光度法により算出した。

【各遺伝子の発現解析に用いた NSCLC 細胞株の培養】

4 種類の NSCLC 細胞株を 5×10^4 cell/well で播種し、4 日間培養をおこなった。培養後、TRIzolTM Reagent (Invitrogen)を用いて各細胞から RNA を抽出した。

【HCC827 細胞および HepG2 細胞に対する Ad vector 感染】

HCC827 細胞 および HepG2 細胞を 96、24 および 6 well 培養プレートにそれぞれ 1×10^4 、 5×10^4 、 2.5×10^5 cell/well で播種した。翌日に播種した細胞数に対して 1,000 VPs/cell となるように Ad vector を添加し感染させた。HCC827 細胞は感染後 2, 5, 6 日間、HepG2 細胞は感染後 3 日培養した細胞を RNA 抽出、Western blotting、Rho123 の efflux assay、各種蛍光基質または paclitaxel の取り込み試験および paclitaxel, cisplatin ならびに SN-38 による細胞毒性試験に用いた。

【HepG2 細胞に対する P-gp Knockdown および Ad vector 感染】

HepG2 細胞を 96、24 および 6 well 培養プレートにそれぞれ 1×10^3 、 5×10^4 、または 2.5×10^5 cell/well で播種し、翌日に LipofectamineTM RNAiMAX Transfection Reagent(Invitrogen)と複合体を形成させた 150nM の siP-gp または N.C.を添加した。その後、播種した細胞数に対して 1,000 VPs/cell となるように Ad vector を添加し感染させた。3 日間後の細胞を RNA 抽出、Western blotting、Rho123 の efflux assay および paclitaxel による細胞毒性試験に用いた。

【タンパク定量】

各実験にて得られたサンプルのタンパク質濃度は、BSA を検量線に用いた Lowry 法⁷⁸により定量した。96 well クリアプレートに DCTM ProteinAssay(BIO-RAD)の Reagent A を 25 μ L/well 分注し、各サンプル 5 μ L を加えた。その後 Reagent B を 200 μ L/well 加え、攪拌後室温で 15 分間静置し測定した。測定にはサンライズレインボーを用い、700 nm の波長における吸光度からタンパク質濃度を求めた。

【培養細胞からの RNA の抽出】

Total RNA の抽出は、NucleoSpin® RNA XS(Macherey-Nagel)または TRIzol™ Reagent を用いておこなった。NucleoSpin® RNA XS を用いた抽出はメーカーの推奨プロトコルに従いおこなった。TRIzol™ Reagent を用いた回収は以下の方法よりおこなった。24 well 培養プレートから培地を除去し、300 µL の TRIzol™ Reagent を加え細胞を溶解し全量をチューブに回収した。60 µL の chloroform を加え攪拌し、室温で 3 分間静置した。12,000×g、4°C で 15 分間遠心分離し、上清を新しいチューブに分取した。分取した上清に 150 µL も 2-propanol を添加し攪拌した。室温で 10 分間静置した後、12,000×g、4°C で 10 分間遠心分離した。上清を除去し、300 µL の 75% ethanol を添加し攪拌した後、7,500×g、4°C で 5 分間遠心分離した。上清をデカンタで除去し、再びスピンドウンを行い、上清をピペットで除去した。ペレットを風乾した後、超純水を適量加え溶解し、60°C のヒートブロックで加熱した。抽出したサンプルの RNA 濃度は Nanodrop™ Lite(Thermo Fisher SCIENTIFIC)を用いて測定した。

【培養細胞由来の cDNA の合成】

Complementary deoxyribonucleic acid (cDNA)の合成は REverTra Ace® (TOYOBO)を用いて、上記【培養細胞からの RNA の抽出】で得た Total RNA を鋳型としておこなった。PCR 用 8 連チューブに以下の組成の逆転写溶液を分注し、そこに抽出した Total RNA を 1 µg/tube となるように加えた。さらに全量が 10 µL/tube となるように超純水を加え、T100™ Thermal Cycler で逆転写 PCR をおこなった。逆転写溶液の組成および PCR 条件を以下に示した。

培養細胞逆転写溶液の組成

5×Transcriptor RT 反応 Buffer	2.0 µL/tube
10 mM dNTP	1.0 µL/tube
Primer random p(dN) ₆	0.5 µL/tube
ReverTra Ace®	0.5 µL/tube
Total RNA	1.0 µL/tube
UPDW	
Total	10.0 µL/tube

逆転写PCRの条件

温度	30°C	42°C	99°C	12°C
時間	10分	60分	5分	∞

【RT-qPCRによる mRNA の定量】

mRNA の定量は Power SYBR™ Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)を用いて PCR 用 8 連チューブに反応溶液を調製し、MX3000P™ Multiplex Quantitative PCR System (STRATAGENE)を用いておこなった。各遺伝子の検出には Table 1 に示した RT-qPCR primer を用いた。RT-qPCR の反応液の組成および PCR 条件を以下に示した。

RT-qPCR 反応溶液の組成	
UPDW	3.6 μL/tube
Power SYBR™ Green PCR Master Mix	5.0 μL/tube
10 μM Forward and Reverse Primer mixture	0.4 μL/tube
cDNA	1.0 μL/tube
Total	10.0 μL/tube

RT-qPCR の条件							
温度	95℃	95℃	60℃	72℃	95℃	55℃	95℃
時間	600秒	30秒	15秒	15秒	60秒	30秒	30秒

40 cycle

また、遺伝子の発現量の補正には、ハウスキーピング遺伝子である *GAPDH* を用いた。遺伝子の mRNA 量は、得られた threshold cycle (Ct)値を基に $\Delta\Delta Ct$ 法により相対値として算出した。なお Figures 2-5~8 では、得られた Ct 値を基に、各サンプルの *GAPDH* を 1000 とした際の各種遺伝子の相対発現量を以下の式より算出した。

$$\text{Gene expression (DAPDH = 10000)} = 1000 \times 0.5 - (\text{Ct 値: GAPDH} - \text{Ct 値: 各遺伝子})$$

【Western blotting】

cOmplete Mini, EDTA-free (Roche)を添加した RIPA Buffer (Wako)に培養細胞を溶解し、15,000×g、4°Cで30分間遠心分離し、上清を分取した。30 µg/lane となるように5×sampling buffer(250 mM Tris-HCL pH 6.8, 10% sodium dodecyl sulfate (SDS), 30% glycerol, 5% β-mercaptoethanol, 0.02% bromophenol blue)にてサンプルを希釈し、4-20% Mini-PROTEAN® TGX™ Gels を用いて定電圧 100 V で SDS-PAGE をおこなった。泳動したゲルを polyvinylidene difluoride メンブレン(Millipore)に重ね、ろ紙で挟み、15V の定電圧で90分転写した。転写後のメンブレンを精製水にて洗浄し、その後 phosphate buffered saline containing 0.05%(v/v) Tween20 (PBST)で3回洗浄した。PBST で調製した 5% (w/v) skim milk にメンブレンを浸し、室温で15分間ブロッキングした。再び PBST で洗浄し、PBST で希釈した各一次抗体を4°Cで一晩反応させた。メンブレンを PBST で3回洗浄し、5%(w/v) skim milk でブロッキングした。その後、PBST で洗浄し、二次抗体の抗 rabbit または抗 mouse 抗体を室温で1時間反応させた。PBST で3回洗浄後、Clarity™ Western ECL substrate(BIO-RAD)を用いて各タンパクのバンドを検出した。各タンパクの定量は画像解析ソフト Multi Gauge (FUJI FILM)を用いておこなった。

【Rho123 の排出速度試験】

培養プレートに培養後、各種処理をおこなった細胞を cold phosphate buffered saline (PBS) (-)にて2回洗浄し、Opti-MEM® で希釈した 10 µM の Rho123 を 300 µL 添加し、4°Cで15または30分間静置した。静置後、再び cold PBS (-)を用いて2回洗浄し、各種阻害薬を含むまたは含まない Opti-MEM®を 300 µL 添加した。培養プレートを 37°Cの水浴場に移し、10、30または60分間インキュベートした。インキュベーション終了後、培養プレートを氷上に戻し、cold PBS (-)にて3回洗浄した。なお、各種処理を施した細胞それぞれの初期蓄積量は、Rho123 を氷上で取り込ませた直後の細胞を cold PBS (-)にて3回洗浄し、そこから得られた薬物量より求めた。Rho123 の排出速度は以下の式より算出した。Rho123 濃度の測定については【各薬物の定量法】の頁にて記述した。

$$Rho123 \text{ 排出速度}(\text{nmol}/\text{min}/\text{protein}) = \frac{Rho123 \text{ 初期蓄積量}(\text{nmol}/\text{g protein}) - Rho123 \text{ 残存量}(\text{nmol}/\text{g protein})}{\text{incubation 時間}(\text{min})}$$

【各種排出系トランスポーターの蛍光基質薬物の細胞内取り込み試験】

培養プレートに培養後、各種処理をおこなった細胞を 37°C の Hank's balanced salt solution buffered with 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine-ethanesulfonic acid (pH7.4) (HBSS-HEPES) にて 2 回洗浄後、37°C の HBSS-HEPES を 300 μ L 添加し、37°C の水浴場で 30 分間インキュベートした。HBSS-HEPES を除去し、各種蛍光基質薬物 (10 μ M Rho123:P-gp および 5 μ M CDCFDA:MRPs 基質である CDCF の前駆体) を 300 μ L 添加し、37°C で 60 分間インキュベーションした。インキュベーション後、細胞を cold PBS (-) にて 3 回洗浄した。各基質薬物の定量法については【各薬物の定量法】の頁にて記述した。各薬物の細胞内蓄積量については、cell to medium ratio (C/M ratio) として以下の式より算出した。

$$CM \text{ ratio (mL/mg protein)} = \frac{\text{Intracellular drug concentration } (\mu\text{M}) \times \text{Volume of cell lysate } (\mu\text{L})}{\text{Added drug concentration } (\mu\text{M}) \times \text{Additive amount } (\mu\text{L}) \times \text{Protein concentration (mg/mL)}}$$

【Paclitaxel の細胞内取り込み試験】

上記蛍光基質の細胞内取り込み試験同様に、37°C の HBSS-HEPES にて 2 回洗浄後、10 μ M の Elc を含むまたは含まない HBSS-HEPES を添加し、37°C で 30 分間インキュベートした。その後、Elc を含むまたは含まない 10 μ M paclitaxel/HBSS-HEPES 溶液を添加し、37°C の温浴上で 60 分間インキュベーションした。インキュベーション後、細胞を cold PBS (-) にて 3 回洗浄した。Paclitaxel の定量法については【各薬物の定量法】の頁にて記述した。Paclitaxel の細胞内蓄積量は上記の式に基づき C/M ratio を算出し評価した。

【SNAIL 過剰発現細胞における細胞毒性試験】

培養プレートに培養後、各種処理をおこなった細胞に、各阻害薬を含むまたは含まない 100 nM Paclitaxel, 20 μ M cisplatin および 2 μ M SN-38 を曝露した。3 日後に 10 μ L の MTT を添加し所定の時間インキュベーション後、サンライズレインボーを用いて測定波長 570 nm、参照波長 600 nm の吸光度を測定した。

【各薬物の定量法】

定量に用いた機器とその構成

A) ARVO™ MX (PerkinElmer, Waltham, MA)

B) High performance liquid chromatography (HPLC)-fluorescence system

データ処理装置	: Chromatopac CR7Aplus (Shimadzu)
システムコントローラー	: SCL-10A (Shimadzu)
送液ポンプ	: LC-10AT (Shimadzu)
デガッサー	: DGU-14A (Shimadzu)
サンプルインジェクター	: SIL-10A (Shimadzu)
カラムオープン	: CTO-10AC (Shimadzu)
蛍光検出器	: RF-10A XL (Shimadzu)
カラム	: Mightysil, RP-18 GP Aqua, 4.6×250nm (関東化学)

C) Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)

質量分析器	: API3000triple quadrupole spectrometer (Applied Biosystems)
HPLC	: HP1100system (Agilent)
カラム	: Capcell pak C18 MG II column, 50×2.0mm i.d., 3 µm (資生堂)

各薬物のサンプル処理および測定条件

A) Rho123 および CDCF

検討に用いた細胞を 0.1N NaOH にて溶解し、溶解液を 96 well assay plate (CORNING) に 100 µL ずつ入れ ARVO™ MX にて測定した。測定波長は励起波長：485 nm、蛍光波長は 538 nm で測定をおこなった。

B) Paclitaxel

実験終了後の細胞を、内部標準である 1µM docetaxel を含む 70% methanol で回収し、1,5000 × g、4℃で 10 分間遠心分離した。分離後の上清を分取し、窒素気流下にて蒸発乾固させた。乾固したペレットを LC-MS/MS 測定用の移動相 (0.1% formic acid 含有 acetonitrile を 40:60 の比で混和したもの) に溶解した。溶解後 96 well filter により精製し、LC-MS/MS で測定した。移動相にはサンプル溶解に用いた上記の組成の溶液を用い、流速は 0.1 mL/min とした。LC-MS/MS の測定条件は、electrospray ionization 法の positive モードにより、paclitaxel を 854.4-105.2 m/z、docetaxel を 808.3-526.8 m/z で測定した。

【ヒト臨床組織検体を用いた検討】

本研究では、高崎健康福祉大学（IRB 承認番号#2906）および群馬県立がんセンター（IRB 承認番号#405-29042）の両施設において承認された人を対象とする医学系研究「肺がんにおける転移制御因子と薬物動態制御因子の発現変動連関解析」に基づきヒト組織を用いた検討をおこなった。

患者適格基準

本研究で用いた肺がん患者の組織は、以下の適格基準に該当する患者より得られた組織を用いた。

- A) 抗がん薬未処置の原発性肺がん患者
- B) 群馬県立がんセンターにて肺がんの切除手術を受けた患者
- C) 本試験への参加に関して十分な説明を受け、十分な理解の上、研究協力同意説明書に明記されている本研究の目的および安全性を十分理解し同意を得た者。協力する旨の同意書に署名した者のみを協力者とする。

患者除外基準

以下の除外基準に該当する患者は本研究の対象から除外した。

- A) 医師の判断により対象として不適切と判断された患者

【ヒト組織からの RNA 抽出】

群馬県立がんセンターにて採取された肺がん患者由来の肺がんおよび肺正常組織からの RNA 抽出は、以下の方法により高崎健康福祉大学にておこなった。

得られた組織を適切な大きさに切り分け、BioMasher(Nippi)にてホモジナイズした。ホモジナイズした組織を用いて NucleoSpin® RNAMidi(Macherey-Nagel)により RNA を抽出した。NucleoSpin® RNAMidi による抽出についてはメーカーの推奨プロトコルに従いおこなった。

【ヒト組織由来の cDNA の合成】

cDNA の合成は ReverTra Ace® (TOYOBO)を用いて、上記【ヒト組織からの RNA 抽出】で得た Total RNA を鋳型としておこなった PCR 用 8 連チューブに以下の組成の逆転写溶液を分注し、そこに抽出した Total RNA を 1 µg/tube となるように加えた。さらに全量が 30 µL/tube となるように超純水を加え、T100™ Thermal Cycler で逆転写 PCR をおこなった。各転写溶液の組成は以下に示したとおりである。PCR の条件は、【培養細胞由来の cDNA の合成】と同様の条件によりおこなった。

ヒト組織用逆転写溶液の組成	
5×Transcriptor RT 反応 Buffer	6.0 μL/tube
10 mM dNTP	3.0 μL/tube
Primer random p(dN) ₆	1.5 μL/tube
ReverTra Ace [®]	1.5 μL/tube
Total RNA	1.0 μL/tube
UPDW	
Total	30.0 μL/tube

【ヒト組織における各遺伝子発現量の解析】

遺伝子発現量の解析については、【ヒト組織由来の cDNA の合成】の方法に基づいて合成した cDNA を用いて、RT-qPCR 法により定量した。RT-qPCR 法については【RT-qPCR による mRNA の定量】の項と同様の方法でおこなった。得られた Ct 値を元に各サンプルの *GAPDH* を 1000 としたときの相対発現量を算出した。

参考文献

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394-424. doi:10.3322/caac.21492
2. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer.* 2015;136(5):E359–E386. doi:10.1002/ijc.29210
3. Dela Cruz CS, Tanoue LT, Matthay RA. Lung Cancer: Epidemiology, Etiology, and Prevention. *Clin Chest Med.* 2011. doi:10.1016/j.ccm.
4. Yousefi M, Bahrami T, Salmaninejad A, Nosrati R, Ghaffari P, Ghaffari SH. Lung cancer-associated brain metastasis: Molecular mechanisms and therapeutic options. *Cell Oncol.* 2017. doi:10.1007/s13402-017-0345-5
5. Gavrilocic IT, Posner JB. Brain metastases: Epidemiology and pathophysiology. *J Neurooncol.* 2005. doi:10.1007/s11060-004-8093-6
6. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2015. doi:10.3322/caac.21262
7. Toschi L, Rossi S, Finocchiaro G, Santoro A. Non-small cell lung cancer treatment (r)evolution: Ten years of advances and more to come. *Ecancermedalscience.* 2017. doi:10.3332/ecancer.
8. Abou-Alfa GK, Schwartz L, Ricci S, et al. Phase II study of sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol.* 2006. doi:10.1200/JCO.
9. Lim J, Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions: Insights from development. *Dev.* 2012. doi:10.1242/dev.071209
10. Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006. doi:10.1038/nrm1835
11. Nieto MA, Huang RYYJ, Jackson RAA, Thiery JPP. EMT: 2016. *Cell.* 2016. doi:10.1016/j.cell.
12. Puisieux A, Brabletz T, Caramel J. Oncogenic roles of EMT-inducing transcription factors. *Nat Cell Biol.* 2014. doi:10.1038/ncb2976
13. Cano A, Pérez-Moreno MA, Rodrigo I, et al. The transcription factor Snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol.* 2000. doi:10.1038/35000025
14. Battle E, Sancho E, Francí C, et al. The transcription factor Snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol.* 2000;2(2):84-89. doi:10.1038/35000034
15. Zheng X, Carstens JL, Kim J, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer. *Nature.* 2015. doi:10.1038/nature16064
16. Meidhof S, Brabletz S, Lehmann W, et al. ZEB 1-associated drug resistance in cancer cells is

- reversed by the class I HDAC inhibitor mocetinostat . *EMBO Mol Med.* 2015. doi:10.15252/emmm.
17. Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *BBA - Biomembr.* 1976. doi:10.1016/0005-2736(76)90160-7
 18. Nagashima S, Soda H, Oka M, et al. BCRP/ABCG2 levels account for the resistance to topoisomerase I inhibitors and reversal effects by gefitinib in non-small cell lung cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2006. doi:10.1007/s00280-006-0212-y
 19. Chuman Y, Sumizawa T, Takebayashi Y, et al. Expression of the multidrug-resistance-associated protein (MRP) gene in human colorectal, gastric and non-small-cell lung carcinomas. *Int J Cancer.* 1996;66(2):274-279. doi:10.1002/(SICI)1097-0215
 20. Materna V, Holm PS, Dietel M, Lage H. Kinetic characterization of ribozymes directed against the cisplatin resistance-associated ABC transporter cMOAT/MRP2/ABCC2. *Cancer Gene Ther.* 2001. doi:10.1038/sj.cgt.7700293
 21. Pratt S. The multidrug resistance protein 5 (ABCC5) confers resistance to 5-fluorouracil and transports its monophosphorylated metabolites. *Mol Cancer Ther.* 2005;4(5):855-863. doi:10.1158/1535-7163.MCT-04-0291
 22. Kim RB. Drugs as P-glycoprotein substrates, inhibitors, and inducers. *Drug Metab Rev.* 2002. doi:10.1081/DMR-120001389
 23. Zhou SF. Structure, function and regulation of P-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition. *Xenobiotica.* 2008. doi:10.1080/00498250701867889
 24. Sharom FJ. The P-glycoprotein multidrug transporter. Sharom FJ, ed. *Essays Biochem.* 2011;50:161-178. doi:10.1042/bse0500161
 25. Tomono T, Otsuka K, Yano K, Kanagawa M, Arakawa H, Ogihara T. Recommended daily dose of sesame lignans has no influence on oral absorption of P-glycoprotein substrates in rats. *Biol Pharm Bull.* 2015. doi:10.1248/bpb.b15-00392
 26. Saeki T, Nomizu T, Toi M, et al. Dofequidar fumarate (MS-209) in combination with cyclophosphamide, doxorubicin, and fluorouracil for patients with advanced or recurrent breast cancer. *J Clin Oncol.* 2007. doi:10.1200/JCO.
 27. Allen JD, Brinkhuis RF, Van Deemter L, Wijnholds J, Schinkel AH. Extensive contribution of the multidrug transporters P-glycoprotein and Mrp1 to basal drug resistance. *Cancer Res.* 2000.
 28. Katayama R, Sakashita T, Yanagitani N, et al. P-glycoprotein Mediates Ceritinib Resistance in Anaplastic Lymphoma Kinase-rearranged Non-small Cell Lung Cancer. *EBioMedicine.* 2016. doi:10.1016/j.ebiom.
 29. Ponuwei GA. A glimpse of the ERM proteins. *J Biomed Sci.* 2016. doi:10.1186/s12929-016-0246-3
 30. Kobori T, Fujiwara S, Miyagi K, et al. Involvement of moesin in the development of morphine

- analgesic tolerance through P-glycoprotein at the blood-brain barrier. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2014. doi:10.2133/dmpk.DMPK-14-RG-042
31. Fromm MF. Importance of P-glycoprotein for drug disposition in humans. *Eur J Clin Invest.* 2003;33:6-9. doi:10.1046/j.1365-2362.33.s2.4.x
 32. Lin JH, Yamazaki M. Role of P-glycoprotein in pharmacokinetics: Clinical implications. *Clin Pharmacokinet.* 2003. doi:10.2165/00003088-200342010-00003
 33. Nakano T, Sekine S, Ito K, Horie T. Ezrin regulates the expression of Mrp2/Abcc2 and Mdr1/Abcb1 along the rat small intestinal tract. *Am J Physiol Liver Physiol.* 2013;305(11):G807-G817. doi:10.1152/ajpgi.00187.
 34. Hayashi H, Tamura A, Krishnan D, et al. Ezrin Is Required for the Functional Regulation of the Epithelial Sodium Proton Exchanger, NHE3. *PLoS One.* 2013. doi:10.1371/journal.pone.0055623
 35. Kobori T, Harada S, Nakamoto K, Tokuyama S. Role of Scaffold Proteins in Functional Alteration of Small Intestinal P-glycoprotein by Anti-cancer Drugs. *YAKUGAKU ZASSHI.* 2015;135(5):687-695. doi:10.1248/yakushi.14-00234-1
 36. Kawase A. Alterations in expression and function of ABC transporters and ERM proteins in inflammation. *Yakugaku Zasshi.* 2014. doi:10.1248/yakushi.14-00160
 37. Yano K, Tomono T, Sakai R, et al. Contribution of radixin to P-glycoprotein expression and transport activity in mouse small intestine in vivo. *J Pharm Sci.* 2013. doi:10.1002/jps.23637
 38. Yano K, Otsuka K, Kato Y, et al. Different regulation of P-glycoprotein function between Caco-2 and Caki-1 cells by ezrin, radixin and moesin proteins. *J Pharm Pharmacol.* 2016. doi:10.1111/jphp.12525
 39. Yano K, Okabe C, Fujii K, Kato Y, Ogihara T. Regulation of breast cancer resistance protein and P-glycoprotein by ezrin, radixin and moesin in lung, intestinal and renal cancer cell lines. *J Pharm Pharmacol.* 2020. doi:10.1111/jphp.13225
 40. Saitoh M. Epithelial-mesenchymal transition is regulated at post-transcriptional levels by transforming growth factor- β signaling during tumor progression. *Cancer Sci.* 2015. doi:10.1111/cas.12630
 41. Nieto MA, Sargent MG, Wilkinson DG, Cooke J. Control of cell behavior during vertebrate development by Slug, a zinc finger gene. *Science (80-).* 1994. doi:10.1126/science.7513443
 42. Hsu DSS, Wang HJ, Tai SK, et al. Acetylation of snail modulates the cytokinome of cancer cells to enhance the recruitment of macrophages. *Cancer Cell.* 2014. doi:10.1016/j.ccell.2014.09.002
 43. Hsu DSS, Lan HY, Huang CH, et al. Regulation of excision repair cross-complementation group 1 by snail contributes to cisplatin resistance in head and neck cancer. *Clin Cancer Res.* 2010. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-0593
 44. Hwang W, Yang M, Tsai M, et al. SNAIL regulates interleukin-8 expression, stem celllike activity, and tumorigenicity of human colorectal carcinoma cells. *Gastroenterology.* 2011.

- doi:10.1053/j.gastro.2011.04.008
45. Stanisavljevic J, Porta-de-la-Riva M, Battle R, de Herreros AG, Baulida J. The p65 subunit of NF- κ B and PARP1 assist Snail1 in activating fibronectin transcription. *J Cell Sci.* 2011. doi:10.1242/jcs.078824
 46. Tomono T, Machida T, Kamioka H, Shibasaki Y, Yano K, Ogihara T. Entinostat reverses P-glycoprotein activation in snail-overexpressing adenocarcinoma HCC827 cells. *PLoS One.* 2018;13(7):1-14. doi:10.1371/journal.pone.0200015
 47. Tomono T, Yano K, Ogihara T. Snail-Induced Epithelial-to-Mesenchymal Transition Enhances P-gp-Mediated Multidrug Resistance in HCC827 Cells. *J Pharm Sci.* 2017;106(9):2642-2649. doi:10.1016/j.xphs.2017.03.011
 48. Li YY, Zhou CX, Gao Y. Snail regulates the motility of oral cancer cells via RhoA/Cdc42/p-ERM pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014. doi:10.1016/j.bbrc.2014.08.110
 49. Skrzypek K, Kot M, Konieczny P, et al. SNAIL promotes metastatic behavior of rhabdomyosarcoma by increasing EZRIN and AKT expression and regulating microRNA networks. *Cancers (Basel).* 2020. doi:10.3390/cancers12071870
 50. Kamioka H, Tomono T, Fujita A, et al. Moesin-Mediated P-Glycoprotein Activation During Snail-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition in Lung Cancer Cells. *J Pharm Sci.* 2020;109(7):2302-2308. doi:10.1016/j.xphs.2020.03.008
 51. Shimizu T, Sugiura T, Wakayama T, et al. PDZK1 regulates breast cancer resistance protein in small intestine. *Drug Metab Dispos.* 2011. doi:10.1124/dmd.111.040295
 52. Nakatomi K, Yoshikawa M, Oka M, et al. Transport of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38) by breast cancer resistance protein ABCG2 in human lung cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001. doi:10.1006/bbrc.2001.5850
 53. Kawabata S, Oka M, Shiozawa K, et al. Breast cancer resistance protein directly confers SN-38 resistance of lung cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001. doi:10.1006/bbrc.2001.4267
 54. Pratt S, Chen V, Perry WI, Starling JJ, Dantzig AH. Kinetic validation of the use of carboxydichlorofluorescein as a drug surrogate for MRP5-mediated transport. *Eur J Pharm Sci.* 2006. doi:10.1016/j.ejps.2005.09.012
 55. Zamek-Gliszczyński MJ, Xiong H, Patel NJ, Turncliff RZ, Pollack GM, Brouwer KLR. Pharmacokinetics of 5 (and 6)-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein and its diacetate promoiety in the liver. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003. doi:10.1124/jpet.102.044107
 56. Mannermaa E, Vellonen KS, Ryhänen T, et al. Efflux protein expression in human retinal pigment epithelium cell lines. *Pharm Res.* 2009. doi:10.1007/s11095-009-9890-6
 57. Dang H, Ding W, Emerson D, Rountree CB. Snail1 induces epithelial-to-mesenchymal transition

- and tumor initiating stem cell characteristics. *BMC Cancer*. 2011. doi:10.1186/1471-2407-11-396
58. Oguri T, Isobe T, Suzuki T, et al. Increased expression of the MRP5 gene is associated with exposure to platinum drugs in lung cancer. *Int J Cancer*. 2000. doi:10.1002/(SICI)1097-0215(20000401)86:1<95::AID-IJC15>3.0.CO;2-G
 59. Young LC, Campling BG, Voskoglou-Nomikos T, Cole SPC, Deeley RG, Gerlach JH. Expression of multidrug resistance protein-related genes in lung cancer: Correlation with drug response. *Clin Cancer Res*. 1999.
 60. Shugarts S, Benet LZ. The role of transporters in the pharmacokinetics of orally administered drugs. *Pharm Res*. 2009. doi:10.1007/s11095-009-9924-0
 61. Maher JM, Cheng X, Slitt AL, Dieter MZ, Klaassen CD. Induction of the multidrug resistance-associated protein family of transporters by chemical activators of receptor-mediated pathways in mouse liver. *Drug Metab Dispos*. 2005. doi:10.1124/dmd.105.003798
 62. Jigorel E, Le Vee M, Boursier-Neyret C, Parmentier Y, Fardel O. Differential Regulation of Sinusoidal and Canalicular Hepatic Drug Transporter Expression by Xenobiotics Activating Drug-Sensing Receptors in Primary Human Hepatocytes. *Drug Metab Dispos*. 2006;34(10):1756-1763. doi:10.1124/dmd.106.010033
 63. Lee YH, Kim SH, Lee YJ, et al. Transcription factor Snail is a novel regulator of adipocyte differentiation via inhibiting the expression of peroxisome proliferator- activated receptor γ . *Cell Mol Life Sci*. 2013. doi:10.1007/s00018-013-1363-8
 64. Wang H, Li JM, Wei W, et al. Regulation of ATP-binding cassette subfamily B member 1 by Snail contributes to chemoresistance in colorectal cancer. *Cancer Sci*. 2020. doi:10.1111/cas.14253
 65. Gu X, Manautou JE. Regulation of hepatic ABC transporters by xenobiotics and in disease states. *Drug Metab Rev*. 2010. doi:10.3109/03602531003654915
 66. Chen WJ, Wang H, Tang Y, Liu CL, Li HL, Li WT. Multidrug resistance in breast cancer cells during epithelial-mesenchymal transition is modulated by breast cancer resistant protein. *Chin J Cancer*. 2010. doi:10.5732/cjc.009.10447
 67. Yin L, Castagnino P, Assoian RK. ABCG2 expression and side population abundance regulated by a transforming growth factor β -directed epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res*. 2008. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-2545
 68. Kano T, Wada S, Morimoto K, Kato Y, Ogihara T. Effect of Knockdown of Ezrin, Radixin, and Moesin on P-Glycoprotein Function in HepG2 Cells. *J Pharm Sci*. 2011;100(12):5308-5314. doi:10.1002/jps.22718
 69. Yano K, Shimizu S, Tomono T, Ogihara T. Gastrointestinal Hormone Cholecystokinin Increases P-Glycoprotein Membrane Localization and Transport Activity in Caco-2 Cells. *J Pharm Sci*. 2017. doi:10.1016/j.xphs.2017.04.003

70. Yano K, Tomono T, Ogihara T. Advances in Studies of P-Glycoprotein and Its Expression Regulators. *Biol Pharm Bull*. 2018. doi:10.1248/bpb.b17-00725
71. LAN M, KOJIMA T, MURATA M, et al. Phosphorylation of ezrin enhances microvillus length via a p38 MAP-kinase pathway in an immortalized mouse hepatic cell line. *Exp Cell Res*. 2006;312(2):111-120. doi:10.1016/j.yexcr.2005.09.018
72. Wang CC, Liao JY, Lu YS, Chen JW, Yao YT, Lien HC. Differential expression of moesin in breast cancers and its implication in epithelial-mesenchymal transition. *Histopathology*. 2012. doi:10.1111/j.1365-2559.2012.04204.x
73. Hori M, Matsuda T, Shibata A, Katanoda K, Sobue T, Nishimoto H. Cancer incidence and incidence rates in Japan in 2009: A study of 32 population-based cancer registries for the Monitoring of Cancer Incidence in Japan (MCIJ) project. *Jpn J Clin Oncol*. 2015. doi:10.1093/jjco/hyv088
74. Chen MJ, Gao XJ, Xu LN, Liu TF, Liu XH, Liu LX. Ezrin is required for epithelial-mesenchymal transition induced by TGF- β 1 in A549 cells. *Int J Oncol*. 2014. doi:10.3892/ijo.2014.2554
75. Kong J, Di C, Piao J, et al. Ezrin contributes to cervical cancer progression through induction of epithelial-mesenchymal transition. *Oncotarget*. 2016. doi:10.18632/oncotarget.7779
76. Takahashi E, Nagano O, Ishimoto T, et al. Tumor necrosis factor- α regulates transforming growth factor- β -dependent epithelial-mesenchymal transition by promoting hyaluronan-CD44-moesin interaction. *J Biol Chem*. 2010. doi:10.1074/jbc.M109.056523
77. Ravindranath AK, Kaur S, Wernyj RP, et al. CD44 promotes multi-drug resistance by protecting P-glycoprotein from FBXO21-mediated ubiquitination. *Oncotarget*. 2015. doi:10.18632/oncotarget.4763
78. LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951. doi:10.1016/s0021-9258(19)52451-6

主論文目録

1. Kamioka H, Tomono T, Fujita A, Onozato R, Iijima M, Tsuchida S, Arai T, Fujita Y, Zhang X, Yano K, Ogihara T. Moesin-Mediated P-Glycoprotein Activation During *SNAIL*-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition in Lung Cancer Cells. *J Pharm Sci.* 2020 Jul;109(7):2302-2308.

以上全て査読あり

副論文目録

1. Ogihara, T.; Mizoi, K.; Kamioka, H.; Yano, K. Physiological Roles of ERM Proteins and Transcriptional Regulators in Supporting Membrane Expression of Efflux Transporters as Factors of Drug Resistance in Cancer. *Cancers* 2020;12:3352.
2. Yano K, Todokoro I, Kamioka H, Tomono T, Ogihara T. Functional Alterations of Multidrug Resistance-Associated Proteins 2 and 5, and Breast Cancer Resistance Protein upon Snail-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition in HCC827 cells. *Biol Pharm Bull.* 2021;44(1):103-111.

以上全て査読あり

謝辞

本研究を推進するにあたり、終始御懇篤なる御指導御鞭撻を賜りました高崎健康福祉大学大学院薬学研究科臨床薬物動態学分野 荻原 琢男 教授に心より御礼申し上げます。

本研究の審査ならびに、本研究に対する適切かつ有力なご助言を賜りました高崎健康福祉大学大学院薬学研究科 中西 猛夫 教授、常岡 誠 教授、中道 範隆 教授に深く御礼申し上げます。

本研究をおこなうにあたり、多くの御助言、御指導ならびに御討論を賜りました横浜薬科大学薬科学科 薬物動態学研究室 矢野 健太郎 講師、摂南大学薬学部薬学科 薬物送達学研究室 伴野 拓巳 特任助教、高崎健康福祉大学薬学部薬学科 生物薬剤学研究室 溝井 健太 助手に心より感謝申し上げます。

本研究における肺がん患者由来の組織サンプルの採取およびご提供にご尽力頂いた群馬県立がんセンター呼吸器外科 藤田 敦 部長、呼吸器外科 小野里 良一 部長、臨床病理検査部 飯島 美砂 部長、病理検査課 土田 秀 主幹、薬剤部 藤田 行代志 主幹、薬剤部 新井 隆広 主任に厚く感謝の意を表します。

本研究は日本薬学会長井記念薬学研究奨励金 (Nagai Memorial Research Scholarship from the Pharmaceutical Society of Japan) の支援を受けて実施したものです。(採用番号: N-181101)

各種実験の遂行に尽力賜りました高崎健康福祉大学薬学部 冨所いつき 氏、笠原悠 氏に深く御礼申し上げます。また、本研究および学会発表等における英語の語学指導をして下さった Matthew Dornan 氏に厚く御礼の意を表します。

最後に、本日まで御指導、御支援を賜りました諸先生方と友人、先輩、後輩、研究室所属の研究員の方々、暖かく見守り支えて下さった家族、親戚の皆様に心より感謝申し上げます。

2021年 2月 吉日 上岡宏規

審査委員

本学位論文の審査は、高崎健康福祉大学大学院薬学研究科で指名された以下の審査委員により行われた。

主査 高崎健康福祉大学大学院薬学研究科 教授 中西 猛夫（薬学博士）

副査 高崎健康福祉大学大学院薬学研究科 教授 常岡 誠（医学博士）

副査 高崎健康福祉大学大学院薬学研究科 教授 中道 範隆（薬学博士）