

2017 年度 博士論文

肺がん細胞の Snail 誘発性上皮間葉転換における  
P-glycoprotein 活性化および薬物耐性機構の解析

Mechanism of P-glycoprotein activation and drug resistance in Snail-  
induced epithelial to mesenchymal transition of lung 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 1420101  
氏 名 伴野 拓巳  
指導教員 荻原 琢男

## 目次

第1章	序論 .....	1
第2章	非小細胞肺癌(NSCLC)細胞株における Snail 過剰発現による上皮間葉転換(EMT)および P-glycoprotein (P-gp)活性化	
第1節	序 .....	5
第2節	結果 .....	6
2-2-1	NSCLC 細胞株間における Snail および P-gp 発現量の比較	6
2-2-2	HCC827 における Snail 過剰発現による EMT の誘導	8
2-2-3	Snail 過剰発現時における排出系トランスポーターの機能変動	10
2-2-4	Paclitaxel 耐性の変化に対する Snail 過剰発現の影響	13
2-2-5	P-gp のタンパク発現に対する Snail 過剰発現の影響	14
第3節	考察 .....	15
第4節	小括 .....	17
第3章	Entinostat (Ent)による Snail 過剰発現時の P-gp 機能亢進抑制	
第1節	序 .....	18
第2節	結果 .....	19
3-2-1	細胞毒性および AcH3 の増加を示さない Ent 処理条件の検討	19
3-2-2	Ent による Snail 誘発性 EMT 抑制作用	21

3-2-3	Snail 過剰発現時の P-gp 活性化に対する Ent の抑制作用	23
3-2-4	Ent が P-gp の基質となるか否かについての検討	25
第3節	考察 .....	27
第4節	小括 .....	29
第4章	Snail 過剰発現時の P-gp 活性化における caveolin-1 の関与	
第1節	序 .....	31
第2節	結果 .....	32
4-2-1	Snail 過剰発現が caveolin-1 に与える影響	32
4-2-2	Snail 過剰発現細胞における paclitaxel 耐性化に対する PP2 の効果	33
4-2-3	Snail 誘発性 EMT 時における caveolin-1 リン酸化調節因子の解析	34
第3節	考察 .....	35
第4節	小括 .....	36
第5章	Snail 過剰発現時の P-gp 活性化における ezrin、radixin、moesin (ERM)の関与	
第1節	序 .....	38
第2節	結果 .....	39

5-2-1	Snail 過剰発現時の ERM 発現変動	39
5-2-2	HCC827における moesin (Msn) knockdown の効果	40
5-2-3	Snail 過剰発現細胞における Msn knockdown による P-gp 活性抑制	41
5-2-4	Paclitaxel 耐性化に対する Msn knockdown の影響	42
5-2-5	Msn knockdown が Snail 誘発性 EMT に与える影響	43
第3節	考察	45
第4節	小括	47
第6章	ヒト肺癌組織および肺正常組織における Snail と P-gp 機能調節因子の遺伝子発現の相関解析	
第1節	序	49
第2節	結果	50
6-2-1	NSCLC 細胞株における Snail と P-gp 機能調節因子の遺伝子発現量の評価	50
6-2-2	肺癌患者由来組織における Snail および P-gp 機能調節因子の遺伝子発現相関解析	52
6-2-3	肺正常組織および肺癌組織間の Snail および ERM の遺伝子発現解析	54
第3節	考察	55
第4節	小括	57

第7章	総括	59
第8章	実験方法の部	
第1節	培養細胞	61
第2節	試薬	61
第3節	統計解析	64
第4節	実験方法	65
	参考文献	75
	主論文目録	85
	副論文目録	86
	謝辞	88
	審査委員	89

## 略語一覽

ABC	ATP binding cassette
AC	adenocarcinoma
AcH3	acetyl histone H3
Ad	human adenovirus serotype 5
BCRP	breast cancer resistance protein
BSA	bovine serum albumin
CDCF	5-(and-6)-carboxy-2', 7'-dichlorofluorescein
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
C/M ratio	cell to medium ratio
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
EGFR	epidermal growth factor receptor
Elc	elacridar
EMT	epithelial to mesenchymal transition
Ent	entinostat
ERM	ezrin, radixin, moesin
ESI	electrospray ionization
Ezr	ezrin
FAK1	focal adhesion kinase 1
FBS	fetal bovine serum
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GRB2	growth factor receptor-bound protein 2
H3	histone H3
HBSS-HEPES	Hank's balanced salt solution buffered with 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine-ethanesulfonic acid (pH7.4)
HDAC	histone deacetylase
HPLC	high performance liquid chromatography
KRT18	keratin 18
LC-MS/MS	liquid chromatography-tandem mass spectrometry
MET	mesenchymal to epithelial transition
MRP	multidrug resistance associated protein
Msn	moesin
NSCLC	non-small cell lung cancer
PBS	phosphate buffered saline

PBST	phosphate buffered saline containing 0.05% (v/v) Tween 20
p-caveolin-1	phosphorylated caveolin-1
P-gp	P-glycoprotein
Rdx	radixin
RT-qPCR	reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction
Rho123	rhodamine123
SCC	squamous cell carcinoma
SCLC	small cell lung cancer
VPs	virus particles
ZEB1	zinc finger E-Box binding homeobox 1

## 第1章 序論

がんは世界的に死亡率の高い疾患であり、その悪性化機構の一つに浸潤や転移が挙げられる<sup>1,2</sup>。がんの中でも特に肺がんは生存率が著しく低く、転移を示した症例での5年生存率は約3.6%であり極めて低い<sup>3</sup>。さらに、肺がんは予後が悪いとされる脳への転移が、他のがんと比較して高頻度かつ早期に起きることが報告されており、肺がん転移症例の予後が不良である理由の一つと考えられる<sup>4,5</sup>。肺がんは組織型により、小細胞肺がん(SCLC: small cell lung cancer)とそれ以外から成る非小細胞肺がん(NSCLC: non-small cell lung cancer)に大きく分類され、それぞれ異なる特徴を持つことが明らかになっている。SCLCは肺がん全体の10~15%を占めるとされており、悪性度が高く、急速な増大および進展を起こし血行性に脳などの他臓器に転移し易い特徴を持つ。化学療法および放射線療法のいずれに対しても比較的感受性を示すものの、再発することが多くその予後は不良とされている。一方で肺がんの85~90%を占めるとされるNSCLCは主に腺がん(60~65%)および扁平上皮がん(20~25%)から成っており、SCLCに比較すると進行や転移は遅く、化学療法や放射線療法に対する感受性は低いとされている。肺がんには、外科的切除や放射線療法、化学療法など幅広い治療の選択肢があり、中でも最も治癒率の高い治療法は外科的切除である。しかしながら、その対象となる症例はstage IまたはIIのみと限定されており、肺がん患者の50%以上が診断時には既に転移を起こしているため、ほとんどの患者には抗がん薬を用いた化学療法が行われている<sup>3</sup>。近年80%近くの肺腺がんでは、epidermal growth factor receptor (EGFR)や anaplastic lymphoma kinase をコードする遺伝子にがん化や増殖能の亢進をもたらす driver mutation が存在することが明らかになっており、それらの遺伝子変異が陽性の患者には分子標的薬による化学療法が劇的な治療効果を示すことが明らかになっている。一方で、SCLCや上述の遺伝子変異が陰性の肺腺がん、肺扁平上皮がんには cisplatin や carboplatin などのプラチナ系薬と paclitaxel や gemcitabin をはじめとする第三世代抗がん薬の併用が行われている。このようにがんの中でも肺がんは、古典的な抗がん薬から近年開発された分子標的薬まで比較的化学療法が充実しているにも関わらず、抗がん薬の適応となる浸潤や転移を来した症例の予後は悪い。その背景の一つとして、P-glycoprotein (P-gp)などの薬物排出トランスポーターを介した薬物耐性化が寄与していると考えられる。

P-gpは、ATP binding cassette (ABC)トランスポーターに属しており、breast cancer resistance protein (BCRP)や multidrug resistance associated protein (MRP)などと共にがんの薬物耐性化に関与している。P-gpは1280アミノ酸から

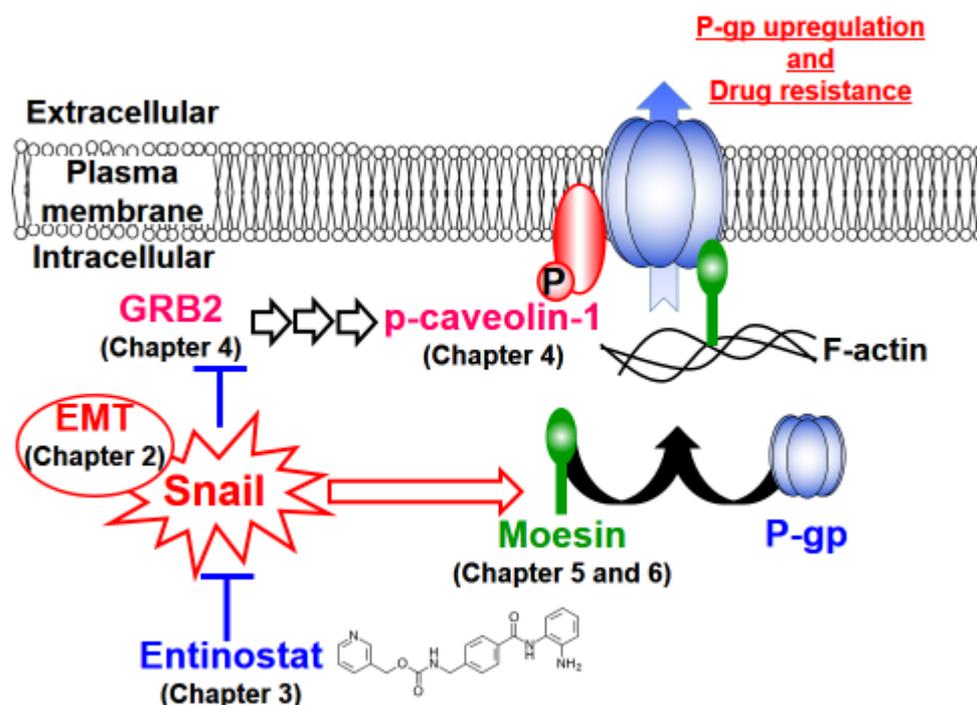
成る分子量約 170 kDa の糖タンパクであり<sup>6,7</sup>、基質として認識される薬物の分子量は幅広く、化学的、構造的、薬理作用的にも特異性が乏しいと考えられている。これまでに膨大な数の化合物が P-gp の基質であることが明らかになっており、それらは有機カチオン性の化合物やアミノ酸、抗生物質、抗がん薬などの小分子から、多糖類やステロイドホルモン、直鎖タンパクなどの高分子まで多岐に渡っている<sup>8-14</sup>。P-gp は、抗がん薬に対しても古典的なものから近年開発されてきた EGFR tyrosine kinase inhibitor のような分子標的薬まで幅広く基質として認識することが報告されており、がんの多剤耐性化に深く関わっていることが推測されている。例えば Sakai らは、P-gp 基質抗がん薬を含む化学療法に P-gp 阻害薬を併用することにより、乳がん患者の無増悪期間が延長することを明らかにした<sup>15</sup>。さらに Gottesman らは P-gp 阻害薬を併用することで、P-gp 基質薬物のがん移行性が高まることを示している<sup>16</sup>。以上のことから、P-gp の機能制御はがん細胞への抗がん薬移行性を改善することにつながると考えられている。一方で P-gp は、正常組織においても発現しており、消化管からの薬物吸収や脳への薬物移行、また腎臓からの薬物排泄など薬物の吸収や分布、排泄にも重要な役割を果たしていることが明らかになっている<sup>17</sup>。従って、P-gp はがんの薬物耐性だけでなく、薬物の体内動態を司る重要な因子であることから、その機能制御法はがんの特異性の高い方法であることが求められる。

上述したように肺がんは非常に転移を起こし易いがんであるが、転移を誘発する因子の一つとして、様々な遺伝子の発現に関与する転写因子 Snail が知られている。がん細胞における Snail の発現上昇は、E-cadherin などの上皮系細胞マーカーの発現抑制<sup>18</sup>や、zinc finger E-Box binding homeobox 1 (ZEB1) などの間葉系細胞マーカーの発現亢進<sup>19</sup> を起こし上皮間葉転換(EMT: epithelial to mesenchymal transition)を誘導する。がんの転移は原発巣から血液またはリンパ液中へとがん細胞が流出し、血液やリンパ液中を浮遊したがん細胞が原発巣と異なる組織に再び生着することにより成立する。EMT は、がん細胞が原発巣から血液やリンパ液中に流出する際に生じ、それに対して間葉上皮転換(MET: mesenchymal to epithelial transition)は血液やリンパ液中のがん細胞が転移巣に生着する際に起きると考えられている<sup>20</sup>。一方で近年の研究により、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、EMT に伴いがん細胞におけるアポトーシスシグナルの阻害や薬物排出能の亢進、分子標的薬および免疫療法に対する耐性などが生じることが明らかになっている<sup>20,21</sup>。

EMT に伴う薬物排出トランスポーターの発現や活性の変化、ならびにそれらのメカニズムの解析は少数ながら報告されているものの、未だに十分ではない。がん種やトランスポーター、EMT を誘導する因子によって EMT の薬物耐性への影響がどのように異なっているかについても不明確である<sup>22</sup>。

肺がんの治療においても薬物耐性化は問題となっている。しかしながら、EMTを起こした肺がん細胞における P-gp の発現や活性の変動については十分に評価されていない。さらに、既存の報告においても EMT 時の P-gp 調節機構については詳細な解析はほとんど行われていない。従って、これらの点を明らかにすることにより、正常組織の薬物動態においても重要な機能を果たす P-gp をがん細胞に選択的に制御し、抗がん薬に対する耐性化を抑制できると考えた。そこで本研究では、肺がん細胞の悪性化に関与する EMT を Snail の過剰発現により誘導した際に P-gp 活性化が生じるか否か、またそのメカニズムを解明することを目的とし、以下の検討を行った。

第 1 章の序論に続き、第 2 章では先ず、肺がん細胞に Snail を過剰発現させ EMT を起こした際に、P-gp による薬物排出活性に変化が起きるのか否かを検証した。また、その排出活性の変化が P-gp 基質抗がん薬に対する肺がん細胞の薬物耐性の増強に寄与するか否かを検討した。続く第 3 章では、近年 EMT を抑制する作用を持つことが報告された entinostat が、EMT を伴う Snail 過剰発現時の P-gp の活性変化を抑制する手段となり得るかを検討した。さらに第 4 章では caveolin-1、第 5 章では ezrin、radixin および moesin に着目し、Snail 過剰発現時の P-gp 活性化メカニズムの解明に取り組んだ。最後に第 6 章では、群馬県立がんセンターとの共同研究により収集した肺がん患者由来の組織を用いて、Snail と各種 P-gp 機能調節因子の遺伝子発現相関を評価することにより、肺がん患者のがん組織においても *in vitro* で見出した P-gp 活性化が起こり得るかを考察した(Scheme 1)。



Scheme 1: Constituents of this dissertation.

This study aims to clarify the mechanism of P-gp activation induced by Snail-induced EMT in lung cancer. In chapter 2, it is revealed that Snail expression induces P-gp activation in HCC827 cells accompanied with EMT. In chapter 3, suppression of P-gp activity in Snail-expressing cells is attempted using a histone deacetylase inhibitor entinostat. Chapters 4 and 5 focus on caveolin-1 and ERM, respectively to clarify the P-gp activation mechanism. Finally, in chapter 6, it is evaluated that whether Snail and P-gp regulatory factors are correlated in tissue from lung cancer patients.

## 第 2 章 非小細胞肺癌(NSCLC)細胞株における Snail 過剰発現による上皮間葉転換(EMT)および P-glycoprotein (P-gp)活性化

### 第 1 節 序

Snail ファミリーは、それぞれ *SNAIL1*、*SNAIL2* および *SNAIL3* 遺伝子によりコードされるタンパク Snail、Slug および Smuc により構成されており、zinc-finger 型転写因子として、DNA 上の 6 つの塩基から成る E-Box 配列(CAGGTG)を認識し結合する<sup>23-27</sup>。Snail ファミリーが遺伝子配列上の E-Box に結合すると、それらは転写抑制因子として働くことが多くの研究により明らかにされている<sup>18,23,25,27-32</sup>。Snail は最初にショウジョウバエの中胚葉形成を誘導する因子として同定されたタンパク<sup>33,34</sup>であり、その後にはがんの EMT だけでなく再発<sup>35-38</sup>、正常組織における EMT<sup>39,40</sup>、免疫細胞の調節<sup>41,42</sup>、細胞周期<sup>43</sup>および生存の調節<sup>44-46</sup>、発生<sup>47-49</sup>など生命現象の様々な過程に関与していることが明らかにされている。また Snail は、様々な動物種において保存されており Snail ファミリーの中で最も研究が進んでいるタンパクである<sup>50</sup>。さらに第 1 章で述べたように、EMT はがんの浸潤や転移に関与する現象であるとされており、転写因子や成長因子、サイトカイン、miRNA など様々な因子により調節され、Snail もその主要な調節因子の一つである<sup>39,51-54</sup>。

これまでに Snail のがん悪性化に関する研究は多数報告されており、Hung らは、Snail の高発現したがん患者ではその生存率が低下することを明らかにしている<sup>55</sup>。また、Liu らは NSCLC 患者において Snail の高発現が転移と相関することを明らかにしている<sup>56</sup>。一方で、P-gp は第 1 章でも述べたように、がん細胞から抗がん薬を排出することから抗がん薬の効果を直接的に制御する因子と考えられる。Zhu らは NSCLC 患者の中でも、P-gp 発現陽性群の予後が陰性群と比較して悪いことを明らかにしている。さらにリンパ節転移陽性の患者や病理学的分類で、ステージ II 以降の患者において P-gp の発現が高いことも明らかにしている<sup>57</sup>。また、*in vitro* の検討において EMT と ABC トランスポーターとの関連を示唆している論文は散見されるものの、肺癌における検討は乏しい<sup>22</sup>。

以上のことから本章では、NSCLC 細胞株において Snail を過剰発現させ EMT を引き起こした際に、P-gp の発現および活性が変化するか否かを評価することとした。

## 第 2 節 結果

### 2-2-1 NSCLC 細胞株間における Snail および P-gp 発現量の比較

まず reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)により、4 種類の NSCLC 細胞株 HCC827、A549、H441 および H1975 における Snail および P-gp の遺伝子発現量を評価した。なお、検討に用いた 4 種類の NSCLC 細胞株の特徴は以下の表に示した(Table 1)。その結果 Snail の発現量は、最も少ない HCC827 を 1 としたとき、A549、H441 および H1975 でそれぞれ  $1.95 \pm 0.72$  (平均値  $\pm$  標準偏差: mean  $\pm$  S.D.)、 $4.20 \pm 1.88$  および  $215.19 \pm 16.37$  であった(Fig. 2-1 A)。また、P-gp の発現量は最も少ない H441 を 1 としたとき、HCC827、A549 および H1975 の発現量はそれぞれ、 $13.33 \pm 1.74$ 、 $9.45 \pm 2.05$  および  $1.54 \pm 1.23$  であった(Fig. 2-1 B)。

以上の結果より、HCC827 は最も Snail の発現量が低く P-gp の発現量が高いことから、Snail が P-gp に与える影響を評価しやすい細胞株であると判断し、以降の検討には HCC827 を用いた。

Table 1 Characteristics of four NSCLC cell lines.

Cell	HCC827	A549	H441	H1975
Age	39	58	Unknown	Unknown
Sex	Female	Male	Male	Female
Cancer type	AC	AC	AC	AC
Ethnicity	Caucasian	Caucasian	Unknown	Unknown

These data were obtained from product information on the American Type Culture Collection website.

AC indicates adenocarcinoma.

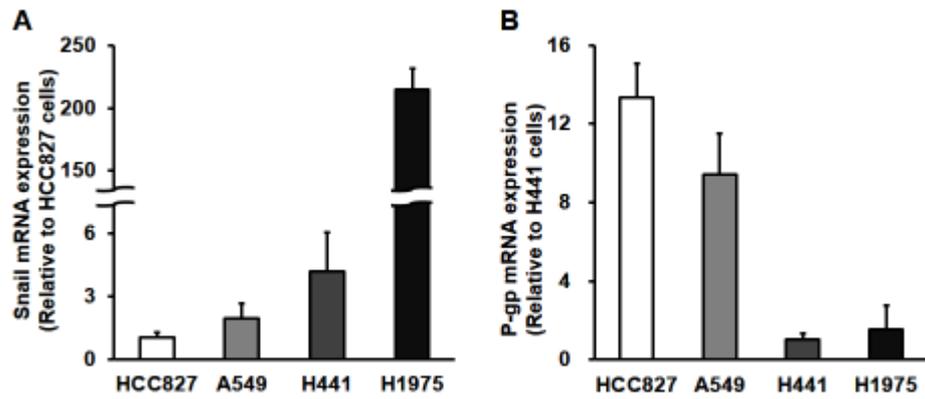


Figure 2-1 Expression profile of Snail (A) and P-gp (B) mRNA in NSCLC cell lines HCC827, A549, H441 and H1975 cells.

(A) Snail mRNA expression levels. The data are mean  $\pm$  S.D. (n = 3 or 4).

(B) P-gp mRNA expression levels. The data are mean  $\pm$  S.D. (n = 3 or 4).

## 2-2-2 HCC827 における Snail 過剰発現による EMT の誘導

転写因子である Snail は様々ながん細胞において EMT を引き起こすことが明らかになっており、EMT の調節因子であるとされている。そこで、EMT を起こした細胞におけるトランスポーターの変動を評価するため、human adenovirus serotype 5 (Ad) vector を用いて HCC827 に Snail を発現させ、RT-qPCR および Western blotting により EMT の誘導を評価した。その結果、Snail 過剰発現細胞では Mock 細胞に比較して、上皮系細胞マーカーである E-cadherin、occludin および claudin-1 の mRNA 発現量の低下が認められた(E-cadherin:  $0.70 \pm 0.07$ , occludin:  $0.69 \pm 0.03$  および claudin-1:  $0.34 \pm 0.05$ )。また、間葉系細胞マーカーである vimentin および ZEB1 の mRNA 発現上昇が認められた(vimentin:  $9.21 \pm 1.68$  および ZEB1:  $1.98 \pm 0.28$ ) (Fig. 2-2 A)。さらに、タンパク発現においても、Snail 過剰発現細胞における E-cadherin の発現低下および vimentin の発現上昇が認められた(Fig. 2-2 B)。

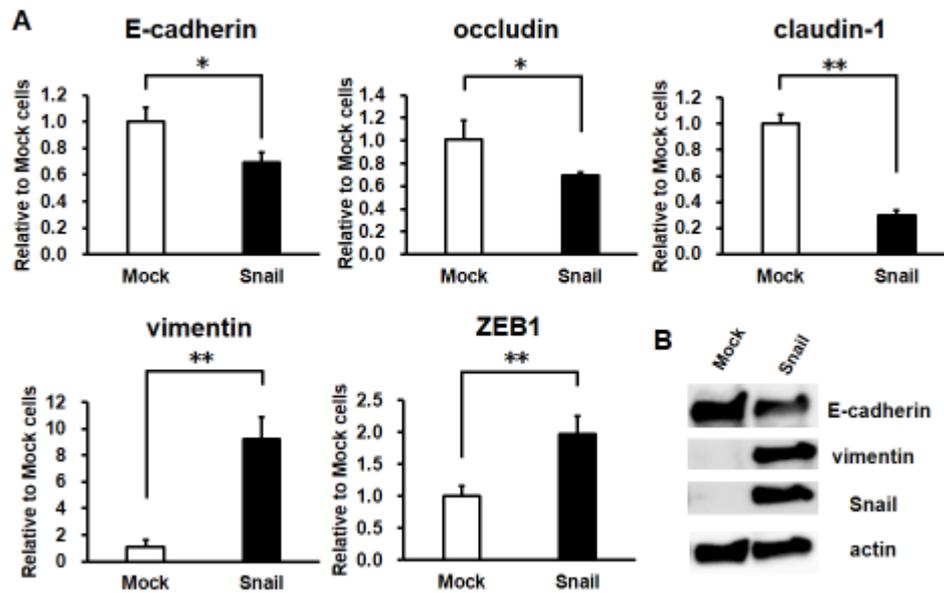


Figure 2-2 Effects of Snail expression on mRNA (A) and protein (B) levels in HCC827 cells.

(A) RT-qPCR analysis of epithelial markers E-cadherin, occludin and claudin-1, and mesenchymal markers vimentin and ZEB1. The data are mean  $\pm$  S.D. (n = 3 or 4). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  significantly different compared with Mock cells. (B) Western blot analysis of E-cadherin (135 kDa), vimentin (57 kDa), Snail (29 kDa) and actin (43 kDa). Actin was used as a loading control.

### 2-2-3 Snail 過剰発現時における排出系トランスポーターの機能変動

前項の結果より、HCC827 における Snail の過剰発現は EMT を誘導することが明らかになった。そこで同様の方法で培養した細胞を用いて、Snail 過剰発現細胞における、各種排出系トランスポーター(P-gp、BCRP および MRPs)の活性を蛍光基質薬物の取り込み試験により評価した。その結果、Mock 細胞と比較して Snail 過剰発現細胞において、P-gp および BCRP の基質である rhodamine123 (Rho123)の細胞内蓄積量は低下した(Fig. 2-3 A)。一方で、BCRP の基質である Hoechst33342、BCRP および MRP2 の基質である SN-38、および MRP ファミリーの共通基質である 5-(and-6)-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein (CDCF)の細胞内蓄積量は、変化しないまたは増加することが認められた(Fig. 2-3 B-D)。さらに、細胞内蓄積低下の認められた Rho123 を用いて、細胞内からの排出速度を efflux assay により評価したところ、Snail 過剰発現細胞において排出速度の有意な上昇が認められた(Mock 細胞:  $7.25 \pm 0.75$  nmol/min/g protein および Snail 過剰発現細胞:  $8.91 \pm 0.67$  nmol/min/g protein)。また、P-gp 阻害薬である elacridar (Elc)の添加により、その Rho123 排出速度の低下が認められた(Fig. 2-4 A)。さらに P-gp 基質抗がん薬である paclitaxel を用いた取り込み試験においても、有意な差は認められないものの、Snail 過剰発現細胞において paclitaxel の細胞内蓄積量が低下する傾向が認められた(Mock 細胞:  $0.021 \pm 0.007$  mL/mg protein および Snail 過剰発現細胞:  $0.017 \pm 0.002$  mL/mg protein)。また、その蓄積は Elc の添加により顕著に増加した(Fig. 2-4 B)。

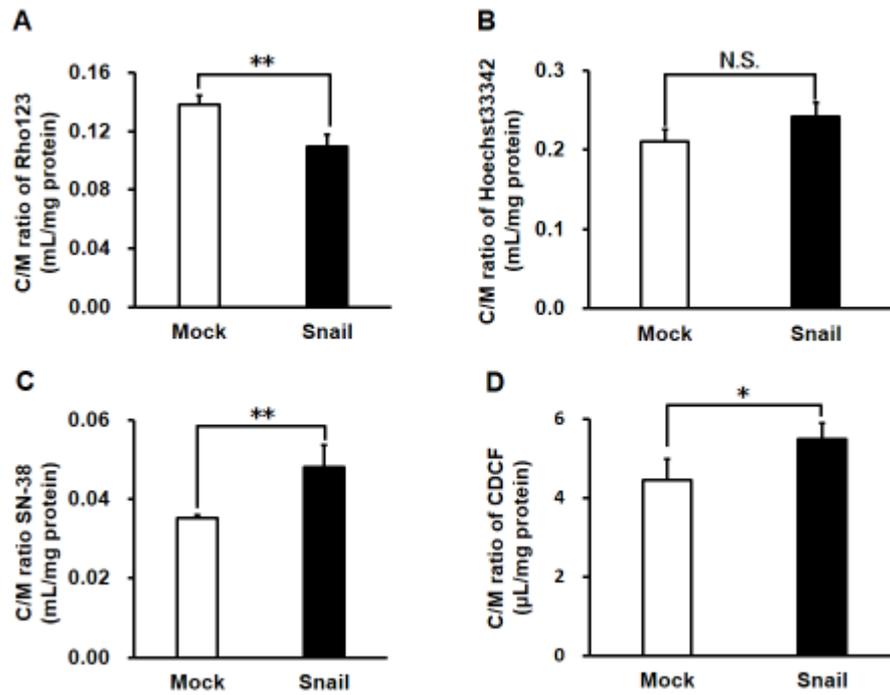


Figure 2-3 Effects of Snail expression on uptake of fluorescence probes in HCC827 cells.

Cells were preincubated in HBSS-HEPES for 30 min at 37°C and then incubated with fluorescence probes 10 μM Rho123 (A), 5 μM Hoechst33342 (B), 2 μM SN-38 (C) and 5 μM 5-(and-6)-carboxy-2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (D) for 60 min at 37°C. The data are mean ± S.D. (n = 4-6). \* p < 0.05, \*\* p < 0.01 significant difference. N.S. indicates no significant difference.

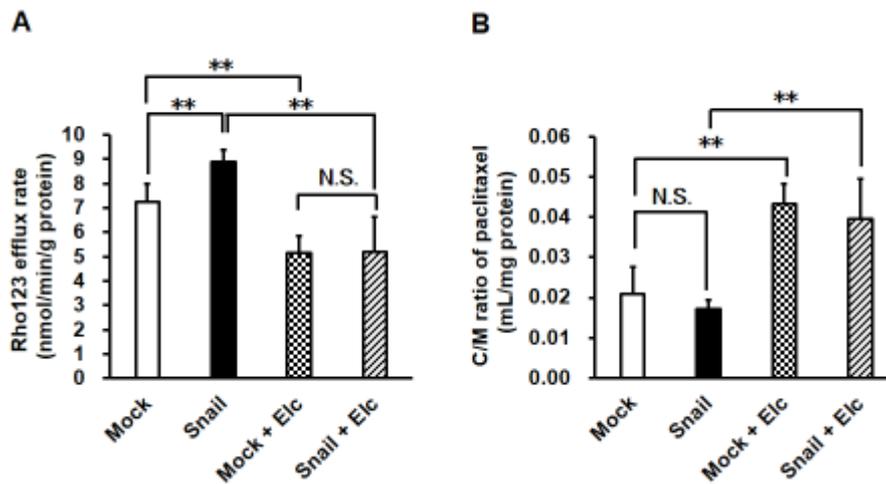


Figure 2-4 Effects of Snail expression on P-gp transport activity in HCC827 cells.

(A) In efflux assay, 10  $\mu$ M Rho123 was loaded to HCC827 cells for 30 min at 4°C and cells were then incubated in Rho123 free Opti-MEM with or without Elc as a P-gp inhibitor for 60 min at 37°C. The data are mean  $\pm$  S.D. (n = 6).

(B) In uptake assay, HCC827 cells were preincubated in HBSS-HEPES with or without 10  $\mu$ M Elc for 30 min at 37°C. Cells were then incubated in 10  $\mu$ M paclitaxel with or without 10  $\mu$ M Elc for 60 min at 37°C. The data are mean  $\pm$  S.D. (n = 6). \* \* p < 0.01 significant difference. N.S. indicates no significant difference.

#### 2-2-4 Paclitaxel 耐性の変化に対する Snail 過剰発現の影響

前項の結果より、Snail 過剰発現細胞において P-gp の機能亢進が認められたことから、その機能亢進が抗がん薬耐性に与える影響を評価した。各細胞に 100 nM の paclitaxel を 3 日間曝露した後の細胞生存率を評価した結果、Snail 過剰発現細胞は Mock 細胞と比較し有意に高い生存率を示した(Mock 細胞:  $48.3 \pm 10.5\%$  および Snail 過剰発現細胞:  $69.7 \pm 2.8\%$ )。また Mock 細胞では、Elc による生存率低下は認められなかった(Mock 細胞:  $48.3 \pm 10.5\%$  および Mock 細胞+Elc:  $47.0 \pm 3.7\%$ )ものの、Snail 過剰発現細胞では Elc による生存率低下が認められた(Snail 過剰発現細胞:  $69.7 \pm 2.8\%$  および Snail 過剰発現細胞+Elc:  $57.0 \pm 1.1\%$ ) (Fig. 2-5)。

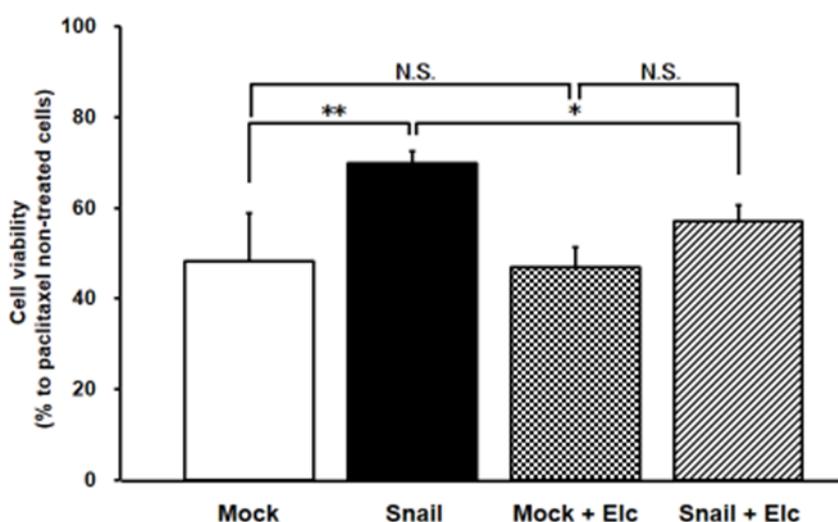


Figure 2-5 Effects of Snail expression on cell viability of HCC827 cells against paclitaxel.

HCC827 cells were exposed to 100 nM paclitaxel with or without 1  $\mu$ M Elc for 3 days under cell culture conditions. The data are mean  $\pm$  S.D. (n = 3 or 4). \* p < 0.05, \*\* p < 0.01 significant difference. N.S. indicates no significant difference.

### 2-2-5 P-gp のタンパク発現に対する Snail 過剰発現の影響

これまでの結果より、Snail 過剰発現時には P-gp の機能が亢進し、薬物耐性化を起こすことが示された。この機能変動が、P-gp のタンパク発現量の変化に基づくものかを明らかにするために Western blotting により P-gp のタンパク発現量を評価した。その結果、Mock 細胞と Snail 過剰発現細胞間で有意な差は認められなかった(Mock 細胞:  $100.0 \pm 33.3\%$  および Snail 過剰発現細胞:  $84.2 \pm 30.5\%$ ) (Fig. 2-6)。

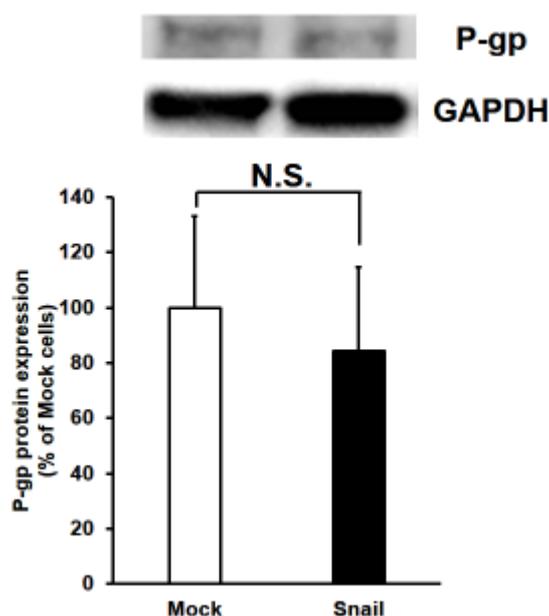


Figure 2-6 Effects of Snail expression on P-gp protein levels in HCC827 cells. Western blot analysis of P-gp (170 kDa) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (37 kDa) in Mock or Snail Ad vector infected HCC827 whole cell lysate. Band densities were determined with a Luminescent Image Analyzer LAS-3000 (Fuji Film, Japan), and P-gp densities were normalized by GAPDH. The data are mean  $\pm$  S.D. (n = 3). N.S. indicates no significant difference.

### 第3節 考察

本章の結果から、HCC827におけるSnailの過剰発現により、EMTに関連する各種上皮系細胞マーカーの発現低下および、間葉系細胞マーカーの発現上昇が認められた(Fig. 2-2 A および B)。これらのことよりHCC827におけるSnail過剰発現は、EMT時に認められる遺伝子発現変動を誘導することが認められ、本細胞を用いることでEMT時のトランスポーター機能変動を評価することが可能と考えられた。

蛍光基質薬物による細胞内取り込み試験により、各種排出系トランスポーターに対する機能評価を行ったところ、BCRPおよびMRPsの蛍光基質薬物の細胞内蓄積量はSnail過剰発現により増加または、変化しないことが明らかになった(Fig. 2-3 B-D)。これらの結果から、BCRPおよびMRPsによる輸送はSnailを過剰発現したHCC827の薬物耐性化に関与する可能性は小さいと考えられた。一方で、P-gpの蛍光基質薬物であるRho123の細胞内蓄積量は低下したことから、Snail過剰発現時にはP-gpによる薬物耐性化が生じる可能性があると考えられた。従って以降は、P-gpに着目し検討を進めることとした(Fig. 2-3 A)。Snail過剰発現による細胞内への薬物取り込み過程の変化を考慮し、細胞外への排出過程のみを評価できるefflux assayによりRho123の排出速度を評価した。その結果、Rho123の排出速度はSnail過剰発現細胞において上昇し、細胞内取り込み試験を反映する結果が得られた(Fig. 2-4 A)。これらの結果から、Snail過剰発現は転移に関与するEMTだけでなくP-gpの機能亢進を引き起こすことが示された。また、paclitaxelを用いた細胞生存率の評価により、Mock細胞と比較してSnail過剰発現細胞では高い生存率が維持されていたことから、P-gpの活性化がHCC827の薬物耐性化に関与し得ることが明らかになった(Fig. 2-5)。さらに、Western blottingによるP-gpタンパク発現量の比較では、Mock細胞およびSnail過剰発現細胞間において有意な差は認められなかったことから、本P-gp機能亢進のメカニズムはP-gpの発現上昇ではなく、P-gpの細胞膜への局在などの翻訳後以降のメカニズムにより調節されていると考えられた(Fig. 2-6)。

近年、EMTはがんの転移に必ずしも必要でなく、がんの薬物耐性化に重要であることが報告されている。Fischerらは、マウス転移モデルを用いた検討においてEMTを起こしていない細胞も転移先の組織に生着していることを示している。その一方で、転移した細胞のうちEMTを起こした細胞では、起こしていない細胞に比べaldehyde dehydrogenasesの活性が上昇し、抗がん薬であるcyclophosphamideに耐性を示すことを明らかにしている<sup>58</sup>。同様にZhengらは、EMTを抑制した場合にもがん細胞の転移能には変化が認められないことを

示している。しかし、抗がん薬である **gemcitabin** の細胞内取り込みに関与する **equilibrative nucleoside transporter 1** および **concentrating nucleoside transporter 3** の発現が上昇し、**gemcitabin** の抗がん作用が増強することから、**EMT** は転移の有無に限らず、薬物耐性を増強する現象であることを示唆している<sup>59</sup>。

これらのことから、**EMT** が **P-gp** などの薬物耐性に寄与する因子をどのようなメカニズムで調節し、**EMT** やその誘導因子の抑制がその調節を制御する手段となり得るかを明らかにすることが、がんの薬物耐性の克服に不可欠であると考えられた。

#### 第 4 節 小括

第 2 章の結果より、以下の知見が得られた。

1. NSCLC 細胞株である HCC827 における Snail の過剰発現は、これまでの研究と同様に EMT を起こすことが認められた。
2. HCC827 における Snail 過剰発現時に各種薬物排出トランスポーターの機能を蛍光基質薬物取り込み試験により評価したところ、P-gp 基質薬物の細胞内蓄積量の低下が認められた。
3. Rho123 の排出速度を efflux assay により評価したところ、Snail を過剰発現した HCC827 において排出速度の上昇が認められた。
4. P-gp 基質抗がん薬である paclitaxel 曝露後の生存率は、Snail を過剰発現させた HCC827 において Mock 細胞よりも高く、その生存率は P-gp 阻害薬の添加により部分的に抑制された。
5. Snail 過剰発現時の P-gp 機能亢進は、P-gp のタンパク発現上昇によるものではなく、翻訳後以降の過程により調節されていることが示唆された。

第 1 章で述べたように EMT は様々な機構を介してがん細胞の薬物耐性化に寄与することが明らかにされている。本章の結果から、1) Snail の過剰発現状態においては、EMT が誘導されると同時に P-gp の活性化が起きること、2) その活性化は基質抗がん薬の抗がん作用を減弱し、薬物耐性に寄与していることを示唆する知見を得た。さらにそれは P-gp の発現誘導を介したメカニズムではなく、翻訳後以降の調節機構によるものであると考えられた。従って EMT を誘導する Snail 過剰発現状態においては、P-gp を介した薬物排出機構が活性化し、肺がん細胞の薬物耐性化に寄与していると考えられた。

### 第 3 章 Entinostat (Ent)による Snail 過剰発現時の P-gp 機能亢進抑制

#### 第 1 節 序

現在の医療において、がんは治癒可能な疾患になりつつあることは、その生存率を見ても明らかである。しかしながら、がんの浸潤や転移といった進行により顕著に生存率は低下することから、完治可能な症例は、がんが原発巣に留まった発症初期に治療を開始した場合に限られるといっても過言ではない<sup>3</sup>。つまり、がん細胞を死滅させるための抗がん薬と共に、がんの浸潤や転移を抑制する医薬品を開発することが、がん患者の生存率を高めることに有用であると考えられる。EMT ががんの浸潤や転移に関与するか否かについては、近年関与しないとする報告もされており、未だに不明である。一方で第 1 章でも述べたように EMT は、薬物耐性化に様々な機構を介して関与することが明らかになっている。そのため EMT はがんの薬物耐性克服のための創薬標的として考えられており、既にいくつかの EMT 抑制薬の治験が進められている<sup>60</sup>。第 2 章において取り上げた Snail は、EMT の主要な誘導因子であるとされていることから、Snail による EMT 誘導を抑制する医薬品や化合物が多数報告されている<sup>54</sup>。Entinostat (Ent)は現在、NSCLC<sup>61</sup>や乳がん<sup>62</sup>、メラノーマ<sup>63</sup>などの種々の固形腫瘍<sup>64</sup>に対する治療薬として開発が進められている benzamide 系 histone deacetylase (HDAC)阻害薬の一つであり HDAC I および III に対する高い選択的阻害活性を持っている<sup>65</sup>。Shah らは、高転移性の乳がん細胞株に Ent を処理することで、間葉系の性質が上皮系に変化する、つまり EMT を抑制する作用があることを報告している。またその作用は、Snail の発現および転写調節活性を抑制する作用によるものである可能性を示している<sup>66</sup>。

第 2 章では、HCC827 における Snail 過剰発現時には EMT だけでなく、同時に P-gp の機能亢進が誘導されることが明らかになった。そこで本章では、Ent による Snail 過剰発現時の EMT と P-gp 活性化の抑制作用について評価を行った。

## 第 2 節 結果

### 3-2-1 細胞毒性および AcH3 の増加を示さない Ent 処理条件の検討

第 1 章でも述べたように、低分子の抗がん薬の多くは P-gp の基質となり、さらにそれらの曝露は P-gp の機能亢進を引き起こすことが明らかにされている<sup>67</sup>。また、HDAC 阻害作用を持つ化合物の曝露により、P-gp の発現上昇を介した機能亢進が起こることが報告されている<sup>68-72</sup>。以上のことから、細胞毒性および HDAC 阻害作用を示す濃度の Ent 処理はそれ自体が P-gp の機能亢進を招くと考えられる。従って、本項ではまずそれらを示さない Ent 処理条件を検討し、Snail による EMT とそれに伴う P-gp 機能亢進を Ent が抑制するか否かを適切に評価するための条件を見出すこととした。

まず各濃度の Ent を 4 日間曝露した際の細胞生存率を評価したところ、Control と比較して 10  $\mu$ M 以上の Ent 曝露により顕著に HCC827 の生存率が低下することが認められた(10  $\mu$ M: 89.89  $\pm$  3.37%および 100  $\mu$ M: 42.65  $\pm$  0.89%) (Fig. 3-1 A)。同様の条件の Ent 処理を行った細胞における、histone H3 (H3)および acetyl histone H3 (AcH3)のタンパク発現を Western blotting により評価したところ、1  $\mu$ M の Ent 処理により 17 kDa 付近に AcH3 のバンドが認められたものの、100 nM 以下の濃度ではほとんど認められなかった(Fig. 3-1 B)。

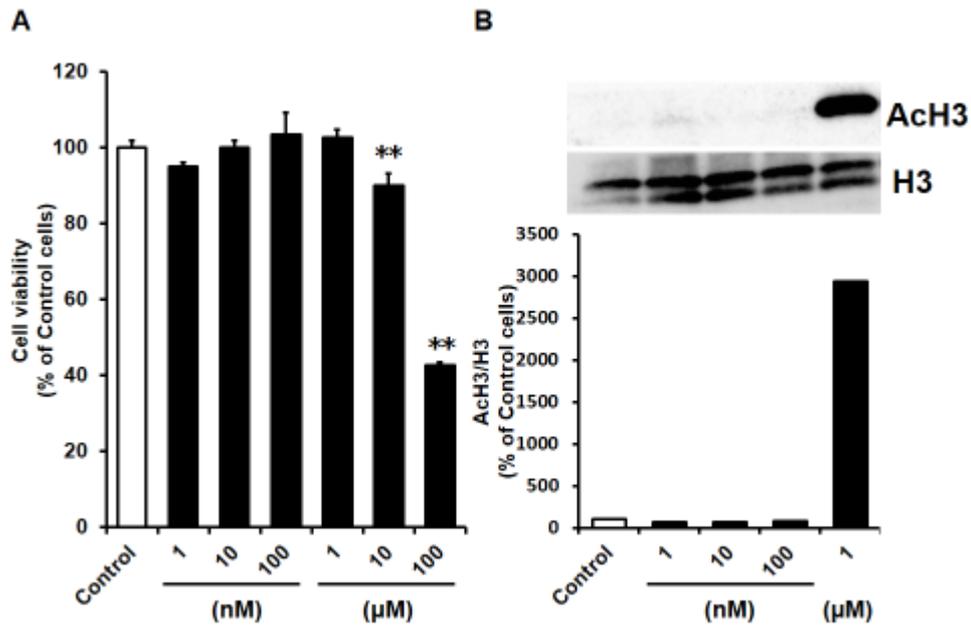


Figure 3-1 Effects of Ent on cell viability (A) and AcH3 level (B) in HCC827 cells.

HCC827 cells were treated with different concentration of Ent for 4 days under cell culture conditions. (A) Cell viability was determined using alamarBlue® reagent. Each value is the mean  $\pm$  S.D. (n = 5). \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 significant difference. (B) Western blot analysis of AcH3 (17 kDa) and H3 (17 kDa) in HCC827 whole cell lysate. Cells were treated with Ent at the concentrations indicated for 4 days under cell culture conditions. Band densities were determined with a Luminescent Image Analyzer LAS-3000, and AcH3 densities were normalized by H3.

### 3-2-2 Ent による Snail 誘発性 EMT 抑制作用

前項の結果より、1  $\mu$ M 未満の Ent 処理は細胞生存率および HDAC 阻害作用による AcH3 の蓄積に影響を与えないと考えられたことから、10 nM の Ent を用いて Snail 過剰発現時における EMT の抑制を試みた。

Snail 過剰発現細胞を 10 nM の Ent で処理した後の mRNA 発現量を評価したところ、Snail 過剰発現細胞において認められた E-cadherin の発現低下および vimentin の発現上昇は Ent を処理することにより部分的に抑制された。一方で、Ent 処理を行った際も Mock 細胞に対して Snail 過剰発現細胞において E-cadherin の低下および vimentin の上昇は認められたため、Ent による EMT の抑制は部分的であった(Fig. 3-2 A および B)。また、Snail の発現について評価したところ、Ent 処理の有無に関わらず Mock 細胞に比較して Snail 過剰発現細胞において Snail の mRNA 発現量の上昇が認められた(Fig. 3-2 C)。同様に P-gp の mRNA 発現も評価したところ、Ent 未処理の際は Snail の発現による有意な差は認められなかったものの、Ent を処理した場合には Snail 過剰発現細胞において有意に P-gp の mRNA 発現量が低下した(Fig. 3-2 D)。

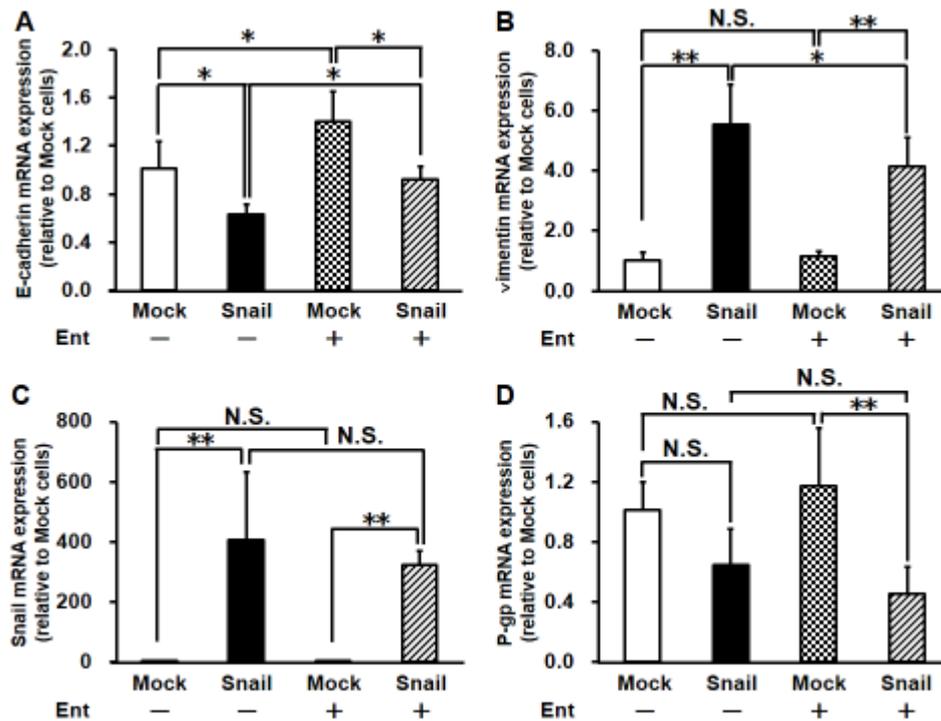


Figure 3-2 Effects of Ent on Snail-induced change in mRNA expression of E-cadherin (A), vimentin (B), Snail (C) and P-gp (D) in HCC827 cells. Cells were infected with Mock or Snail-expressing Ad vector for 3 days and then treated with 10 nM Ent containing medium for 4 days under cell culture conditions. Each value is the mean  $\pm$  S.D. ( $n = 4$  for E-cadherin,  $n = 5$  or  $6$  for vimentin, Snail and P-gp). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  significant difference. N.S. indicates no significant difference.

### 3-2-3 Snail 過剰発現時の P-gp 活性化に対する Ent の抑制作用

第 2 章では Snail 過剰発現細胞において発現量に依存しない P-gp の活性化が起こることを明らかにした。一方で前項までの結果から、Ent 処理は Snail 過剰発現による EMT を部分的に抑制する作用を示すものの、Snail 過剰発現細胞における P-gp の発現には影響を与えないことが示された。そこで前項同様に Ent を処理した細胞を用いて Rho123 による P-gp の機能評価を試みた。

Rho123 の細胞内蓄積量を評価したところ、Mock 細胞と比較して Snail 過剰発現細胞において蓄積量の低下が認められた(Mock 細胞:  $0.10 \pm 0.00$  mL/mg protein および Snail 過剰発現細胞:  $0.08 \pm 0.01$  mL/mg protein)。Ent 処理は Mock 細胞に対しては影響を与えなかった一方で、Snail 過剰発現細胞における Rho123 蓄積量を Mock 細胞と同程度まで増加させた(Mock 細胞+Ent:  $0.09 \pm 0.00$  および Snail 過剰発現細胞+Ent:  $0.10 \pm 0.01$ ) (Fig. 3-3 A)。さらに Rho123 の排出速度を評価したところ、第 2 章同様に Mock 細胞と比較して Snail 過剰発現細胞において上昇が認められた(Mock 細胞:  $2.61 \pm 0.48$  nmol/min/g protein および Snail 過剰発現細胞:  $6.54 \pm 0.08$  nmol/min/g protein)。一方で Ent を処理することで両細胞における Rho123 排出速度の低下が認められた(Mock 細胞+Ent:  $1.66 \pm 0.48$  および Snail 過剰発現細胞+Ent:  $3.13 \pm 0.08$ )。また、排出速度の低下率を算出したところ、Mock 細胞に対して Ent 処理をした場合には 36%であったが、Snail 過剰発現細胞では 52%の低下が認められた(Fig. 3-3 B)。

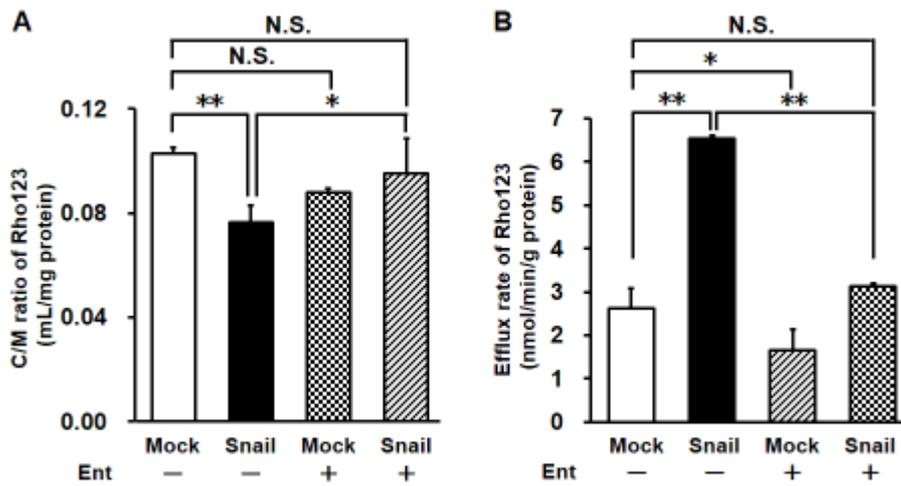


Figure 3-3 Effects of Ent on Snail-induced change in Rho123 uptake and efflux in HCC827 cells.

P-gp transport activity was examined by means of uptake (A) and efflux (B) assays. Cells were infected with Mock or Snail-expressing Ad vector for 3 days and then treated with 10 nM Ent containing medium for 4 days under cell culture conditions. In uptake assay, HCC827 cells were incubated with 10  $\mu$ M Rho123 for 60 min at 37°C. In efflux assay, 10  $\mu$ M Rho123 was loaded to HCC827 cells for 15 min at 4°C and cells were then incubated in Opti-MEM without Rho123 for 30 min at 37°C. Each value is the mean  $\pm$  S.D. (n = 3-5 for uptake assay and n = 3 for efflux assay). \* p < 0.05, \*\* p < 0.01 significant difference. N.S. indicates no significant difference.

### 3-2-4 Ent が P-gp の基質となるか否かについての検討

前項までの結果から、10 nM の Ent 処理は弱いながらも Snail 過剰発現時の EMT マーカーの発現変動に対して抑制作用を示し、さらに P-gp の活性化を抑制することが示唆された。一方で、従来までに P-gp の機能を抑制することが報告されている薬物のほとんどが P-gp の基質となり競合阻害を起こすことで、P-gp の活性を抑制することが明らかになっている<sup>17</sup>。そこで、Ent が P-gp の基質となり得るかを評価することとした。

ブタ腎尿細管細胞(LLC-PK1)およびその P-gp 過剰発現細胞(LLC-GA5COL150)を用いて Ent の細胞内蓄積量を評価したところ、LLC-PK1 および LLC-GA5COL150 の間で差は認められなかった(LLC-PK1:  $0.036 \pm 0.004$  mL/mg protein および LLC-GA5COL150:  $0.038 \pm 0.004$  mL/mg protein)。また、Elc 併用群においてもその蓄積量に変化は認められなかった(LLC-PK1+Elc:  $0.044 \pm 0.013$  mL/mg protein および LLC-GA5COL150+Elc:  $0.035 \pm 0.011$  mL/mg protein) (Fig. 3-4 A)。同様の細胞を用いて Rho123 の細胞内蓄積量を評価したところ、LLC-PK1 と比較して LLC-GA5COL150 における蓄積量は低値を示した(LLC-PK1:  $0.046 \pm 0.004$  mL/mg protein および LLC-GA5COL150:  $0.023 \pm 0.001$  mL/mg protein)。一方で、Elc を併用したところ両細胞における Rho123 蓄積量は顕著に増加した(LLC-PK1+Elc:  $0.077 \pm 0.005$  mL/mg protein および LLC-GA5COL150+Elc:  $0.075 \pm 0.006$  mL/mg protein) (Fig. 3-4 B)。

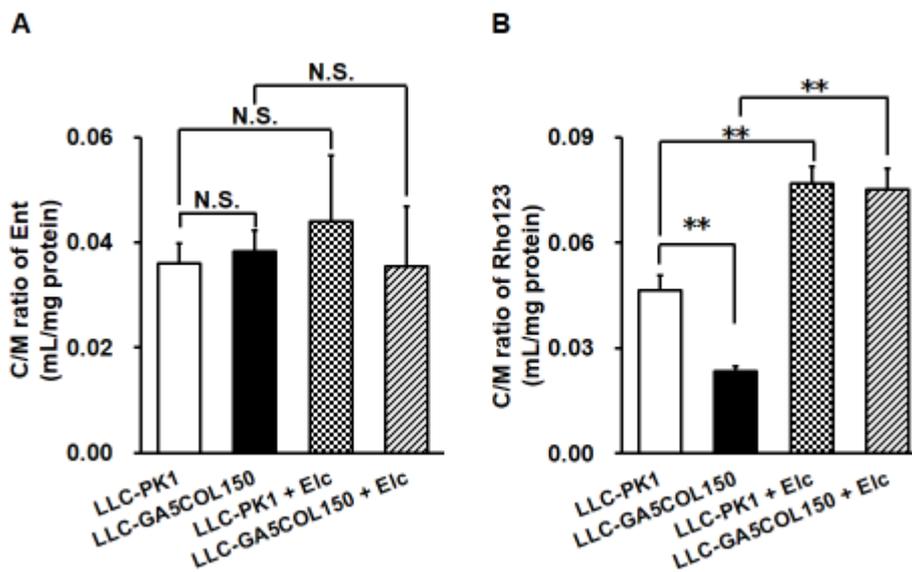


Figure 3-4 Transport evaluation of Ent (A) and Rho123 (B) in LLC-PK1 and LLC-GA5COL150 cells.

LLC-PK1 and LLC-GA5COL150 cells were incubated with 50  $\mu$ M Ent (A) or 10  $\mu$ M Rho123 (B) with or without 10  $\mu$ M Elc for 30 min at 37°C. Each value is the mean  $\pm$  S.D. (n = 6). \* p < 0.05, \*\* p < 0.01 significant difference.

### 第3節 考察

第2章の結果を受け、本章では EMT を抑制する作用が報告されている HDAC 阻害薬である Ent が、EMT と共に P-gp の活性化を抑制するか否かについて検討を行った。

これまでに HDAC 阻害薬を用いることにより P-gp の遺伝子発現レベルでの調節を介した機能亢進が起り、がんの薬物耐性を招くことが示唆されている<sup>71,72</sup>。さらにそれらは HDAC の阻害効果に基づく変化であることも示唆されている<sup>73</sup>。これらのことから、本章ではまず Ent による細胞毒性および、HDAC 阻害作用の指標となる AcH3 の増加を認めない濃度を見出すことに着手した。その結果、Ent は 100 nM 以下の濃度においては、細胞毒性および AcH3 の増加を示さないことが明らかになった(Fig. 3-1 A および B)。それらの結果から、10 nM の Ent を用いて Snail 過剰発現により誘導された EMT の抑制作用について検討したところ、Ent は部分的に EMT マーカーの発現変動を抑制することが見出された(Fig. 3-2 A および B)。一方で Ent 処理の有無は、Snail および P-gp の発現には影響を与えなかった(Fig. 3-2 C および D)。興味深いことに、Ent 処理を行った Mock 細胞と Snail 過剰発現細胞の P-gp 発現量の間には有意な差が認められた(Fig. 3-2 D)。これまでに Huang らは、ヒト食道扁平上皮がん細胞に対する Ent 処理により、P-gp の発現量が低下することを見出している<sup>74</sup>。また本検討より、Snail の過剰発現により P-gp の発現量が抑制される傾向が認められた。これらのことから、Ent 処理および Snail 過剰発現の協奏的な作用により P-gp mRNA の有意な低下を示したと考えられた。上記の条件下において P-gp の活性に対する影響を評価したところ、Ent 処理は Rho123 の蓄積量を Snail 過剰発現細胞においてのみ顕著に増加させた。また、Mock 細胞に比較して Snail 過剰発現細胞において Rho123 の排出を強く抑制した。以上のことから、Ent は Snail 過剰発現細胞における P-gp の活性を強く抑制することが示された。

従来の P-gp 機能調節作用を持つ化合物の多くは基質または阻害薬として作用するため、がん細胞の P-gp を制御する際に正常組織の P-gp も阻害する。その結果、併用している P-gp 基質抗がん薬の排泄遅延などの薬物-薬物間相互作用を引き起こし、抗がん薬由来の毒性が発現することが認められている<sup>75-77</sup>。さらに、P-gp に対する親和性が低い阻害薬の場合、がん細胞の P-gp を阻害するためには高い血中濃度が必要とされ、阻害薬由来の副作用が発現する<sup>78</sup>。本章では Ent が P-gp の基質となり得るかについて LLC-GA5COL150 を用いて評価したが、蓄積量の低下は認められなかった(Fig. 3-4 A)。一方、P-gp の典型的な基質である Rho123 においては蓄積量の低下が認められた(Fig. 3-4 B)。このことよ

り Ent は P-gp の基質にはなりにくいものと推察された。

本章では 10 nM の Ent が、Snail 過剰発現時における EMT および P-gp の活性化を抑制する可能性を示した。Shah らの報告では、Ent の曝露により E-cadherin の転写が亢進する際に、Snail の E-cadherin プロモーターへの結合が低下することを示している<sup>66</sup>。また本検討において、Snail 過剰発現細胞に対する Ent の曝露は Snail および P-gp の発現量には影響を与えなかった(Fig. 3-2 C および D)。従って Ent は、P-gp の機能を調節する因子のプロモーターへの Snail の結合抑制を介し、間接的に P-gp 活性化を抑制した可能性が推察された。また近年 Ent は、HDAC 阻害作用に依存しない、リシンアセチル化経路に対する作用を介してタンパクの機能を変化させることも示唆されており、これらのメカニズムも P-gp の活性化抑制に関与していることが推察された<sup>79</sup>。

Ent は NSCLC や乳がん、白血病などに対する抗がん薬として臨床試験が進められており、多くの試験において単剤ではなく他の抗がん薬と併用されている。例えば、NSCLC、乳がんおよび白血病に対してそれぞれ erlotinib、exemestane、5-azacytidine との併用試験が行われている。E-cadherin の発現量が高い NSCLC 患者に対しては erlotinib 単独と比較して、生存率を改善することが報告されている<sup>61</sup>。

本検討では Ent による P-gp の発現や機能亢進が起こる可能性を考え、10 nM の Ent による検討を行った。その結果、Shah らが 1  $\mu$ M の Ent を用いて示したような顕著な EMT の抑制は認められず、部分的であった。そのため、今後より高濃度の Ent を用いることで、P-gp の機能および EMT を効率的に抑制できるかを検討する価値があると考えられた。一方で 10 nM の Ent は、P-gp の発現量に影響なく、Snail 過剰発現細胞における P-gp 機能を有意に抑制した。このことは、併用薬として低用量の Ent を用いることで P-gp を介した抗がん薬耐性を抑え、治療効果を高めることができる可能性を示している。

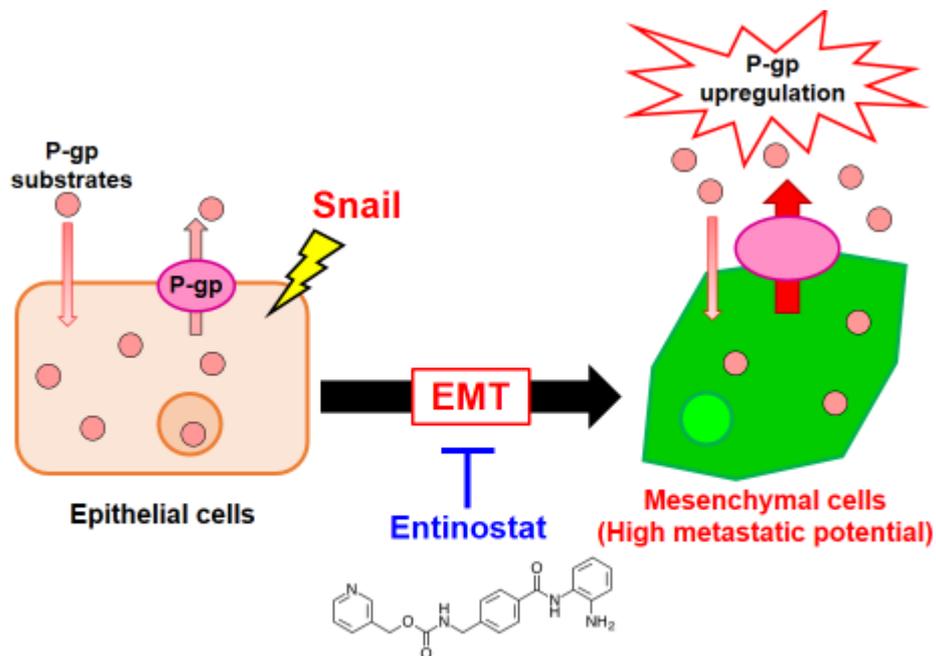
## 第 4 節 小括

第 3 章の結果より、以下の知見が得られた。

1. HDAC 阻害薬 **Ent** は 10 nM の濃度においては細胞毒性および **AcH3** の増加を示さないものの、**Snail** 誘発性の **EMT** を部分的に抑制することが明らかになった。
2. 第 2 章同様に、**Snail** 過剰発現時に **P-gp** の活性化が認められたが、その活性化は **Ent** 処理により抑制された。
3. ブタ腎尿細管細胞株である LLC-PK1 およびその **P-gp** 過剰発現細胞株である LLC-GA5COL150 を用いた検討により、**Ent** は **P-gp** の基質ではないことが示唆された。

以上のことから、本検討に用いた 10 nM の **Ent** は **Snail** 過剰発現による **EMT** を部分的に抑制するとともに、その際の **P-gp** 機能亢進も抑制することが明らかになった。一方で、**Ent** 自体は **P-gp** の基質になりにくいと考えられたことから、上述した **P-gp** 活性抑制作用は競合阻害によるものではないと考えられた。

第 1 章で論じたように、がんにおける **EMT** は転移を亢進させることが示唆されている。また、**P-gp** の発現や機能亢進はがんの薬物耐性能を亢進することが明らかになっている。従って本章の結果から、**Ent** は **Snail** 過剰発現による **EMT** とそれに伴う **P-gp** 活性化の双方を抑制することにより、がんの悪性化を抑制しかつ、抗がん薬治療の効果を高めることが期待される薬物であると考えられた(Scheme 2)。



Scheme 2: Supposed effect of Ent on P-gp upregulation in Snail expressing cells.

Ent suppresses both EMT and P-gp upregulation in Snail expressing cells. Ent preferentially suppresses P-gp activity in Snail expressing cells. In other words, it may be a selective P-gp inhibitor against malignant cancer cells.

## 第4章 Snail 過剰発現時の P-gp 活性化における caveolin-1 の関与

### 第1節 序

第2章の結果から、HCC827においてEMTを引き起こすSnail過剰発現時には、同時にP-gpの機能亢進が起こることが明らかになった。一方で、その活性化機構はP-gp発現量の上昇によるものではなく、輸送活性の変化によるものと推察された。これまでにP-gpの細胞膜上、特にcaveolaeでの機能発現に関与する因子としてcaveolin-1が同定されている<sup>80,81</sup>。Caveolaeは細胞膜の中でもコレステロールやスフィンゴミエリンを多く含む画分であり、受容体をはじめとして様々なシグナル伝達因子が集積することが明らかになっている<sup>82</sup>。Caveolin-1はcaveolaeにおいて様々な因子と相互作用しそれらの活性を負に制御するcaveolaeの主要な構成因子であり、コレステロールのホメオスタシスや細胞増殖、細胞接着などに寄与している<sup>83-86</sup>。また、がん細胞の耐性化においてはcaveolin-1自体の発現上昇は起こらないものの、P-gpの活性が変化することが報告されている<sup>87,88</sup>。さらにJodoinらの報告によれば、P-gpの遺伝子変異体を作成することによりcaveolin-1とP-gpの相互作用を阻害した際に、P-gpの輸送活性が上昇することが明らかになっている<sup>89</sup>。またLeeらは、caveolin-1の176番目のリシンをアルギニンに変えることにより、P-gpとの相互作用を阻害するとP-gpが活性化し抗がん薬の効果が低下することを示している<sup>90</sup>。さらにBarakatらは、tyrosine kinaseの一つであるSrcがcaveolin-1の14番目のチロシンをリン酸化し活性化することに注目している。その検討では、Srcによりリン酸化されるcaveolin-1のチロシンをフェニルアラニンに変異させることによりリン酸化を抑制した際に、P-gpとの相互作用が低下し、P-gpの機能低下が抑制されることを見出している<sup>91</sup>。従って、caveolin-1のリン酸化体とP-gpの相互作用はP-gpの総発現量には影響を与えず、その機能を負に制御すると考えられる。これらのことから本章では、Snail過剰発現時のcaveolin-1およびそのチロシンリン酸化体に注目し、P-gp活性化機構の解明を試みた。

## 第2節 結果

### 4-2-1 Snail 過剰発現が caveolin-1 に与える影響

第2章と同様に Snail を過剰発現させた HCC827 を用いて、caveolin-1 の mRNA 発現量を RT-qPCR により評価した。また、caveolin-1 のリン酸化体の発現が P-gp の活性を抑制することから、Western blotting により caveolin-1 およびその 14 番目のチロシンリン酸化体である phosphorylated caveolin-1 (p-caveolin-1) のタンパク量を評価した。その結果、caveolin-1 の mRNA 発現量は Mock 細胞および Snail 過剰発現細胞の間で変化は認められなかった (Mock 細胞:  $1.01 \pm 0.12$  および Snail 過剰発現細胞:  $0.93 \pm 0.24$ ) (Fig. 4-1 A)。さらに caveolin-1 の総タンパク発現に変化は認められなかったものの、Snail 過剰発現細胞において p-caveolin-1 の減少が認められた (Fig. 4-1 B)。

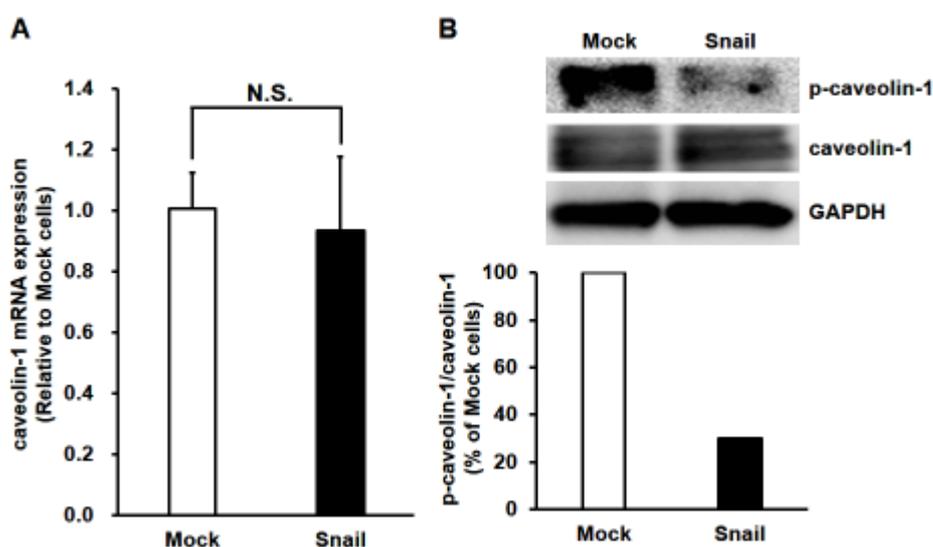


Figure 4-1 Effects of Snail expression on caveolin-1 and phosphorylated caveolin-1 levels in HCC827 cells.

(A) mRNA expression levels of caveolin-1. The data are mean  $\pm$  S.D. (n=7). N.S. indicates no significant difference. (B) Western blot analysis of phosphorylated caveolin-1 (p-caveolin-1) (22 kDa), caveolin-1 (22 kDa) and GAPDH (37 kDa) levels in HCC827 cells. Band densities were determined with a Luminescent Image Analyzer LAS-3000, and p-caveolin-1 density were normalized by caveolin-1 density. GAPDH was used as a loading control.

#### 4-2-2 Snail 過剰発現細胞における paclitaxel 耐性化に対する PP2 の効果

前項の結果および過去に報告された知見より、Snail 過剰発現時には P-gp の機能を抑制する p-caveolin-1 の発現が低下し、その結果 P-gp の機能亢進が起こることが推察された。Caveolin-1 は、Src により 14 番目のチロシンがリン酸化され p-caveolin-1 となる<sup>92</sup>。そこで Src の阻害薬である PP2 を用いて、p-caveolin-1 の減少と P-gp の機能の関連を評価した。

その結果、抗がん薬 paclitaxel 曝露後の Mock 細胞における生存率低下は、PP2 を併用することで有意に改善した。一方で、Snail 過剰発現細胞の細胞生存率は、PP2 添加の有無による影響は認められなかった(Mock 細胞: 42.5 ± 5.3%、Snail 過剰発現細胞: 74.8 ± 6.2%、Mock 細胞+PP2: 88.2 ± 9.4%および Snail 過剰発現細胞+PP2: 73.5 ± 5.1%) (Fig. 4-2)。

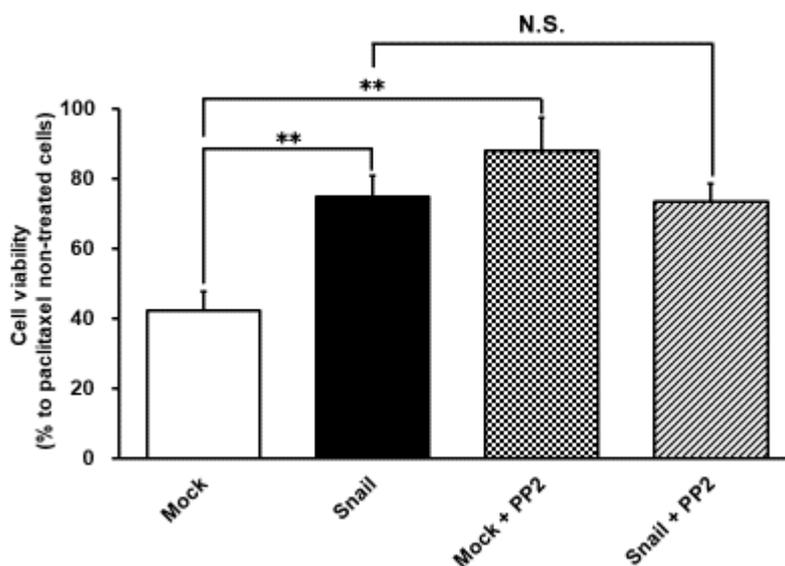


Figure 4-2 Effects of Src inhibitor PP2 on viability of paclitaxel-treated HCC827 cells.

Mock and Snail-expressing cells were incubated with 30 nM paclitaxel with or without 10 μM PP2 for 3 days under cell culture conditions. Cell viability (%) was calculated based on the cell viability without 30 nM paclitaxel in each group as 100%. The data are mean ± S.D. (n = 10). \*\*p < 0.01 significant difference. N.S. indicates no significant difference.

#### 4-2-3 Snail 誘発性 EMT 時における caveolin-1 リン酸化調節因子の解析

Snail は転写因子であることから、これまでに示してきた caveolin-1 のリン酸化を直接制御している可能性は低いと考えられる。そこで、Snail が他の制御因子を介して間接的に caveolin-1 のリン酸化を制御していると考え、caveolin-1 のリン酸化を調節する Src、focal adhesion kinase 1 (FAK1) および growth factor receptor-bound protein 2 (GRB2) の mRNA 発現量を RT-qPCR により評価した。

その結果、Src および FAK1 の mRNA 発現量は、Mock 細胞および Snail 過剰発現細胞間で変化は認められなかった (Fig. 4-3 A および B)。一方で、それらのリン酸化や複合体形成を調節する GRB2 のみ Snail 過剰発現細胞における mRNA 発現量の低下が認められた (Mock 細胞:  $1.00 \pm 0.04$  および Snail 過剰発現細胞:  $0.78 \pm 0.08$ ) (Fig. 4-3 C)。

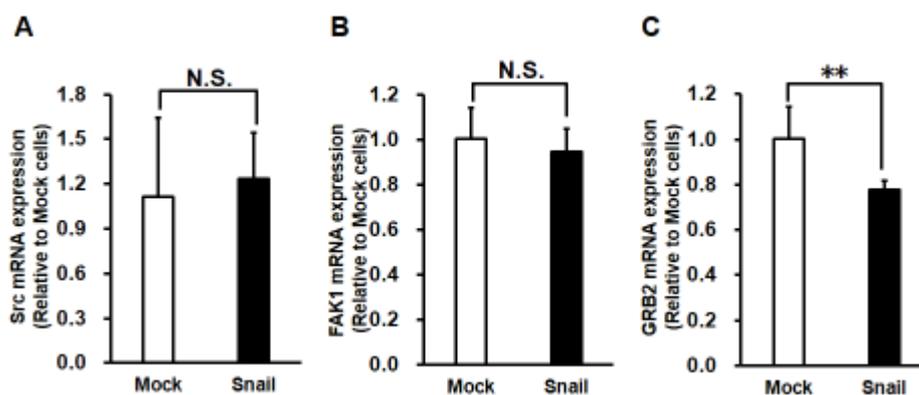


Figure 4-3 Effects of Snail expression on caveolin-1 phosphorylation-associated factors.

mRNA expression levels of Src (A), FAK1 (B) and GRB2 (C) are shown as mean  $\pm$  S.D. (n = 3 or 4). \*\*p < 0.01 significant difference. N.S. indicates no significant difference.

### 第3節 考察

これまでに Barakat らは p-caveolin-1 が P-gp の機能を抑制することを見出している<sup>91</sup>。この報告を受け本章では、Snail 過剰発現時の P-gp 活性化に caveolin-1 が関与しているか否かを評価した。その結果 Snail 過剰発現細胞において、P-gp の機能を抑制する p-caveolin-1 の低下が認められた(Fig. 4-1 B)。また、paclitaxel 曝露後の細胞生存率は Src 阻害薬である PP2 を用いることにより、Mock 細胞でのみ上昇が認められた(Fig. 4-2)。この結果は、Mock 細胞では p-caveolin-1 が十分に存在し P-gp 活性が抑制されており、PP2 処理により p-caveolin-1 が減少し、P-gp が活性化したと推察された。一方で、Snail 過剰発現細胞では p-caveolin-1 が低下しているため、PP2 処理による p-caveolin-1 の減少の影響が認められなかったと考えられた。これらのことから Snail 過剰発現時には、p-caveolin-1 の減少を介した P-gp 活性化が起きており、その caveolin-1 のリン酸化の制御には Src が関与していると考えられた。

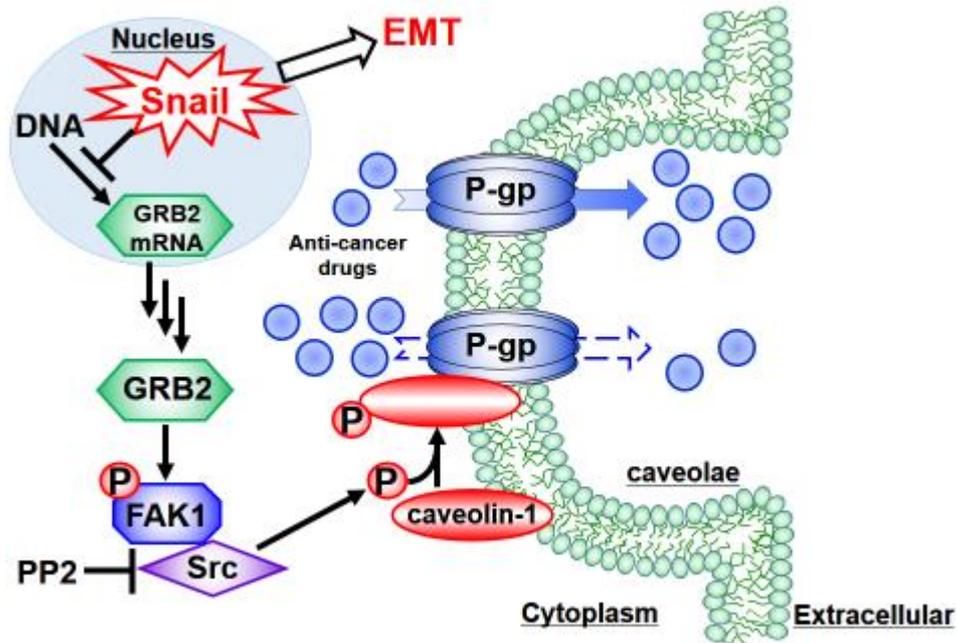
Caveolin-1 のリン酸化には Src が関与し<sup>82</sup>、Src は FAK1 などと複合体を形成することでリン酸化体(不活性型)の形成が抑制される<sup>93</sup>。また、FAK1 は GRB2 により活性化されることでリン酸化が亢進し、Src との複合体を形成する。一方で、GRB2 の発現抑制によりこれらの複合体が減少することも明らかになっている<sup>94</sup>。そこで Snail 過剰発現時におけるこれらの因子の mRNA 発現変動を評価したところ、GRB2 の mRNA 発現量のみが減少していた(Fig. 4-3)。これまでに Snail による GRB2 の転写調節は報告されていないものの、Mistry らは Snail ファミリーの一つである Slug が GRB2 の転写調節部位に結合することを明らかにしている<sup>95</sup>。Slug と同様に Snail は E-Box 配列を標的とし様々な因子の転写調節を行っていることから、本検討における Snail 過剰発現時に Snail が GRB2 の転写調節領域に結合していることが予測される。従って、Snail 過剰発現時においては GRB2 の発現低下により FAK1 と Src の複合体が減少し、Src が不活性化したことにより caveolin-1 のリン酸化体の減少および P-gp の機能亢進が起きたと推察された。しかしながら本検討では、Snail 過剰発現時における FAK1 および Src の複合体量や、PP2 処理による p-caveolin-1 量の変化、P-gp の輸送活性変化については検討を行っていない。さらに Mistry らの報告から推測される Snail による直接的な GRB2 の転写調節については未だに明らかにされておらず、chromatin immune-precipitation (ChIP) assay などによる解析が必要であると考えられた。

## 第4節 小括

第4章の結果より、以下の知見が得られた。

1. Snail 過剰発現時には、P-gp の機能抑制因子である p-caveolin-1 の減少が認められた。一方で、caveolin-1 の mRNA および総タンパク発現量には変化が認められなかった。
2. Caveolin-1 のリン酸化を制御する Src の阻害薬である PP2 により、Mock 細胞でのみ paclitaxel 曝露後の細胞生存率の有意な改善が認められた。一方で、Snail 過剰発現細胞においては PP2 の添加による細胞生存率の変化は認められなかった。
3. Snail 過剰発現時には、Src および FAK1 の複合体形成に關与する GRB2 の mRNA 発現量の低下が認められた。

本章の結果は、Snail の過剰発現時における P-gp の活性化は、GRB2 の発現低下により、Src および FAK1 複合体量の低下が生じ p-cavolin-1 が減少することで起こるといふ一つのメカニズムの可能性を示した(Scheme 3)。



Scheme 3: Proposed scheme of Snail-induced drug resistance via P-gp activation.

Snail expression induces not only cancer EMT, but also reduction of GRB2 transcription, leading to P-gp-mediated multi drug resistance by blocking caveolin-1 phosphorylation.

## 第 5 章 Snail 過剰発現時の P-gp 活性化における ezrin、radixin、moesin (ERM) の関与

### 第 1 節 序

第 2 章の結果から、HCC827 における Snail 誘発性 EMT 時には、同時に P-gp の機能亢進が起こることが明らかになった。一方で、その活性化機構は P-gp 発現量の上昇によるものではなく、活性自体の変化によるものと推察された。第 4 章では、細胞膜上で P-gp と相互作用することにより P-gp の排出活性の低下を引き起こす caveolin-1 に着目した。一方で、P-gp の機能発現には細胞膜上への局在が必要であることから、細胞膜上への発現調節を担う因子もまた P-gp の活性発現に重要な役割を果たす。従って、Snail 過剰発現時にそれらの因子の発現変動が生じ、P-gp の機能亢進に関与している可能性が考えられる。そこで本章では、P-gp の細胞膜上局在の調節因子である ezrin (Ezr)、radixin (Rdx) および moesin (Msn) から成る ERM に着目した。ERM はリン酸化されることにより活性化され、C-末端側で F-actin などの細胞骨格タンパクと、N-末端側でトランスポーターなどの膜上タンパクと結合し、膜上タンパクの細胞膜上へのソーティングや細胞膜上での安定性を亢進させることが明らかになっている<sup>96</sup>。すでに P-gp と ERM の関連については様々な研究が行われており、その関連性は組織ごとに異なることが示唆されている<sup>97-101</sup>。例えば、血液脳関門においては Ezr<sup>97</sup> または Msn<sup>98</sup>、肝臓では Rdx<sup>99</sup>、消化管においては Ezr<sup>100</sup> または Rdx<sup>101</sup> が P-gp の機能調節に関わることが報告されている。ERM は正常組織だけでなく、がん組織における P-gp 機能調節も担うことが報告されており、組織特異的な P-gp 機能制御のための標的として着目されている<sup>102</sup>。一方で ERM はがんの転移にも関与し、異常な ERM の局在や発現はがんの予後を不良にすることや EMT を誘導することが報告されている<sup>96,103</sup>。また、Wang らは、乳がん組織および乳腺がん細胞を用いた検討において、Snail と Msn の発現が相関することを明らかにしている<sup>104</sup>。

しかしながら、上述したように EMT により ERM の発現が変化することは報告されているものの、その ERM の発現変化が P-gp の機能を調節するか否かは明らかになっていない。そこで本章では、Snail の過剰発現により EMT を誘導した HCC827 における ERM 発現変動および、その発現変動が P-gp の機能に与える影響について解析した。

## 第2節 結果

### 5-2-1 Snail 過剰発現時の ERM 発現変動

まず、Snail を過剰発現させた HCC827 における ERM の遺伝子発現量を RT-qPCR により評価したところ、Mock 細胞と比較して Snail 過剰発現細胞における Ezr、Rdx および Msn の発現量はそれぞれ、 $0.84 \pm 0.06$ 、 $1.19 \pm 0.03$  および  $2.33 \pm 0.44$  であった(Fig. 5-1 A-C)。特に顕著に発現上昇が認められた Msn についてタンパク発現を評価したところ、タンパク発現においても増加が認められた(Fig. 5-1 D および E)。

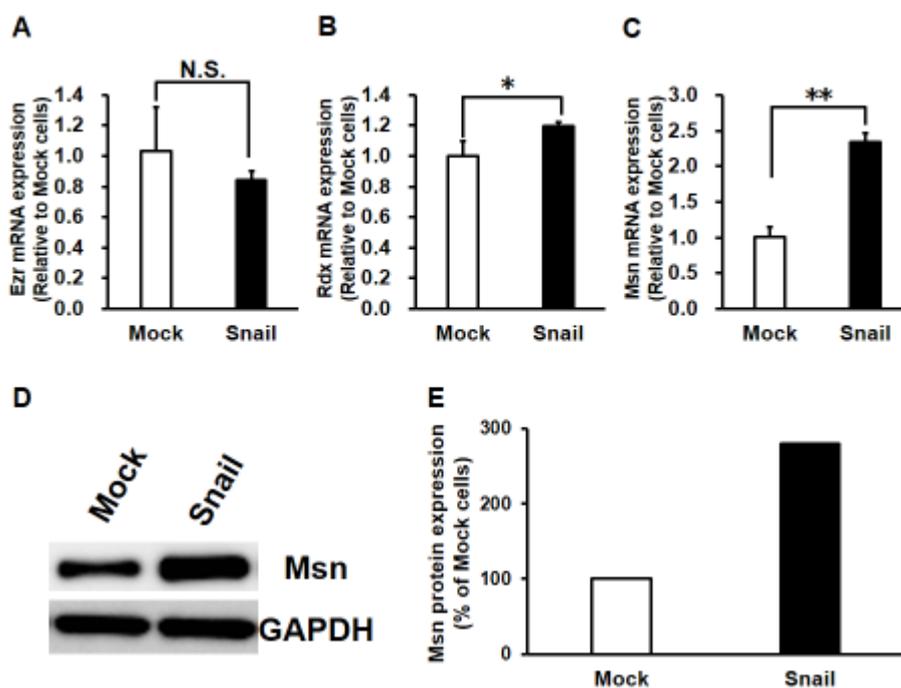


Figure 5-1 Effects of Snail expression on Ezr (A), Rdx (B) and Msn (C) mRNA and Msn protein (D and E) expression levels in HCC827 cells.

mRNA expression levels of Ezr (A), Rdx (B) and Msn (C) are shown as mean  $\pm$  S.D. (n = 3 or 4). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  significant difference. N.S. indicates no significant difference. Western blot analysis of Msn (77 kDa) and GAPDH (37 kDa) in HCC827 whole cell lysate (D and E). Band densities were determined with a Luminescent Image Analyzer LAS-3000, and Msn densities were normalized by GAPDH.

## 5-2-2 HCC827 における moesin (Msn) knockdown の効果

前項までの結果より Snail を過剰発現した HCC827 においては、ERM のうち Rdx および Msn の発現上昇が認められ、特に Msn の発現上昇が顕著であった。そこで、Snail 過剰発現時の P-gp 活性化に対する Msn の関与を明らかにするため、siRNA を用いて Msn の発現抑制を試みた。RT-qPCR により Msn の mRNA 量を評価したところ、negative control siRNA (N.C.) を transfect したときには Mock 細胞に比較し、Snail 過剰発現細胞において Msn の有意な発現上昇が認められた (Mock 細胞+N.C.:  $1.03 \pm 0.09$  および Snail 過剰発現細胞+N.C.:  $3.48 \pm 0.99$ )。一方で、Msn に対する siRNA (siMsn) を transfect した際には、Mock 細胞および Snail 過剰発現細胞の両細胞において N.C. transfect 細胞に対して有意な Msn mRNA 発現量の低下を認めた (Mock 細胞+siMsn:  $0.20 \pm 0.07$  および Snail 過剰発現細胞+siMsn:  $0.52 \pm 0.17$ ) (Fig. 5-2 A)。Western blotting により Msn のタンパク発現を評価したところ、mRNA の結果と同様に、N.C. を transfect した Mock 細胞と比較して Snail 過剰発現細胞において Msn の発現増加が認められ、siMsn の transfect により Mock 細胞および Snail 過剰発現細胞における Msn の発現低下が認められた (Fig. 5-2 B)。

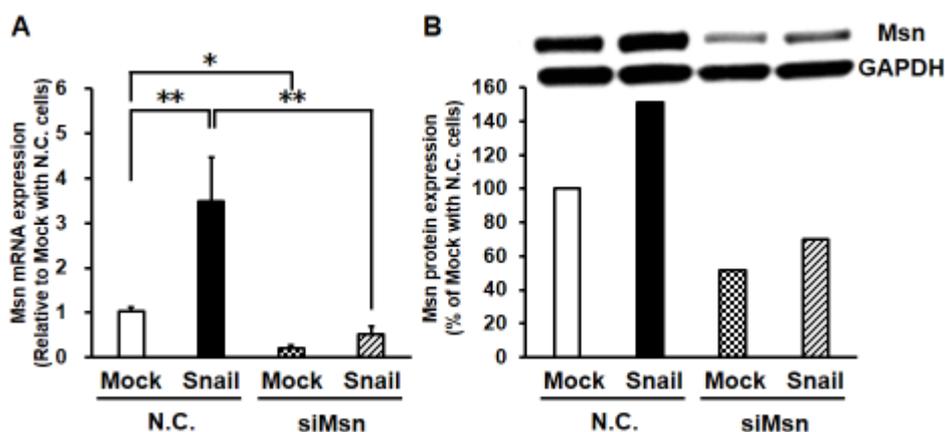


Figure 5-2 Effects of Msn silencing on Msn mRNA (A) and protein (B) expression levels in HCC827 cells.

Mock and Snail-expressing HCC827 cells were transfected 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) mRNA expression levels of Msn are shown as mean  $\pm$  S.D. (n = 6). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  significant difference. (B) Protein expression levels of Msn (77 kDa) in HCC827 cells whole cell lysate. Msn densities were normalized by GAPDH (37 kDa).

### 5-2-3 Snail 過剰発現細胞における Msn knockdown による P-gp 活性抑制

前項の結果から、Mock 細胞および Snail 過剰発現細胞における Msn の knockdown が確認できたため、これらの細胞を用いて Rho123 の efflux assay を行った。その結果、Snail 過剰発現細胞における Rho123 の排出速度は Msn knockdown により有意に抑制された (Mock 細胞+N.C.:  $5.34 \pm 0.63$  nmol/min/g protein、Snail 過剰発現細胞+N.C.:  $21.73 \pm 3.30$  nmol/min/g protein、Mock 細胞+siMsn:  $6.34 \pm 0.25$  nmol/min/g protein および Snail 過剰発現細胞+siMsn:  $10.93 \pm 0.34$  nmol/min/g protein) (Fig. 5-3 A)。さらに、Mock 細胞および Snail 過剰発現細胞における受動拡散による Rho123 の細胞外流出を評価したところ、ほとんど変化は認められなかった (Mock 細胞+N.C.:  $2.65 \pm 0.42$  nmol/min/g protein および Snail 過剰発現細胞+N.C.:  $1.69 \pm 2.92$  nmol/min/g protein) (Fig. 5-3 B)。

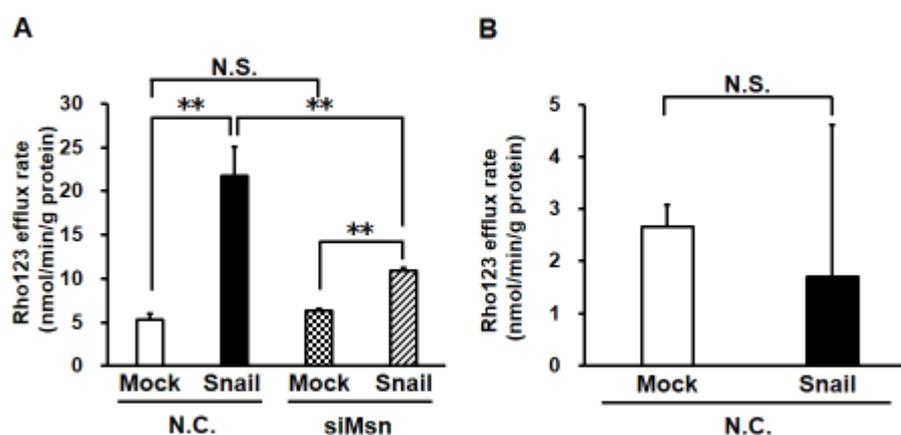


Figure 5-3 Effects of Msn silencing on Snail-induced upregulation of P-gp efflux activities in HCC827 cells.

Mock and Snail-expressing HCC827 cells were transfected 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  $\mu$ M Rho123 was loaded to HCC827 cells for 30 min at 4°C and cells were then incubated in Opti-MEM without Rho123 for 10 min at 37°C (n = 4-6). (B) In Rho123 passive diffusion assay, 10  $\mu$ M Rho123 was loaded to HCC827 cells for 30 min at 4°C and cells were then incubated in Opti-MEM without Rho123 for 10 min at 4°C (n = 5). Data are shown as mean  $\pm$  S.D. \*\* p < 0.01 significant difference. N.S. indicates no significant difference.

#### 5-2-4 Paclitaxel 耐性化に対する Msn knockdown の影響

第 2 章の結果から、Snail 過剰発現時には、P-gp の活性化に伴い paclitaxel に対する耐性化が認められた。一方で、前項までの結果から Msn の knockdown により、Snail 過剰発現細胞における P-gp の活性化を抑制することが可能であることが見出された。そこで Msn knockdown により Snail 過剰発現細胞における paclitaxel 耐性化を克服することが可能か否かを検討した。その結果、3 $\mu$ M paclitaxel を曝露した後の生存率は、N.C.処理群では Mock 細胞に対して Snail 過剰発現細胞において高い生存率が認められた。さらに Snail 過剰発現細胞における生存率は、Msn knockdown により有意に低下した。一方で、Mock 細胞においては Msn knockdown による生存率の変化は認められなかった(Mock 細胞+N.C.: 52.1  $\pm$  5.5%、Snail 過剰発現細胞+N.C.: 72.8  $\pm$  10.1%、Mock 細胞+siMsn.: 50.5  $\pm$  3.6%および Snail 過剰発現細胞+siMsn.: 33.4  $\pm$  6.6%) (Fig. 5-4)。

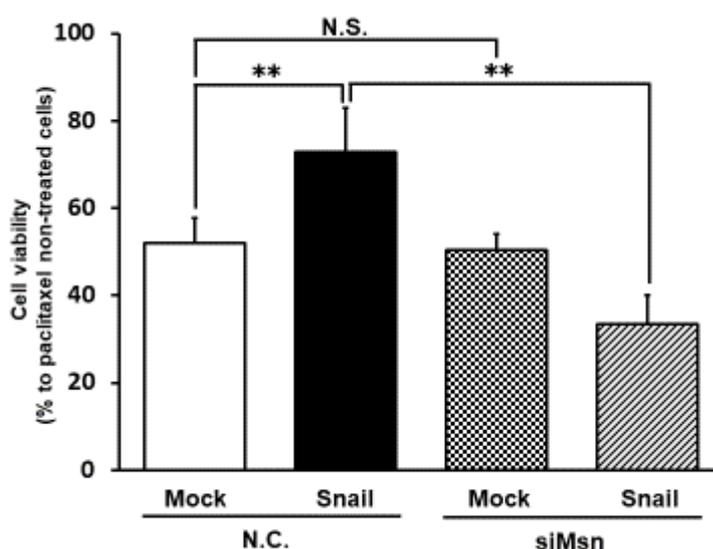


Figure 5-4 Effects of Msn silencing on Snail-induced paclitaxel resistance of HCC827 cells.

Mock and Snail-expressing HCC827 cells were transfected with negative control siRNA (N.C.) or Msn targeting siRNA (siMsn) for 3 days. Cells were then cultured with fresh medium for 3 days. Cells were treated with 3  $\mu$ M paclitaxel for 4 days under cell culture conditions. Cell viability (%) was calculated based on survival without 3  $\mu$ M paclitaxel in each group as 100%. The data are mean  $\pm$  S.D. (n = 5). \*\*p<0.01 significant difference. N.S. indicates no significant difference.

### 5-2-5 Msn knockdown が Snail 誘発性 EMT に与える影響

これまでの結果から、Snail 過剰発現細胞における P-gp の排出活性の亢進は Msn により調節されていることが示唆された。一方でこれまでに ERM は EMT 化に関与する因子であると報告されている<sup>96,103</sup>ことから、Msn の knockdown 時に Snail による EMT の誘導が影響を受けている可能性がある。そこで Msn knockdown 時における Snail による EMT の誘導を評価した。

その結果 N.C.および Msn knockdown のいずれの処理においても、Snail 過剰発現による E-cadherin や occludin、claudin-1 の mRNA 発現低下は認められなかった(Data not shown)。従って、それらが siRNA 処理による影響を受けていると考え、上皮系細胞マーカーの一つとして知られている keratin 18 (KRT18)の mRNA 量を評価した。KRT18 の mRNA 発現量は、N.C. (Mock 細胞+N.C.:  $1.00 \pm 0.11$  および Snail 過剰発現細胞+N.C.:  $0.73 \pm 0.13$ ) (Fig. 5-5 A-左)および Msn knockdown (Mock 細胞+siMsn:  $0.99 \pm 0.29$  および Snail 過剰発現細胞+siMsn:  $0.63 \pm 0.14$ ) (Fig. 5-5 A-右)いずれの処理においても Snail 過剰発現細胞において低下することが明らかになった。さらに間葉系細胞マーカーである vimentin の mRNA 発現量を評価したところ、N.C. (Mock 細胞+N.C.:  $1.02 \pm 0.24$  および Snail 過剰発現細胞+N.C.:  $11.10 \pm 4.27$ ) (Fig. 5-5 B-左)および Msn knockdown (Mock 細胞+siMsn:  $4.54 \pm 0.46$  および Snail 過剰発現細胞+siMsn:  $20.21 \pm 6.38$ ) (Fig. 5-5 B-右)のいずれの処理においても Snail 過剰発現細胞において上昇することが明らかになった。

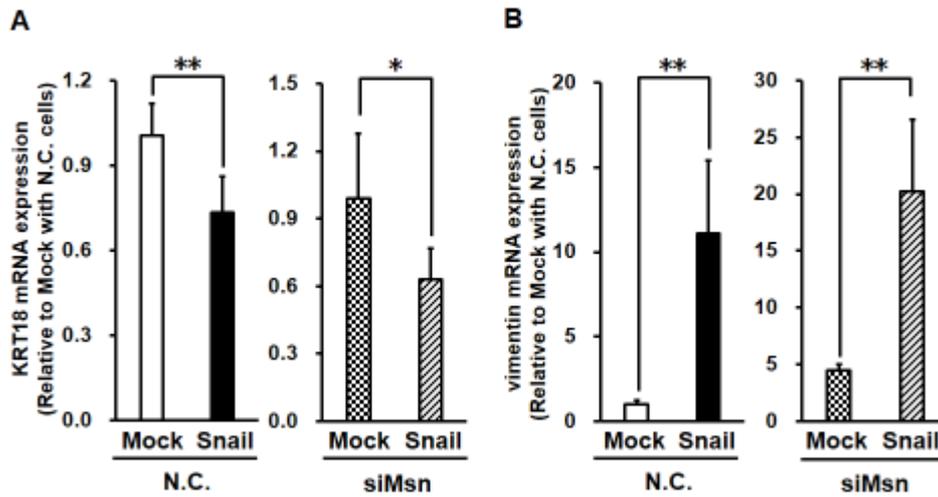


Figure 5-5 Effects of Msn silencing on mRNA expression levels of KRT18 (A) and vimentin (B).

Mock and Snail-expressing HCC827 cells were transfected with negative control siRNA (N.C.) or Msn targeting siRNA (siMsn) for 3 days. Cells were then cultured with fresh medium for 3 days. mRNA expression levels of KRT18 and vimentin are shown as mean  $\pm$  S.D. (n = 4-6). \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01 significant difference.

### 第3節 考察

本章では、Snail 過剰発現時における P-gp の活性化に対する ERM の関与について検討を行った。その結果、ERM のうち特に Msn の発現が顕著に上昇することが、mRNA およびタンパク発現解析において明らかになった(Fig. 5-1 A-E)。この結果は、Wang らの乳がん細胞株での報告と一致している<sup>104</sup>。これらのことから、Snail の発現は NSCLC 細胞である HCC827 においても Msn の発現を亢進させることが明らかになった。また、siRNA により Msn を knockdown した細胞を用いて Rho123 の排出速度を評価したところ、Snail 過剰発現による排出速度の上昇は Msn knockdown により有意に抑制された。一方で、Mock 細胞における排出速度は Msn の knockdown による影響を受けなかった(Fig. 5-3 A)。さらに、paclitaxel 曝露後の細胞生存率を評価したところ、Snail 過剰発現細胞は Mock 細胞と比較して有意に高い生存率を示した。この生存率は Msn の knockdown により有意に低下した。しかしながら、Mock 細胞においては Msn の knockdown による生存率の変化は認められなかった(Fig. 5-4)。以上のことから、Snail 過剰発現細胞における P-gp の活性化においてのみ Msn が関与していると推察された。また、Msn knockdown 時においても Snail の発現により EMT が誘導されるか否かについて検討したところ、Mock 細胞と比較して Snail 過剰発現細胞において KRT18 の発現低下および vimentin の発現上昇が認められた(Fig. 5-5 A および B)。よって、Msn を knockdown した際にも Snail の発現は EMT を誘導することが明らかになった。従って、Msn の発現は Snail 過剰発現による EMT の促進因子ではないことが示唆された。これらの結果より Snail 過剰発現による EMT 時には、同時に Msn の発現が上昇し、その Msn 発現上昇は P-gp の排出活性の亢進に寄与していると考えられた。

一方で、ERM は P-gp の細胞膜上への発現を調節する因子であるものの、本章では P-gp の細胞膜上発現は評価できていない。また、Msn knockdown により Snail 過剰発現細胞の生存率は低下したものの、P-gp を介した機序によるものかは定かではない。従って、Snail 過剰発現時の P-gp の細胞膜上発現量や P-gp と Msn の相互作用、P-gp 阻害薬を用いた細胞生存率の評価などの詳細な解析が必要であると考えられた。

興味深いことに様々な研究において Msn の発現が EMT 時に誘導されることが報告されている<sup>39,105,106</sup>。本研究では Snail による EMT をモデルとして使用したが、これらの報告は他の EMT 誘導因子によっても Msn の発現誘導が生じることを支持している。さらに Snail は、EMT を誘導する主要な因子であるとともに、EMT マーカーの一つであり、EMT 時に発現が上昇することが知られ

ている<sup>107</sup>。従って **Snail** 以外の因子による EMT 時においても、**Snail** の発現上昇に伴う **Msn** の発現上昇が引き起こされ、**P-gp** の活性化が起こり得る可能性が推察された。

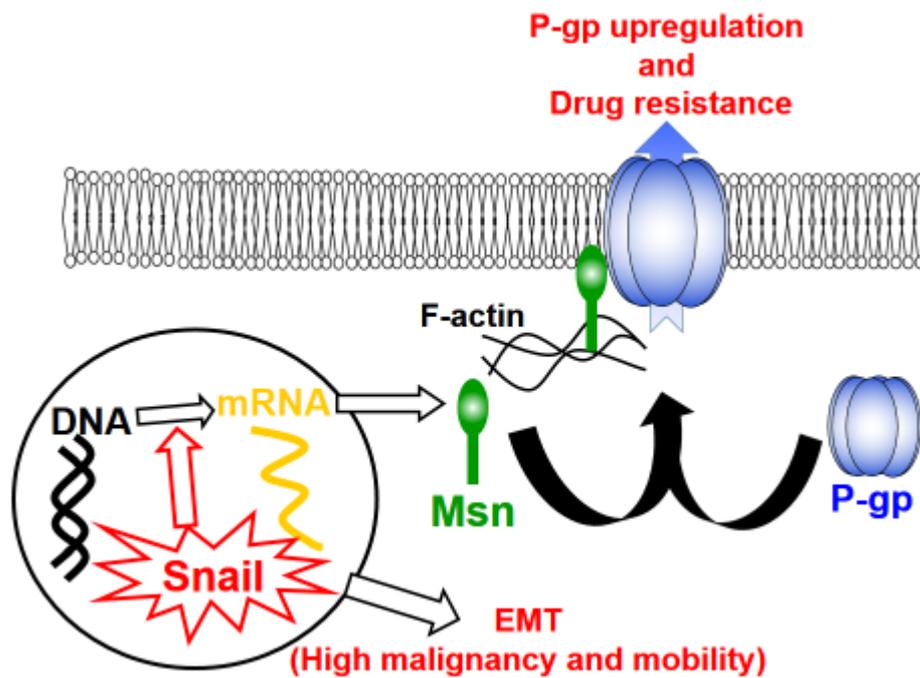
また、本章の冒頭において述べたように、血液脳関門における **P-gp** の機能調節に **Msn** が関与することから、**Msn** の発現や機能を直接的に抑制することは **P-gp** の活性低下を介して脳への異常な薬物移行を引き起こす可能性がある。実際に **P-gp knockout** マウスでは、**P-gp** 基質薬物である ivermectin や vinblastine が中枢毒性を起し易くなることが報告されている<sup>108</sup>。本章の結果から、がん細胞においては **Snail** を抑制することで間接的に **P-gp** の機能が抑制されることが推測される。一方で、**Snail** および **Msn** は様々な正常組織においても発現が認められることから、正常組織においても **Snail** が **Msn** の発現調節を介して **P-gp** の機能を調節している可能性が考えられる。以上のことから、**Snail** による **Msn** の発現調節が、ヒトのがん組織でのみ起こるか否かを検証することが必要であると考えられた。

#### 第 4 節 小括

第 5 章の結果より、以下の知見が得られた。

1. HCC827 における Snail 過剰発現時には、P-gp 機能調節因子である ERM のうち特に Msn の発現が顕著に亢進していることが明らかになった。
2. siRNA を用いた Msn knockdown により、Snail 過剰発現細胞においてのみ Rho123 の排出速度の低下が認められた。
3. Msn knockdown を行った際には、Snail 過剰発現細胞においてのみ paclitaxel 曝露後の細胞生存率の低下が認められた。
4. Msn knockdown を行った際にも Snail 過剰発現細胞における EMT が確認された。

以上のことから、第 2 章で示した EMT を起こす Snail 過剰発現状態における P-gp 機能亢進には、p-caveolin-1 の減少による P-gp 機能抑制機構の減弱だけでなく、Msn の発現亢進による P-gp の活性化も一部関与しているものと考えられた(Scheme 4)。



Scheme 4: A possible mechanism of P-gp upregulation by Snail induced Msn upregulation.

Snail expression induces not only cancer EMT, but also Msn upregulation. The Msn expression might stabilize P-gp localization in plasma membrane and lead to efficient drug efflux.

## 第6章 ヒト肺がん組織および肺正常組織における Snail と P-gp 機能調節因子の遺伝子発現の相関解析

### 第1節 序

NSCLC 細胞株である HCC827 を用いた第 4 および 5 章の結果から、Snail 過剰発現時の P-gp 機能亢進には GRB2 や Msn が関与することが示唆された。そのことからがん細胞において Snail を標的とすることにより、P-gp の機能を制御できると考えられた。一方で Schinkel らは、P-gp knockout マウスにおいて、P-gp 基質薬物の脳や各臓器への移行性が亢進し、薬物の中枢毒性および排泄遅延が起こることを明らかにしている<sup>108</sup>。従って上記の Snail を標的とした戦略は、ヒトの肺がん組織においては GRB2 や Msn が Snail により第 4 および 5 章と同様の調節を受ける一方で、正常組織においては調節されていないことが重要となる。がんの研究においては、単一の細胞株において起きた現象が必ずしも他の *in vitro* や *in vivo* のモデルさらに、ヒトの臨床において認められるとは限らない。また、現在までに確立されている担がん動物モデルは未だに完全にはヒトの病態を反映できておらず、様々なモデルの構築が試みられている<sup>109,110</sup>。従って、上記の問題を解決するにはヒトがん組織および正常組織における解析は不可欠である。

本章では、これまでの検討に用いてきた HCC827 を含む 4 種類の NSCLC 細胞株における Snail と P-gp または、各 P-gp 機能調節因子の発現量を評価した。さらに肺がん患者より摘出された肺がん組織および肺正常組織を用いて、その組織中の Snail および各遺伝子の発現相関解析を行い、臨床において Snail の抑制が GRB2 や Msn の発現に伴う P-gp 機能亢進を抑制し得るかを考察した。

## 第2節 結果

### 6-2-1 NSCLC 細胞株における Snail と P-gp 機能調節因子の遺伝子発現量の評価

まず、肺癌患者組織における遺伝子発現量の解析に先立ち、各 NSCLC 細胞株における、Snail、Ezr、Rdx、Msn、GRB2 および P-gp の mRNA 発現量を RT-qPCR により評価した。その結果、Snail、Ezr および Msn の発現量は H1975 が最も高く、次いで H441、A549、HCC827 の順であった。Rdx の発現量は H1975、H441、HCC827、A549 の順であった。また GRB2 については、発現量の高い順に H1975、A549、H441、HCC827 であった。さらに P-gp については、発現量が高い順に HCC827、A549、H1975、H441 であった(Fig. 6-1)。

上記の結果から、Ezr および Msn の発現量は Snail の発現に伴い上昇していることが示唆された。また、Rdx の発現量も概ね Snail に連動し上昇した。また、GRB2 も Snail の発現に伴い上昇する傾向が認められたものの、P-gp では低下する傾向が認められた。

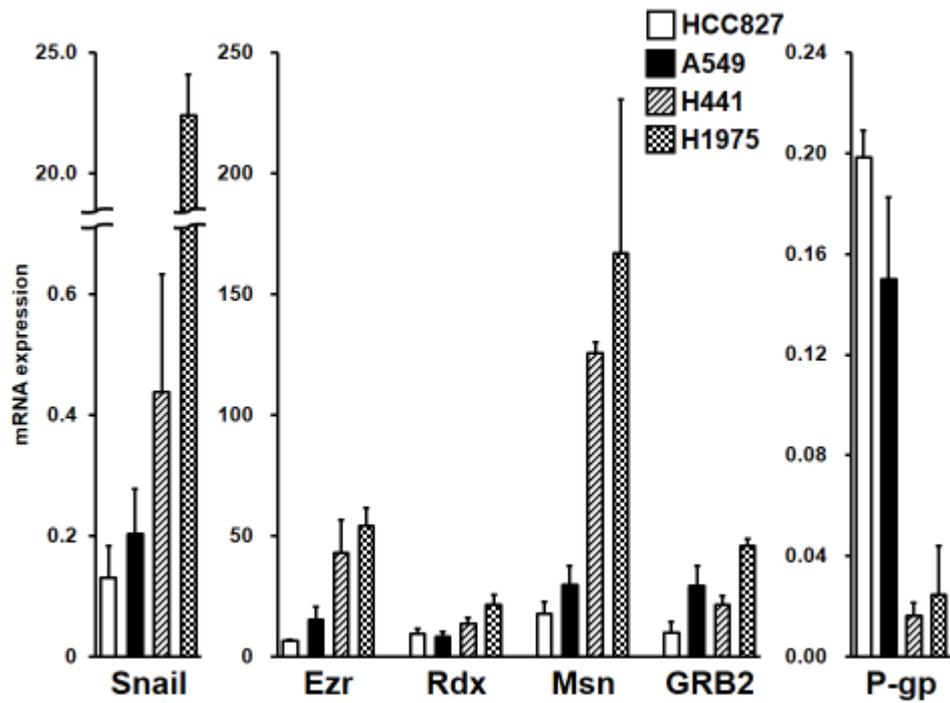


Figure 6-1 Expression profile of Snail, Ezr, Rdx, Msn, GRB2 and P-gp in NSCLC cell lines.

Cells were cultured for 4 days under cell culture conditions. mRNA expression levels are shown by relative values based on the GAPDH expression (GAPDH = 1000). The data are shown as mean  $\pm$  S.D. (n = 3 or 4).

## 6-2-2 肺がん患者由来組織における Snail および P-gp 機能調節因子の遺伝子発現相関解析

次に、7人の肺がん患者より摘出された肺がんおよびその周辺の肺正常組織における Snail と各因子の遺伝子発現量を RT-qPCR により測定し、発現の相関を検討した。サンプルを得た患者の患者背景は、以下の表に示すとおりである (Table 2)。

Table 2 Patients' characteristics enrolled in the analysis (n = 7).

Patient No.	1	2	3	4	5	6	7
Age	63	72	75	71	63	76	72
Sex	Female	Male	Male	Female	Male	Male	Female
Cancer type	AC	AC	SCC	AC	SCC	SCC	AC
TNM	T1aN0M0	T1bN0M0	T2aN1M0	T1bN0M0	T2bN2M0	T2aN0M0	T1bN0M0
Stage	IA	IA	IIA	IA	IIIA	IB	IA2
Lymph Node metastasis	Negative	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative	Negative

AC and SCC indicate adenocarcinoma and squamous cell carcinoma, respectively.

まず肺がん組織における発現量の相関を評価したところ、Snail と ERM の間において遺伝子発現量に有意な正の相関が認められた。また、Snail と GRB2 の間においても有意な正の相関が認められたものの、P-gp との間には相関は認められなかった (Fig. 6-2 A)。

さらに、上記の肺がん組織の解析において強い相関性の認められた ERM について、肺がん患者由来の肺正常組織における Snail との発現相関を検討した。その結果、いずれの遺伝子も Snail の発現と相関しないことが認められた (Fig. 6-2 B)。

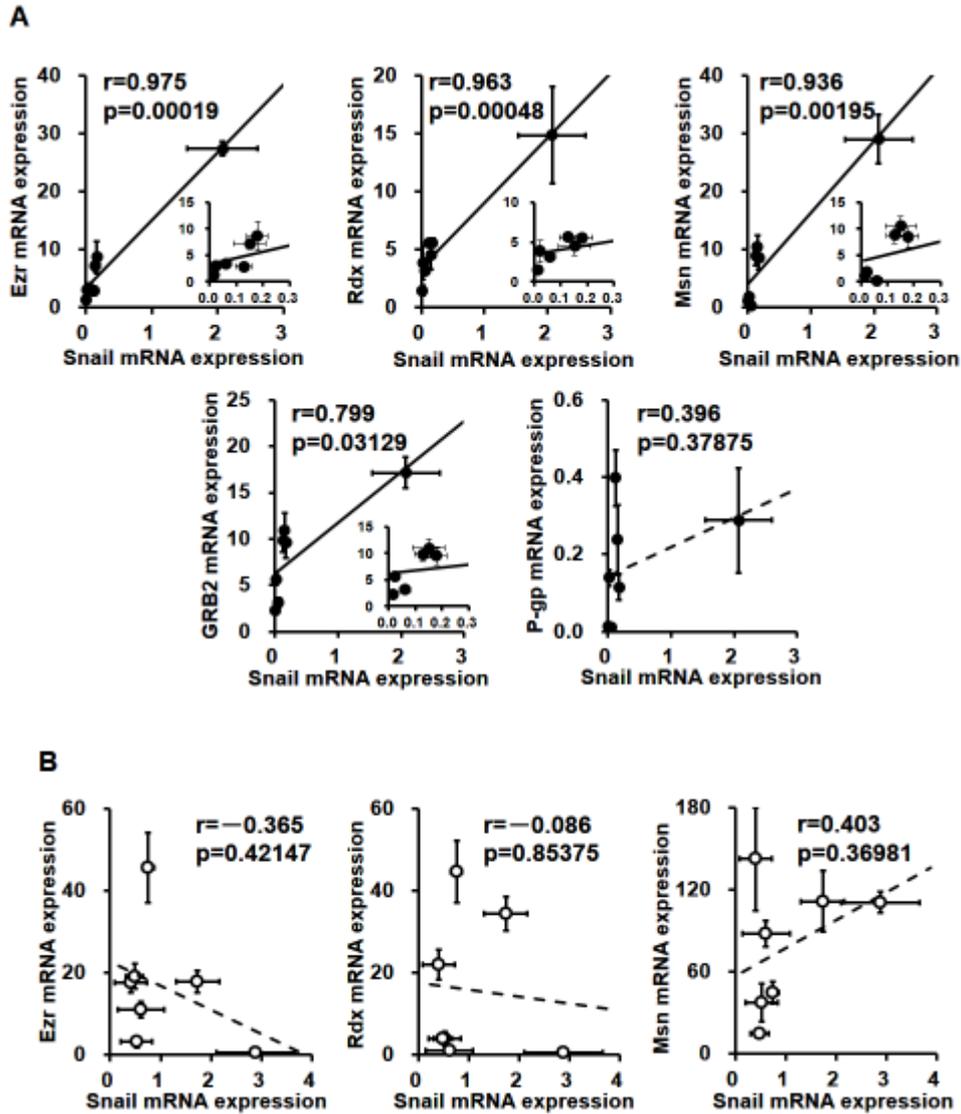


Figure 6-2 Correlation between Snail and Ezr, Rdx, Msn, GRB2 and P-gp expression of cancer tissue (A) and normal tissue (B) in seven lung cancer patients.

Insets depict correlation for the low mRNA expression levels of Snail. mRNA expression levels are shown by relative values based on the GAPDH expression (GAPDH = 1000). The data are shown as mean of triplicate measurements.  $p < 0.05$  significant difference.

### 6-2-3 肺正常組織および肺がん組織間の Snail および ERM の遺伝子発現解析

最後に各患者より得られた、肺正常組織および肺がん組織間における Snail と ERM の発現量を評価した。その結果、患者毎に変動に差が認められるものの、Msn の発現量は肺正常組織と比較して肺がん組織において有意に低下した。また、発現量の平均値を比較したところ、いずれの遺伝子についても肺がん組織において低下する傾向が認められた(Fig. 6-3)。

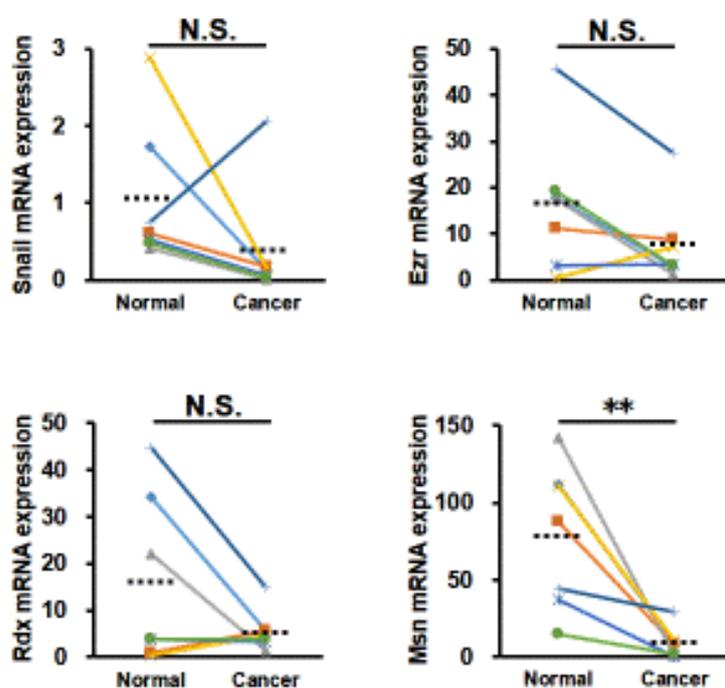


Figure 6-3 Comparison of Snail, Ezr, Rdx and Msn mRNA expression between normal and cancer tissue in seven lung cancer patients.

mRNA expression in normal and cancer tissue in each patient. The same plot mark and line color indicate that these data are obtained from same patient. The broken lines indicate the mean value of each group. mRNA expression levels are shown as relative values based on the GAPDH expression (GAPDH = 1000). The data are shown as mean of triplicate measurements. \*\* p < 0.01 significant difference. N.S. indicates no significant difference.

### 第3節 考察

本章では、これまでに NSCLC 細胞株の一つである HCC827 において認められた Snail 過剰発現による P-gp の機能亢進が、他の NSCLC 細胞や肺癌患者のがん組織においても起こり得るかについて遺伝子発現の相関から評価を行った。

NSCLC 細胞株における Snail の発現量と ERM の発現量を細胞間で比較したところ、Snail と ERM の発現は概ね連動することが認められた(Fig. 6-1)。また、肺癌患者より摘出された肺癌組織における相関を検討したところ、ERM は Snail の発現と非常に高い相関性を示すことが明らかになった。一方で、各患者の肺正常組織での相関性は低かった。これらの結果と前章において示した HCC827 における Snail 過剰発現時に Rdx や Msn の発現が上昇するという結果から、Snail は肺癌組織において ERM の発現を調節しているものの、肺正常組織では機能していないことが示唆された(Fig. 6-2 A および B)。従って、肺癌患者の肺癌組織においても *in vitro* の結果と同様に、Snail の発現上昇に伴い Msn の発現が上昇し、P-gp の活性化を引き起こす可能性があると考えられた。Cui らはヒト膵臓がん組織による proteome 解析により、リンパ節転移陽性症例において Rdx および Msn の発現量が増加していることを見出している<sup>111</sup>。これはヒトのがん組織においても浸潤や転移時に ERM の発現が亢進し、P-gp が活性化し得ることを示唆している。本検討では、Snail と ERM の遺伝子発現相関が肺癌組織では認められたものの、肺正常組織では認められなかった。近年、正常組織に比較し、がん組織において遺伝子のメチル化をはじめとしたエピジェネティックな遺伝子変異が生じていることが明らかになっている。エピジェネティックな変異は、遺伝子の転写調節を変化させる現象であり、肺癌においてもいくつかの遺伝子のプロモーターがメチル化されている<sup>112</sup>。Snail は転写因子として様々な遺伝子発現を調節していることから、本検討で認められた肺癌組織および正常組織間での、Snail による ERM の発現調節の差にもエピジェネティックな遺伝子変異が関与している可能性が考えられた。

一方で、Snail と ERM の mRNA 発現量を肺正常組織と肺癌組織間で比較したところ、興味深いことにいずれの遺伝子も肺癌組織では肺正常組織より発現量が低下する傾向が認められた(Fig. 6-3)。これまでに Tokunobu らの報告において、患者由来の肺腺がん組織と肺正常組織を比較した際に、肺腺がん組織において ERM の発現が低下することが示されており、本検討と一致する。加えて本検討では、ERM と同様に肺正常組織と比較して肺癌組織では Snail の発現量が低下することを見出した。Snail は cyclin D などの抑制により、細胞の増

殖を抑制することが知られている<sup>113</sup>ことから、正常細胞よりも増殖の盛んながん細胞では発現量が低いと考えられた。従って、肺正常組織と比較してがん組織においては P-gp の機能が低下していることが示唆される。しかしながら、EMT はがん組織全体ではなく、局所的に起こることが報告されており<sup>114</sup>、それらのがん細胞では、Snail の発現上昇に伴い ERM の発現が上昇し、P-gp の活性化を介して薬物耐性が亢進していると考えられる。本検討では肺がん組織中の個々の細胞を評価していないため、Snail および ERM の発現が共に上昇し、P-gp の活性化が起こり得るがん細胞が存在するか否かは見出せていない。また今回の検討方法では、各組織のホモジネートからサンプルを調製していることから、得られた結果は細胞集団におけるものであり個々の細胞における発現変動の解析は困難である。従って、上記の P-gp 活性化機構を有する細胞を見出すために、免疫染色法を用いた個々の細胞における Snail と ERM の発現状態の解析が必要と考えられた。

第 5 章では、Snail の過剰発現に伴い Msn および Rdx の発現は上昇したものの、Ezr の発現は変化しなかった。一方で、上述したように肺がん組織においては、Snail と全ての ERM の mRNA 発現が相関を示した。本検討およびこれまでの報告において、ヒト肺がん組織における ERM の発現は患者ごとに大きく異なることが示されている(Fig. 6-2 および 3)<sup>115</sup>。Fig. 6-1 に示したように、今回用いた細胞株において ERM の発現状態に大きな差異が認められたことも、樹立した患者間の個体差を反映している可能性がある。従って、いずれの ERM が Snail により発現調節を受け易いかは細胞株間で異なる可能性があり、今後 HCC827 以外の肺がん細胞株における検討も必要であると考えられた。

なお第 4 章の結果から、Snail 過剰発現細胞において GRB2 は負に制御されていることが示唆された。しかしながら本章において、ヒト肺がん組織での検討を行ったところ、GRB2 は Snail と正の相関を示すことが認められた(Fig. 6-2 A)。これらの結果から、第 4 章の結果から推定した Snail 過剰発現細胞における GRB2 発現低下を介した P-gp 活性化機構は、NSCLC 細胞株限定的な現象である可能性が考えられた。

## 第 4 節 小括

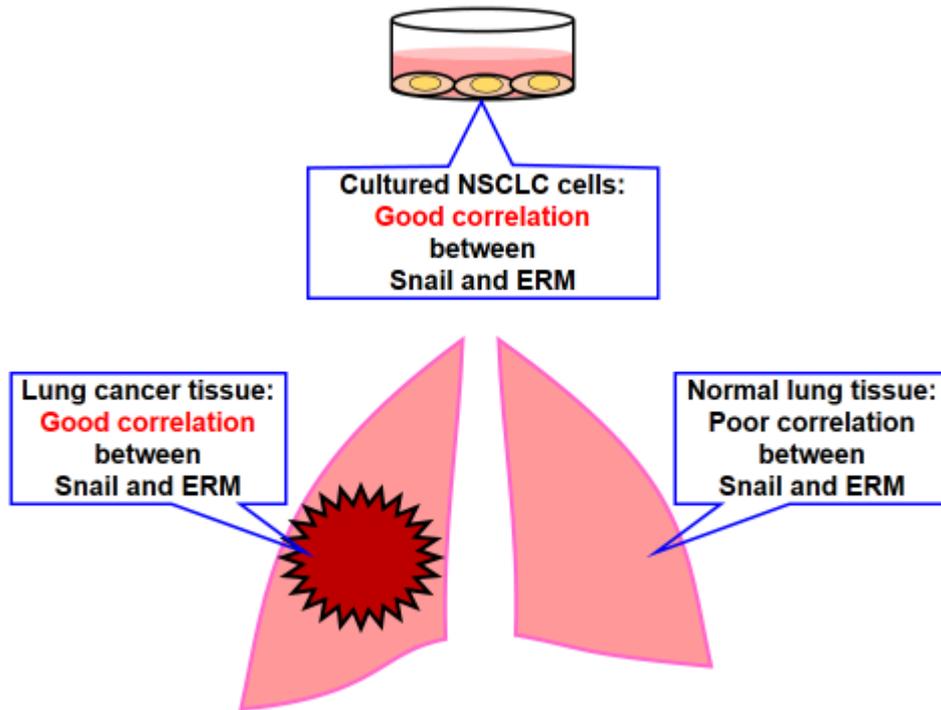
第 6 章の結果より、以下の知見が得られた。

1. NSCLC 細胞株では、**Snail** の遺伝子発現量の高い細胞株ほど **ERM** の遺伝子発現量が高い傾向が認められた。

2. ヒト肺正常組織では **Snail** と **ERM** の発現量の間に関係は認められないものの、ヒト肺がん組織においては **Snail** と全ての **ERM** の発現量が高い相関性を示すことが明らかになった。

3. ヒト肺がん組織における **Snail** および **ERM** の遺伝子発現量は肺正常組織と比較して低下する傾向が認められた。また、特に **Msn** の発現量は有意に低下することが認められた。

以上のことから、**ERM** の発現はヒト肺がん組織においてのみ **Snail** により正に調節されることが明らかになった。従って、**Snail** の機能や発現を抑制する医薬品の創製は **EMT** を抑制するだけでなく、肺正常組織に影響を与えずに肺がん組織における **ERM** の発現亢進の抑制を可能にすると考えられる。その結果、がん選択的に **P-gp** の機能亢進を抑制することが可能となり、局所的に抗がん薬の蓄積を促進することができると考えられた(Scheme 5)。



Scheme 5: Summary of Snail and ERM relevance in NSCLC cell lines and lung tissues.

mRNA expression analyses reveal that Snail and ERM are correlated in NSCLC cell lines and cancer tissues from lung cancer patients, but not in normal lung tissues. Therefore, Snail upregulates ERM expression only in lung cancer cells.

## 第7章 総括

本研究ではがんの転移に関与すると考えられている EMT を、転写因子 Snail を過剰発現させることにより誘導した際に、がん薬物耐性に寄与する P-gp にどのような影響を及ぼすか、さらにそのメカニズムについて解析することを目的として検討を行った。その結果、第 2 章の検討により、Snail を過剰発現させ EMT を誘導した HCC827 では、P-gp の発現は変化せず、その機能のみが亢進することが明らかになった。さらに、基質抗がん薬である paclitaxel による細胞毒性が減弱したことから、EMT 時の P-gp 機能亢進は抗がん薬の耐性化にも寄与し得ることが明らかになった。

第 3 章では、EMT を抑制する作用が報告されている HDAC 阻害薬である Ent が、10 nM の濃度において Snail 過剰発現による EMT および P-gp 活性化を抑制し得るかを検討した。その結果、Ent は HCC827 における EMT を部分的に抑制し、さらに P-gp 活性化を抑制することを見出した。なお、10 nM の濃度において Ent は、細胞障害性および AcH3 の増加を示さなかった。また、Ent の P-gp 活性抑制作用は競合阻害によるものではない可能性が示された。

第 4 章においては上記の P-gp 活性化メカニズムの一端として、caveolin-1 に着目し検討を行った。その結果、Snail を過剰発現した HCC827 において p-caveolin-1 の発現低下が認められた。また、そのリン酸化を担う Src の活性を抑制する薬物である PP2 を用いることにより、Mock 細胞のみ paclitaxel に対する耐性増強が認められた。さらに遺伝子発現解析の結果およびこれまでの報告から、Snail が GRB2 の遺伝子発現量の低下を引き起こすことが、caveolin-1 のリン酸化の低下を制御する 1 つの機構である可能性が考えられた。

第 5 章では、P-gp の細胞膜上への発現に寄与する ERM に着目し検討を行った。その結果 Snail 過剰発現時には、ERM のうち Msn の発現が特に上昇することが認められた。さらに Msn の knockdown により、Snail 過剰発現細胞においてのみ P-gp 基質薬物である Rho123 の排出が抑制された。従って、Snail 過剰発現による EMT 誘導時には Msn の発現上昇が生じることで、P-gp の細胞膜上での発現上昇または機能亢進が起きることが示唆された。

以上の結果を基に第 6 章では、4 種類の NSCLC 細胞株および肺癌患者由来の肺癌および肺正常組織を用いて、Snail と各種遺伝子の相関を評価した。NSCLC 細胞株の解析においては、Snail の発現量が高い細胞株ほど ERM の発現も高い傾向が認められた。またヒト肺癌組織においても、Snail と ERM の発現量の間には相関が認められた。興味深いことに、肺癌患者の肺正常組織においては Snail と ERM の発現に相関は認められなかった。なお、Snail と GRB2

の発現はヒト肺がん組織においては正の相関を示した。従って第 4 章で考察した、**Snail** による **GRB2** の発現抑制を介した **P-gp** 機能亢進メカニズムは、ヒトの肺がん組織においてはほとんど起きておらず、**NSCLC** 細胞株に限定的な現象である可能性が考えられた。

本研究の成果により、肺がん患者のがん組織において **EMT** を誘導する **Snail** の過剰発現状態は、同時に **P-gp** の活性化を介して薬物治療に対する耐性を誘発し得ること、またその背景には足場タンパクである **ERM** の発現亢進が関与していると考えられた。さらに **Snail** は肺正常組織ではなく、肺がん組織においてのみ **ERM** の発現を調節し **P-gp** を活性化すると考えられた。従って、**Snail** は肺正常組織には影響せず、肺がん組織選択的に **EMT** および **P-gp** の活性化を抑制するための有効な標的となり得ると考えられた。一方、本研究では **P-gp** の活性化が **Snail** によるものであるか、または **EMT** によるものであるかは十分に解明できなかった。従って今後、肺がんの悪性化時における **P-gp** 活性化機構のより詳細な解明が求められる。

## 第 8 章 実験方法の部

### 第 1 節 培養細胞

ヒト NSCLC 細胞株 HCC827、A549、H441 および H1975 は American Type Culture Collection より購入した。ブタ腎尿細管細胞 LLC-PK1 および LLC-GA5COL150 は RIKEN Cell Bank より購入した。ヒト胎児腎細胞 HEK293A は Invitrogen 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 Units/mL および streptomycin を終濃度 100  $\mu$ g/mL となるように加えたものを用いた (DMEM, 10% FBS, Pen/St)。LLC-GA5COL150 の培養には上記の組成に加え、geneticin を終濃度 500  $\mu$ g/mL、colchicine を終濃度 150 ng/mL となるように加えた培地を用いた。siRNA を用いた検討の際には、penicilin および streptomycin を添加していない培地を用いた。

### 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
Paclitaxel	Tokyo Chemical Industry
Entinostat	MedChem Express
PP2	Cayman Chemical
alamarBlue®	AbD Serotec
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) <sub>6</sub>	Roche Diagnostics
Power SYBR™ Green PCR Master Mix	Applied Biosystems
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
C219 Monoclonal Antibody, Purified	COVANCE
SNAI1 (H-130): sc-28199	Santa Cruz Biotechnology
Anti-E-cadherin, clone EP700Y, Rabbit Monoclonal	MILLIPORE
Vimentin (V9): sc-6260	Santa Cruz Biotechnology
Actin (I-19): sc-1616	Santa Cruz Biotechnology
GAPDH (G-9): sc-365062	Santa Cruz Biotechnology
Human Phospho-Caveolin-1 (Y14) Antibody	R&D Systems
Human/Mouse/Rat Caveolin-1 Antibody	R&D Systems
Acetyl-Histone H3 (Lys9) (C5B11) Rabbit mAb	Cell Signaling Technology
Purified anti-Histone H3	BioLegend
Moesin (38/87): sc-58806	Santa Cruz Biotechnology
goat anti-rabbit IgG-HRP: sc-2004	Santa Cruz Biotechnology
goat anti-mouse IgG-HRP: sc-2005	Santa Cruz Biotechnology
Lipofectamine™ RNAiMAX Transfection Reagent	Invitrogen
Moesin siRNA (GC: High) (HSS106735)	Invitrogen
5' – UAC UCA UGG CAG UCU UCA GCU CAG C – 3'	

RT-qPCR に用いた primer はユーロフィンジェノミクスまたは Invitrogen より購入した。各遺伝子の定量に用いた primer は以下の表に示した (Table 3)。

Table 3 List of primers using RT-qPCR.

Target	Primer sequence
E-Cadherin	F: 5'-CAGCACGTACACAGCCCTAA-3' R: 5'-ACCTGAGGCTTTGGATTCCT-3'
occludin	F: 5'-AATTGGTCACCGAGGGAGGA-3' R: 5'-GATAAACCAATCTGCTGCGTCC-3'
claudin-1	F: 5'-TTTACTCCTATGCCGGCGAC-3' R: 5'-TTGCTTGCAATGTGCTGCTC-3'
vimentin	F: 5'-CGGGAGAAATTGCAGGAGGA-3' R: 5'-AAGGTCAAGACGTGCCAGAG-3'
ZEB1	F: 5'-TACCAGAGGATGACCTGCCA-3' R: 5'-TGCCCTTCCTTTCCCTGTGTC-3'
KRT18	F: 5'-ACATCCGGGCCCAATATGAC-3' R: 5'-TCCAAGCTGGCCTTCAGATTT-3'
P-gp	F: 5'-CCCATCATTGCAATAGCAGG-3' R: 5'-GTTCAAACCTTCTGCTCCTGA-3'
Caveolin-1	F: 5'-CGTAGACTCGGAGGGACATC-3' R: 5'-GCCTTCCAAATGCCGTCAA-3'
Src	F: 5'-GCGAGAAAGTGAGACCACGA-3' R: 5'-CCATCGGCGTGTTTGGAGTA-3'
FAK1	F: 5'-CAGGGTCCGATTGGAAACCA-3' R: 5'-CTGAAGCTTGACACCCTCGT-3'
GRB2	F: 5'-CTCCCTCTCTGTCAAGTTTGGGA-3' R: 5'-CTGCTGTGGCACCTGTTCTA-3'
Snail	F: 5'-GAAAGGCCTTCAACTGCAA-3' R: 5'-TGACATCTGAGTGGGTCTGG-3'
Ezr	F: 5'-CACGCTTGTGTCTTTAGTGCTCC-3' R: 5'-ACTCAGACTTTACAGGCATTTTCC-3'
Rdx	F: 5'-TGCACCTCGTCTGAGAATCA-3' R: 5'-CTCTAATTGTGCCCTTTCCAAC-3'
Msn	F: 5'-GCCCTGGGTCTCAACATCTA-3' R: 5'-GACGGCGCATGTATAGTTCA-3'
GAPDH	F: 5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3' R: 5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3'

Western blotting に用いた各種抗体およびその希釈倍率は以下の表に示した (Table 4)。

Table 4 List of antibodies and their dilution magnification using Western blotting.

Antibodies	Dilution magnification	
SNAI1	1	: 1000
E-cadherin	1	: 10000
Vimentin	1	: 1000
C219	1	: 500
Actin	1	: 1000
GAPDH	1	: 1000
Phospho-Caveolin-1 (Y14)	0.43	: 1000
Caveolin-1	1.7	: 1000
Acetyl-Histone H3 (Lys9)	1	: 1000
Histone H3	1	: 500
Moesin	1	: 1000
anti-Rabbit	1	: 5000
anti-mouse	1	: 2000

### 第 3 節 統計解析

実験データはすべて平均値±標準偏差で示した。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(MSD 株式会社)より譲渡して頂いた。Ad vector は HEK293A 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<sup>116,117</sup>。

### 【各種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  $5 \times 10^4$  cells/well で播種し、4 日間培養を行った。培養後、TRIzol™ Reagent (Invitrogen)を用いて各細胞から RNA を抽出した。

### 【HCC827 に対する Ad vector 感染】

HCC827 を 96、24 および 6 well 培養プレートにそれぞれ  $1 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $2.5 \times 10^5$  cells/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。感染後 6 日間培養した細胞を 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 による細胞毒性試験に用いた。

### 【HCC827 に対する Ent 処理】

HCC827 を 96 および 6 well 培養プレートにそれぞれ  $1 \times 10^4$ 、 $2.5 \times 10^5$  cells/well で播種した。播種翌日に細胞生存率の評価に用いる細胞には 0-100  $\mu$ M の Ent を、AcH3 および H3 のタンパク量の評価に用いる細胞には 0-1000 nM の Ent を曝露し 4 日間培養した。培養後、細胞生存率の評価を alamarBlue® (AbD Serotec)を用いて行った。alamarBlue®による評価は、10  $\mu$ L の alamarBlue®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 (TECAN)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。細胞の生存率は測定結果を基に alamarBlue®のマニュアルに従い算出した。

### 【HCC827 に対する Ad vector 感染および Ent 処理】

HCC827 を 24 well 培養プレートに  $5 \times 10^4$  cells/well で播種し、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。3 日後に 10 nM の Ent を含む培地へと培地交換を行った。さらに 4 日間培

養した後、RNA 抽出、Rho123 の取り込み試験および efflux assay を行った。

#### 【HCC827 に対する Msn knockdown および Ad vector 感染】

HCC827 を 96、24 および 6 well 培養プレートにそれぞれ  $1 \times 10^3$ 、 $5 \times 10^4$  または  $2.5 \times 10^5$  cells/well で播種し、翌日に Lipofectamine™ RNAiMAX Transfection Reagent (Invitrogen) と複合体を形成させた 150 nM の siMsn 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 日後に培地を DMEM, 10% FBS, Pen/St に交換し、さらに 3 日間培養した。培養後の細胞を 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】

各種実験にて得られたサンプルのタンパク濃度は、BSA を検量線に用いた Lowry 法により定量した。96 well クリアプレートに DC™ Protein Assay (BIO-RAD) の Reagent A を 25  $\mu$ L/well 分注し、各サンプル 5  $\mu$ L を加えた。その後 Reagent B を 200  $\mu$ 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 を用いて行った。NucleoSpin® RNA XS を用いた抽出はメーカーの推奨プロトコルに従って行った。

TRIzol™ Reagent を用いた回収は以下の方法により行った。24 well 培養プレートから培地を除去し、300  $\mu$ L 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  $\mu$ L の chloroform を加え vortex し、室温で 3 分間静置した。12,000 $\times$ g、4℃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  $\mu$ L の 2-propanol を添加し vortex した。室温で 10 分間静置した後、12,000 $\times$ g、4℃で 10 分間遠心分離した。上清を除去し、300  $\mu$ L の 75 % ethanol を添加し vortex した後、7,500 $\times$ g、4℃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℃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 を鋳型として行った。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 を行った。逆転写溶液の組成および PCR 条件を以下に示した。

#### 培養細胞用逆転写溶液の組成

5×Transcriptor RT 反応 Buffer	2.0 µL/tube
10 mM dNTP	1.0 µL/tube
Primer random p(dN) <sub>6</sub>	0.5 µL/tube
ReverTra Ace®	0.5 µL/tube
Total RNA	1.0 µg/tube
超純水	
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) により行った。各遺伝子の検出には Table 3 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

超純水	3.6 $\mu$ L/tube
Power SYBR™ Green PCR Master Mix	5.0 $\mu$ L/tube
10 $\mu$ M Forward and Reverse Primer mixture	0.4 $\mu$ L/tube
cDNA	1.0 $\mu$ L/tube
Total	10.0 $\mu$ L/tube

### RT-qPCR の条件

温度	95°C	95°C	60°C	72°C	95°C	55°C	95°C
時間	600 秒	30 秒	15 秒	15 秒	60 秒	30 秒	30 秒

40 cycle

また遺伝子発現量の補正には、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 Fig. 6-1 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。

$$\text{Gene expression (GAPDH = 1000)} = 1000 \times 0.5^{-(\text{Ct値:GAPDH} - \text{Ct値:各種遺伝子})}$$

### 【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 $\times$ g、4°C で 30 分間遠心分離し、上清を分取した。30  $\mu$ g/lane となるように 5 $\times$  sampling buffer (250 mM Tris-HCl pH 6.8, 10% sodium dodecyl sulfate (SDS), 30% glycerol, 5%  $\beta$ -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 を行った。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 wash し、その後 phosphate buffered saline containing 0.05% (v/v) Tween 20 (PBST) で 3 回 wash 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 wash し、PBST で希釈した各一次抗体を 4°C、over night

で反応させた。メンブレンを PBST で 3 回 wash し、5% (w/v) skim milk でブロッキング後、PBST で wash し、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 wash 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) を用いて行った。Western blotting に用いた各抗体の希釈倍率は Table 4 に示した。

#### 【Rho123 の efflux assay および受動拡散の評価】

培養プレートに培養後、各種処理を行った細胞を cold phosphate buffered saline (PBS) (-) にて 2 回 wash 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 wash 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 wash し薬物排出を停止させた。

また、Rho123 の受動拡散の評価は、Opti-MEM® で希釈した 10 μM の Rho123 を添加し 4°C で 30 分間静置した後、cold PBS (-) にて 2 回 wash し、Opti-MEM® を 300 μL 添加した。その後、4°C の条件で 10 分間静置し、cold PBS (-) にて 3 回 wash した。

なお、各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 wash 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】の項にて記述した。

$$\text{Rho123排出速度 (nmol/min/g protein)} = \frac{\text{Rho123初期蓄積量 (nmol/g protein)} - \text{Rho123残存量 (nmol/g protein)}}{\text{インキュベーション時間 (min)}}$$

#### 【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】

HCC827 を培養プレートに播種し、翌日に Ad vector を感染させ 6 日間培養した。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 wash 後、37°C の HBSS-HEPES を 300 μL 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 μM Rho123: P-gp および BCRP 基質、5 μM Hoechst33342: BCRP 基質、2 μM SN-

38: BCRP および MRP2 基質、5  $\mu$ M 5-(and-6)-carboxy-2', 7'-dichlorofluorescein diacetate: MRPs 基質である CDCF の前駆体)を 300  $\mu$ 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 wash した。各基質薬物の定量法については【各薬物の定量法】の項にて記述した。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。

$$\text{C/M ratio (mL/mg protein)} = \frac{\text{細胞内薬物濃度}(\mu\text{M}) \times \text{細胞溶解液量}(\mu\text{L})}{\text{添加薬物濃度}(\mu\text{M}) \times \text{添加量}(\mu\text{L}) \times \text{タンパク濃度}(\text{mg/mL})}$$

#### 【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 wash 後、10  $\mu$ M の Elc を含むまたは含まない HBSS-HEPES を添加し、37°C で 30 分間インキュベーションした。その後、Elc を含むまたは含まない 10  $\mu$ M paclitaxel/HBSS-HEPES 溶液を添加し、37°C の水浴上で 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 wash した。Paclitaxel の定量法については【各薬物の定量法】の項にて記述した。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 paclitaxel 細胞毒性試験】

Ad vector 感染 6 日後の HCC827 に、各種阻害薬(1  $\mu$ M Elc または 10  $\mu$ M PP2)を含むまたは含まない 100 nM の paclitaxel を曝露した。3 日後に 10  $\mu$ L の alamarBlue®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。細胞の生存率は測定結果を基に alamarBlue®のマニュアルに従い算出した。

#### 【Msn knockdown および Snail 過剰発現細胞における paclitaxel 細胞毒性試験】

上述の【HCC827 に対する Msn knockdown および Ad vector 感染】と同様の方法で培養した HCC827 に 3  $\mu$ M の paclitaxel を曝露し、4 日後に 10  $\mu$ L の alamarBlue®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。細胞の生存率は測定結果を基に alamarBlue®のマニュアルに従い算出した。

**【LLC-PK1 および LLC-GA5COL150 における Rho123 および Ent の細胞内取り込み試験】**

LLC-PK1 および LLC-GA5COL150 を  $5 \times 10^4$  cells/well で 24 well plate に播種した。播種 4 日後に培地を DMEM, 10% FBS, Pen/St に交換し、翌日に Ent および Rho123 の細胞内取り込み試験を行った。細胞を 37°C の HBSS-HEPES で 2 回 wash し、10  $\mu$ M の Elc を含むまたは含まない 50  $\mu$ M Ent または 10  $\mu$ M Rho123/HBSS-HEPES 溶液を 300  $\mu$ L 添加し、37°C の水浴場で 30 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 wash した。Ent および Rho123 の細胞内蓄積量の定量法は【各薬物の定量法】の項にて記述した。また、両薬物の蓄積量は前項で示した C/M ratio を算出し評価した。

**【各薬物の定量法】**

定量に用いた機器とその構成

A) ARVO<sup>TM</sup>MX (PerkinElmer, Waltham, MA)

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

データ処理装置: Chromatopac CR7A plus (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)

カラムオーブン: CTO-10AC (Shimadzu)

蛍光検出器: RF-10A XL (Shimadzu)

カラム: Mightysil, RP-18 GP Aqua, 4.6  $\times$  250 mm (関東化学)

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

質量分析器: API3000 triple quadrupole spectrometer (Applied Biosystems)

HPLC: HP1100 system (Agilent)

カラム: Capcell pak C18 MG II column, 50  $\times$  2.0 mm i.d., 3  $\mu$ m (資生堂)

各薬物のサンプル処理および測定条件

A) Rho123

検討に用いた細胞を 0.1 N NaOH にて溶解し、溶解液を 96 well assay plate (CORNING) に 100  $\mu$ L ずつ入れ ARVO<sup>TM</sup>MX にて測定した。測定波長は励起波長: 485 nm、蛍光波長: 538 nm で測定を行った。

#### B) Hoechst33342

細胞を 0.02% の SDS 溶液に溶解させ、96 well filter により精製した。精製後のサンプルを HPLC-fluorescence system を用いて測定した。移動相には 20 mM sodium phosphate (pH 2.0) と acetonitrile を 75:25 の比で用い、流速は 1 mL/min とした。測定波長は励起波長: 340 nm、蛍光波長: 510 nm で測定を行った。

#### C) SN-38

細胞を 0.02% の SDS 溶液に溶解させ、96 well filter により精製した。精製後のサンプルを HPLC-fluorescence system を用いて測定した。移動相には 20 mM sodium phosphate (pH 2.0) と acetonitrile を 65:35 の比で用い、流速は 1 mL/min とした。測定波長は励起波長: 380 nm、蛍光波長: 556 nm で測定を行った。

#### D) CDCF

CDCF については Rho123 と同様の方法で測定を行った。

#### E) Paclitaxel

実験終了後の細胞を、内部標準である 1  $\mu$ M docetaxel を含む 70% methanol で回収し、15,000 $\times$ g、4 $^{\circ}$ C 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 10 mM ammonium formate と 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の溶解に用いた上記組成の溶液を用い、流速は 0.1 mL/min とした。LC-MS/MS の測定条件は、electrospray ionization (ESI) 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。

#### F) Ent

取り込み試験終了後の細胞を 300  $\mu$ L の 0.001% Triton X-100 により溶解した。細胞溶解液を等量の acetonitrile と混和し、15,000 $\times$ g、4 $^{\circ}$ C で 5 分間遠心分離した。上清を分取し、遠心エバポレーター CVE-3110 (EYELA) を用いて遠心乾固した。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 10 mM ammonium formate と 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の溶解に用いた上記組成の溶液を用い、

流速は 0.1 mL/min とした。LC-MS/MS の測定条件は、ESI 法の positive モードにより、376.9-149.2 m/z で測定した。

#### 【ヒト組織を用いた検討】

本研究では、高崎健康福祉大学および群馬県立がんセンター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関連解析」に基づきヒト組織を用いた検討を行った。

#### 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行った。

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® RNA Midi (Macherey-Nagel)により RNA を抽出した。NucleoSpin® RNA Midi による抽出についてはメーカーの推奨プロトコルに従って行った。

#### 【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 を鋳型として行った。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 を行った。各逆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

により行った。

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) <sub>6</sub>	1.5 μL/tube
ReverTra Ace®	1.5 μL/tube
Total RNA	1.0 μg/tube
超純水	
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行った。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算出した。

## 参考文献

1. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A 2015. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 65(2):87-108.
2. Kamangar F, Dores GM, Anderson WF 2006. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. *J Clin Oncol* 24(14):2137-2150.
3. Dela Cruz CS, Tanoue LT, Matthay RA 2011. Lung cancer: epidemiology, etiology, and prevention. *Clin Chest Med* 32(4):605-644.
4. Yousefi M, Bahrami T, Salmaninejad A, Nosrati R, Ghaffari P, Ghaffari SH 2017. Lung cancer-associated brain metastasis: Molecular mechanisms and therapeutic options. *Cell Oncol (Dordr)*.
5. Gavrilovic IT, Posner JB 2005. Brain metastases: epidemiology and pathophysiology. *J Neurooncol* 75(1):5-14.
6. Chen CJ, Chin JE, Ueda K, Clark DP, Pastan I, Gottesman MM, Roninson IB 1986. Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell* 47(3):381-389.
7. Juliano RL, Ling V 1976. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta* 455(1):152-162.
8. Kim RB 2002. Drugs as P-glycoprotein substrates, inhibitors, and inducers. *Drug Metab Rev* 34(1-2):47-54.
9. Matheny CJ, Lamb MW, Brouwer KR, Pollack GM 2001. Pharmacokinetic and pharmacodynamic implications of P-glycoprotein modulation. *Pharmacotherapy* 21(7):778-796.
10. Palmeira A, Sousa E, Vasconcelos MH, Pinto MM 2012. Three decades of P-gp inhibitors: skimming through several generations and scaffolds. *Curr Med Chem* 19(13):1946-2025.
11. Sharom FJ 2011. The P-glycoprotein multidrug transporter. *Essays Biochem* 50(1):161-178.
12. Zhou SF 2008. Structure, function and regulation of P-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition. *Xenobiotica* 38(7-8):802-832.
13. Silva R, Vilas-Boas V, Carmo H, Dinis-Oliveira RJ, Carvalho F, de Lourdes Bastos M, Remiao F 2015. Modulation of P-glycoprotein efflux pump: induction and activation as a therapeutic strategy. *Pharmacol Ther* 149:1-123.
14. Tomono T, Otsuka K, Yano K, Kanagawa M, Arakawa H, Ogihara T 2015. Recommended Daily Dose of Sesame Lignans Has No Influence on Oral Absorption of P-Glycoprotein Substrates in Rats. *Biol Pharm Bull* 38(12):1960-1963.

15. Saeki T, Nomizu T, Toi M, Ito Y, Noguchi S, Kobayashi T, Asaga T, Minami H, Yamamoto N, Aogi K, Ikeda T, Ohashi Y, Sato W, Tsuruo T 2007. Dofequidar fumarate (MS-209) in combination with cyclophosphamide, doxorubicin, and fluorouracil for patients with advanced or recurrent breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 25(4):411-417.
16. Gottesman MM, Fojo T, Bates SE 2002. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nature reviews Cancer* 2(1):48-58.
17. Gameiro M, Silva R, Rocha-Pereira C, Carmo H, Carvalho F, Bastos ML, Remiao F 2017. Cellular Models and In Vitro Assays for the Screening of modulators of P-gp, MRP1 and BCRP. *Molecules (Basel, Switzerland)* 22(4).
18. Batlle E, Sancho E, Franci C, Dominguez D, Monfar M, Baulida J, Garcia De Herreros A 2000. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol* 2(2):84-89.
19. Guaita S, Puig I, Franci C, Garrido M, Dominguez D, Batlle E, Sancho E, Dedhar S, De Herreros AG, Baulida J 2002. Snail induction of epithelial to mesenchymal transition in tumor cells is accompanied by MUC1 repression and ZEB1 expression. *J Biol Chem* 277(42):39209-39216.
20. Savagner P 2015. Epithelial-mesenchymal transitions: from cell plasticity to concept elasticity. *Curr Top Dev Biol* 112:273-300.
21. Shibue T, Weinberg RA 2017. EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications. *Nature reviews Clinical oncology* 14(10):611-629.
22. Jiang ZS, Sun YZ, Wang SM, Ruan JS 2017. Epithelial-mesenchymal transition: potential regulator of ABC transporters in tumor progression. *J Cancer* 8(12):2319-2327.
23. Cano A, Perez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, Portillo F, Nieto MA 2000. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* 2(2):76-83.
24. Mauhin V, Lutz Y, Dennefeld C, Alberga A 1993. Definition of the DNA-binding site repertoire for the Drosophila transcription factor SNAIL. *Nucleic Acids Res* 21(17):3951-3957.
25. Fuse N, Hirose S, Hayashi S 1994. Diploidy of Drosophila imaginal cells is maintained by a transcriptional repressor encoded by escargot. *Genes Dev* 8(19):2270-2281.
26. Inukai T, Inoue A, Kurosawa H, Goi K, Shinjyo T, Ozawa K, Mao M, Inaba T, Look AT 1999. SLUG, a ces-1-related zinc finger transcription factor gene with antiapoptotic activity, is a downstream target of the E2A-HLF oncoprotein. *Mol Cell* 4(3):343-352.
27. Kataoka H, Murayama T, Yokode M, Mori S, Sano H, Ozaki H, Yokota Y,

- Nishikawa S, Kita T 2000. A novel snail-related transcription factor Smuc regulates basic helix-loop-helix transcription factor activities via specific E-box motifs. *Nucleic Acids Res* 28(2):626-633.
28. Mayor R, Guerrero N, Young RM, Gomez-Skarmeta JL, Cuellar C 2000. A novel function for the Xslug gene: control of dorsal mesendoderm development by repressing BMP-4. *Mech Dev* 97(1-2):47-56.
29. LaBonne C, Bronner-Fraser M 2000. Snail-related transcriptional repressors are required in *Xenopus* for both the induction of the neural crest and its subsequent migration. *Dev Biol* 221(1):195-205.
30. Nakayama H, Scott IC, Cross JC 1998. The transition to endoreduplication in trophoblast giant cells is regulated by the mSNA zinc finger transcription factor. *Dev Biol* 199(1):150-163.
31. Fujiwara S, Corbo JC, Levine M 1998. The snail repressor establishes a muscle/notochord boundary in the *Ciona* embryo. *Development* 125(13):2511-2520.
32. Hemavathy K, Guru SC, Harris J, Chen JD, Ip YT 2000. Human Slug is a repressor that localizes to sites of active transcription. *Mol Cell Biol* 20(14):5087-5095.
33. Grau Y, Carteret C, Simpson P 1984. Mutations and Chromosomal Rearrangements Affecting the Expression of Snail, a Gene Involved in Embryonic Patterning in *DROSOPHILA MELANOGASTER*. *Genetics* 108(2):347-360.
34. Nusslein-Volhard C, Wieschaus E, Kluding H 1984. Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster* : I. Zygotic loci on the second chromosome. *Wilehm Roux Arch Dev Biol* 193(5):267-282.
35. Moody SE, Perez D, Pan TC, Sarkisian CJ, Portocarrero CP, Sterner CJ, Notorfrancesco KL, Cardiff RD, Chodosh LA 2005. The transcriptional repressor Snail promotes mammary tumor recurrence. *Cancer Cell* 8(3):197-209.
36. Debies MT, Gestl SA, Mathers JL, Mikse OR, Leonard TL, Moody SE, Chodosh LA, Cardiff RD, Gunther EJ 2008. Tumor escape in a Wnt1-dependent mouse breast cancer model is enabled by p19Arf/p53 pathway lesions but not p16 Ink4a loss. *J Clin Invest* 118(1):51-63.
37. Bruyere F, Namdarian B, Corcoran NM, Pedersen J, Ockrim J, Voelzke BB, Mete U, Costello AJ, Hovens CM 2010. Snail expression is an independent predictor of tumor recurrence in superficial bladder cancers. *Urol Oncol* 28(6):591-596.
38. Peinado H, Moreno-Bueno G, Hardisson D, Perez-Gomez E, Santos V, Mendiola M, de Diego JI, Nistal M, Quintanilla M, Portillo F, Cano A 2008. Lysyl oxidase-like 2 as a new poor prognosis marker of squamous cell carcinomas. *Cancer Res* 68(12):4541-4550.
39. Thiery JP, Sleeman JP 2006. Complex networks orchestrate epithelial-

- mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7(2):131-142.
40. Lovisa S, LeBleu VS, Tampe B, Sugimoto H, Vадnagara K, Carstens JL, Wu CC, Hagos Y, Burckhardt BC, Pentcheva-Hoang T, Nischal H, Allison JP, Zeisberg M, Kalluri R 2015. Epithelial-to-mesenchymal transition induces cell cycle arrest and parenchymal damage in renal fibrosis. *Nat Med* 21(9):998-1009.
  41. Kudo-Saito C, Shirako H, Takeuchi T, Kawakami Y 2009. Cancer metastasis is accelerated through immunosuppression during Snail-induced EMT of cancer cells. *Cancer Cell* 15(3):195-206.
  42. Lyons JG, Patel V, Roue NC, Fok SY, Soon LL, Halliday GM, Gutkind JS 2008. Snail up-regulates proinflammatory mediators and inhibits differentiation in oral keratinocytes. *Cancer Res* 68(12):4525-4530.
  43. Vega S, Morales AV, Ocana OH, Valdes F, Fabregat I, Nieto MA 2004. Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death. *Genes Dev* 18(10):1131-1143.
  44. Perez-Mancera PA, Perez-Caro M, Gonzalez-Herrero I, Flores T, Orfao A, de Herreros AG, Gutierrez-Adan A, Pintado B, Sagrera A, Sanchez-Martin M, Sanchez-Garcia I 2005. Cancer development induced by graded expression of Snail in mice. *Hum Mol Genet* 14(22):3449-3461.
  45. Kajita M, McClinic KN, Wade PA 2004. Aberrant expression of the transcription factors snail and slug alters the response to genotoxic stress. *Mol Cell Biol* 24(17):7559-7566.
  46. Kurrey NK, Jalgaonkar SP, Joglekar AV, Ghanate AD, Chaskar PD, Doiphode RY, Bapat SA 2009. Snail and slug mediate radioresistance and chemoresistance by antagonizing p53-mediated apoptosis and acquiring a stem-like phenotype in ovarian cancer cells. *Stem Cells* 27(9):2059-2068.
  47. Alberga A, Boulay JL, Kempe E, Dennefeld C, Haenlin M 1991. The snail gene required for mesoderm formation in *Drosophila* is expressed dynamically in derivatives of all three germ layers. *Development* 111(4):983-992.
  48. Wu SY, McClay DR 2007. The Snail repressor is required for PMC ingression in the sea urchin embryo. *Development* 134(6):1061-1070.
  49. Carver EA, Jiang R, Lan Y, Oram KF, Gridley T 2001. The mouse snail gene encodes a key regulator of the epithelial-mesenchymal transition. *Mol Cell Biol* 21(23):8184-8188.
  50. Nieto MA 2002. The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(3):155-166.
  51. Li L, Xu QH, Dong YH, Li GX, Yang L, Wang LW, Li HY 2016. MiR-181a upregulation is associated with epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) and multidrug

- resistance (MDR) of ovarian cancer cells. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 20(10):2004-2010.
52. Chen J, Wang L, Matyunina LV, Hill CG, McDonald JF 2011. Overexpression of miR-429 induces mesenchymal-to-epithelial transition (MET) in metastatic ovarian cancer cells. *Gynecol Oncol* 121(1):200-205.
53. Massague J 2012. TGFbeta signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13(10):616-630.
54. Kaufhold S, Bonavida B 2014. Central role of Snail1 in the regulation of EMT and resistance in cancer: a target for therapeutic intervention. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR* 33:62.
55. Hung JJ, Yang MH, Hsu HS, Hsu WH, Liu JS, Wu KJ 2009. Prognostic significance of hypoxia-inducible factor-1alpha, TWIST1 and Snail expression in resectable non-small cell lung cancer. *Thorax* 64(12):1082-1089.
56. Liu CW, Li CH, Peng YJ, Cheng YW, Chen HW, Liao PL, Kang JJ, Yeng MH 2014. Snail regulates Nanog status during the epithelial-mesenchymal transition via the Smad1/Akt/GSK3beta signaling pathway in non-small-cell lung cancer. *Oncotarget* 5(11):3880-3894.
57. Zhu WY, Hunag YY, Liu XG, He JY, Chen DD, Zeng F, Zhou JH, Zhang YK 2012. Prognostic evaluation of CapG, gelsolin, P-gp, GSTP1, and Topo-II proteins in non-small cell lung cancer. *Anat Rec (Hoboken)* 295(2):208-214.
58. Fischer KR, Durrans A, Lee S, Sheng J, Li F, Wong ST, Choi H, El Rayes T, Ryu S, Troeger J, Schwabe RF, Vahdat LT, Altorki NK, Mittal V, Gao D 2015. Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance. *Nature* 527(7579):472-476.
59. Zheng X, Carstens JL, Kim J, Scheible M, Kaye J, Sugimoto H, Wu CC, LeBleu VS, Kalluri R 2015. Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer. *Nature* 527(7579):525-530.
60. Marcucci F, Stassi G, De Maria R 2016. Epithelial-mesenchymal transition: a new target in anticancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 15(5):311-325.
61. Witta SE, Jotte RM, Konduri K, Neubauer MA, Spira AI, Ruxer RL, Varella-Garcia M, Bunn PA, Jr., Hirsch FR 2012. Randomized phase II trial of erlotinib with and without entinostat in patients with advanced non-small-cell lung cancer who progressed on prior chemotherapy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 30(18):2248-2255.
62. Yardley DA, Ismail-Khan RR, Melichar B, Lichinitser M, Munster PN, Klein PM, Cruickshank S, Miller KD, Lee MJ, Trepel JB 2013. Randomized phase II, double-blind, placebo-controlled study of exemestane with or without entinostat in postmenopausal

- women with locally recurrent or metastatic estrogen receptor-positive breast cancer progressing on treatment with a nonsteroidal aromatase inhibitor. *J Clin Oncol* 31(17):2128-2135.
63. Hauschild A, Trefzer U, Garbe C, Kaehler KC, Ugurel S, Kiecker F, Eigentler T, Krissel H, Schott A, Schadendorf D 2008. Multicenter phase II trial of the histone deacetylase inhibitor pyridylmethyl-N-{4-[(2-aminophenyl)-carbamoyl]-benzyl}-carbamate in pretreated metastatic melanoma. *Melanoma Res* 18(4):274-278.
64. Ngamphaiboon N, Dy GK, Ma WW, Zhao Y, Reungwetwattana T, DePaolo D, Ding Y, Brady W, Fetterly G, Adjei AA 2015. A phase I study of the histone deacetylase (HDAC) inhibitor entinostat, in combination with sorafenib in patients with advanced solid tumors. *Invest New Drugs* 33(1):225-232.
65. Simonini MV, Camargo LM, Dong E, Maloku E, Veldic M, Costa E, Guidotti A 2006. The benzamide MS-275 is a potent, long-lasting brain region-selective inhibitor of histone deacetylases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(5):1587-1592.
66. Shah P, Gau Y, Sabnis G 2014. Histone deacetylase inhibitor entinostat reverses epithelial to mesenchymal transition of breast cancer cells by reversing the repression of E-cadherin. *Breast Cancer Res Treat* 143(1):99-111.
67. Licht T, Fiebig HH, Bross KJ, Herrmann F, Berger DP, Shoemaker R, Mertelsmann R 1991. Induction of multiple-drug resistance during anti-neoplastic chemotherapy in vitro. *International journal of cancer* 49(4):630-637.
68. Jin S, Scotto KW 1998. Transcriptional regulation of the MDR1 gene by histone acetyltransferase and deacetylase is mediated by NF- $\kappa$ B. *Molecular and cellular biology* 18(7):4377-4384.
69. Robey RW, Zhan Z, Piekarz RL, Kayastha GL, Fojo T, Bates SE 2006. Increased MDR1 expression in normal and malignant peripheral blood mononuclear cells obtained from patients receiving depsipeptide (FR901228, FK228, NSC630176). *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 12(5):1547-1555.
70. Eyal S, Lamb JG, Smith-Yockman M, Yagen B, Fibach E, Altschuler Y, White HS, Bialer M 2006. The antiepileptic and anticancer agent, valproic acid, induces P-glycoprotein in human tumour cell lines and in rat liver. *British journal of pharmacology* 149(3):250-260.
71. Kim YK, Kim NH, Hwang JW, Song YJ, Park YS, Seo DW, Lee HY, Choi WS, Han JW, Kim SN 2008. Histone deacetylase inhibitor apicidin-mediated drug resistance: involvement of P-glycoprotein. *Biochem Biophys Res Commun* 368(4):959-964.
72. Tabe Y, Konopleva M, Contractor R, Munsell M, Schober WD, Jin L, Tsutsumi-

- Ishii Y, Nagaoka I, Igari J, Andreeff M 2006. Up-regulation of MDR1 and induction of doxorubicin resistance by histone deacetylase inhibitor depsipeptide (FK228) and ATRA in acute promyelocytic leukemia cells. *Blood* 107(4):1546-1554.
73. Xu Y, Jiang Z, Yin P, Li Q, Liu J 2012. Role for Class I histone deacetylases in multidrug resistance. *Exp Cell Res* 318(3):177-186.
74. Huang XP, Li X, Situ MY, Huang LY, Wang JY, He TC, Yan QH, Xie XY, Zhang YJ, Gao YH, Li YH, Rong TH, Wang MR, Cai QQ, Fu JH 2018. Entinostat reverses cisplatin resistance in esophageal squamous cell carcinoma via down-regulation of multidrug resistance gene 1. *Cancer letters* 414:294-300.
75. Horton JK, Thimmaiah KN, Houghton JA, Horowitz ME, Houghton PJ 1989. Modulation by verapamil of vincristine pharmacokinetics and toxicity in mice bearing human tumor xenografts. *Biochem Pharmacol* 38(11):1727-1736.
76. Nooter K, Oostrum R, Deurloo J 1987. Effects of verapamil on the pharmacokinetics of daunomycin in the rat. *Cancer Chemother Pharmacol* 20(2):176-178.
77. Friedenbergr WR, Rue M, Blood EA, Dalton WS, Shustik C, Larson RA, Sonneveld P, Greipp PR 2006. Phase III study of PSC-833 (valsopodar) in combination with vincristine, doxorubicin, and dexamethasone (valsopodar/VAD) versus VAD alone in patients with recurring or refractory multiple myeloma (E1A95): a trial of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Cancer* 106(4):830-838.
78. Ozols RF, Cunnion RE, Klecker RW, Jr., Hamilton TC, Ostchega Y, Parrillo JE, Young RC 1987. Verapamil and adriamycin in the treatment of drug-resistant ovarian cancer patients. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 5(4):641-647.
79. Choudhary C, Kumar C, Gnad F, Nielsen ML, Rehman M, Walther TC, Olsen JV, Mann M 2009. Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science (New York, NY)* 325(5942):834-840.
80. Demeule M, Jodoin J, Gingras D, Beliveau R 2000. P-glycoprotein is localized in caveolae in resistant cells and in brain capillaries. *FEBS Lett* 466(2-3):219-224.
81. Ronaldson PT, Bendayan M, Gingras D, Piquette-Miller M, Bendayan R 2004. Cellular localization and functional expression of P-glycoprotein in rat astrocyte cultures. *J Neurochem* 89(3):788-800.
82. Krajewska WM, Maslowska I 2004. Caveolins: structure and function in signal transduction. *Cell Mol Biol Lett* 9(2):195-220.
83. Yamamoto M, Toya Y, Jensen RA, Ishikawa Y 1999. Caveolin is an inhibitor of platelet-derived growth factor receptor signaling. *Exp Cell Res* 247(2):380-388.
84. Fielding PE, Fielding CJ 1995. Plasma membrane caveolae mediate the efflux of

- cellular free cholesterol. *Biochemistry* 34(44):14288-14292.
85. Arnal JF, Dinh-Xuan AT, Pueyo M, Darblade B, Rami J 1999. Endothelium-derived nitric oxide and vascular physiology and pathology. *Cell Mol Life Sci* 55(8-9):1078-1087.
  86. Cohen AW, Hnasko R, Schubert W, Lisanti MP 2004. Role of caveolae and caveolins in health and disease. *Physiol Rev* 84(4):1341-1379.
  87. Davidson B, Goldberg I, Givant-Horwitz V, Nesland JM, Berner A, Bryne M, Risberg B, Kopolovic J, Kristensen GB, Trope CG, van de Putte G, Reich R 2002. Caveolin-1 expression in ovarian carcinoma is MDR1 independent. *Am J Clin Pathol* 117(2):225-234.
  88. Cai C, Chen J 2004. Overexpression of caveolin-1 induces alteration of multidrug resistance in Hs578T breast adenocarcinoma cells. *Int J Cancer* 111(4):522-529.
  89. Jodoin J, Demeule M, Fenart L, Cecchelli R, Farmer S, Linton KJ, Higgins CF, Beliveau R 2003. P-glycoprotein in blood-brain barrier endothelial cells: interaction and oligomerization with caveolins. *J Neurochem* 87(4):1010-1023.
  90. Lee CY, Lai TY, Tsai MK, Ou-Yang P, Tsai CY, Wu SW, Hsu LC, Chen JS 2016. The influence of a caveolin-1 mutant on the function of P-glycoprotein. *Scientific reports* 6:20486.
  91. Barakat S, Demeule M, Pilorget A, Regina A, Gingras D, Baggetto LG, Beliveau R 2007. Modulation of p-glycoprotein function by caveolin-1 phosphorylation. *J Neurochem* 101(1):1-8.
  92. Labrecque L, Nyalendo C, Langlois S, Durocher Y, Roghi C, Murphy G, Gingras D, Beliveau R 2004. Src-mediated tyrosine phosphorylation of caveolin-1 induces its association with membrane type 1 matrix metalloproteinase. *J Biol Chem* 279(50):52132-52140.
  93. Bolos V, Gasent JM, Lopez-Tarruella S, Grande E 2010. The dual kinase complex FAK-Src as a promising therapeutic target in cancer. *OncoTargets and therapy* 3:83-97.
  94. Cheng SY, Sun G, Schlaepfer DD, Pallen CJ 2014. Grb2 promotes integrin-induced focal adhesion kinase (FAK) autophosphorylation and directs the phosphorylation of protein tyrosine phosphatase alpha by the Src-FAK kinase complex. *Mol Cell Biol* 34(3):348-361.
  95. Mistry DS, Chen Y, Wang Y, Zhang K, Sen GL 2014. SNAI2 controls the undifferentiated state of human epidermal progenitor cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 32(12):3209-3218.
  96. Ponuwei GA 2016. A glimpse of the ERM proteins. *Journal of biomedical science* 23:35.
  97. Zhang Y, Dong J, Zhu X, Wang W, Yang Q 2011. The effect of sphingomyelin synthase 2 (SMS2) deficiency on the expression of drug transporters in mouse brain.

Biochem Pharmacol 82(3):287-294.

98. Kobori T, Fujiwara S, Miyagi K, Harada S, Nakamoto K, Nakagawa T, Takahashi H, Narita M, Tokuyama S 2014. Involvement of moesin in the development of morphine analgesic tolerance through P-glycoprotein at the blood-brain barrier. *Drug Metab Pharmacokinet* 29(6):482-489.
99. Kawase A 2014. [Alterations in expression and function of ABC transporters and ERM proteins in inflammation]. *Yakugaku Zasshi* 134(9):925-929.
100. Nakano T, Sekine S, Ito K, Horie T 2013. Ezrin regulates the expression of Mrp2/Abcc2 and Mdr1/Abcb1 along the rat small intestinal tract. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 305(11):G807-817.
101. Yano K, Tomono T, Sakai R, Kano T, Morimoto K, Kato Y, Ogihara T 2013. Contribution of radixin to P-glycoprotein expression and transport activity in mouse small intestine in vivo. *J Pharm Sci* 102(8):2875-2881.
102. Yano K, Otsuka K, Kato Y, Kawabata H, Ohmori S, Arakawa H, Ogihara T 2016. Different regulation of P-glycoprotein function between Caco-2 and Caki-1 cells by ezrin, radixin and moesin proteins. *J Pharm Pharmacol* 68(3):361-367.
103. Arpin M, Chirivino D, Naba A, Zwaenepoel I 2011. Emerging role for ERM proteins in cell adhesion and migration. *Cell Adh Migr* 5(2):199-206.
104. Wang CC, Liao JY, Lu YS, Chen JW, Yao YT, Lien HC 2012. Differential expression of moesin in breast cancers and its implication in epithelial-mesenchymal transition. *Histopathology* 61(1):78-87.
105. Haynes J, Srivastava J, Madson N, Wittmann T, Barber DL 2011. Dynamic actin remodeling during epithelial-mesenchymal transition depends on increased moesin expression. *Molecular biology of the cell* 22(24):4750-4764.
106. Huber MA, Kraut N, Beug H 2005. Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Current opinion in cell biology* 17(5):548-558.
107. Steinestel K, Eder S, Schrader AJ, Steinestel J 2014. Clinical significance of epithelial-mesenchymal transition. *Clinical and translational medicine* 3:17.
108. Schinkel AH, Smit JJ, van Tellingen O, Beijnen JH, Wagenaar E, van Deemter L, Mol CA, van der Valk MA, Robanus-Maandag EC, te Riele HP, et al. 1994. Disruption of the mouse mdr1a P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell* 77(4):491-502.
109. Day CP, Merlino G, Van Dyke T 2015. Preclinical mouse cancer models: a maze of opportunities and challenges. *Cell* 163(1):39-53.
110. Malaney P, Nicosia SV, Dave V 2014. One mouse, one patient paradigm: New

- avatars of personalized cancer therapy. *Cancer Lett* 344(1):1-12.
111. Cui Y, Wu J, Zong M, Song G, Jia Q, Jiang J, Han J 2009. Proteomic profiling in pancreatic cancer with and without lymph node metastasis. *Int J Cancer* 124(7):1614-1621.
112. Langevin SM, Kratzke RA, Kelsey KT 2015. Epigenetics of lung cancer. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine* 165(1):74-90.
113. Barrallo-Gimeno A, Nieto MA 2005. The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development (Cambridge, England)* 132(14):3151-3161.
114. Lopez-Novoa JM, Nieto MA 2009. Inflammation and EMT: an alliance towards organ fibrosis and cancer progression. *EMBO molecular medicine* 1(6-7):303-314.
115. Tokunou M, Niki T, Saitoh Y, Imamura H, Sakamoto M, Hirohashi S 2000. Altered expression of the ERM proteins in lung adenocarcinoma. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 80(11):1643-1650.
116. Maizel JV, Jr., White DO, Scharff MD 1968. The polypeptides of adenovirus. I. Evidence for multiple protein components in the virion and a comparison of types 2, 7A, and 12. *Virology* 36(1):115-125.
117. Shayakhmetov DM, Lieber A 2000. Dependence of adenovirus infectivity on length of the fiber shaft domain. *J Virol* 74(22):10274-10286.

## 主論文目録

本学位論文の内容は下記の発表論文による。

1. Tomono T, Yano K, Ogihara T.  
Snail-Induced Epithelial-to-Mesenchymal Transition Enhances P-gp-Mediated Multi Drug Resistance in HCC827 Cells.  
*Journal of Pharmaceutical Sciences* 106: 2642-2649, 2017
2. Tomono T, Kajita M, Yano K, Ogihara T.  
Adenovirus Vector Infection of Non-small-cell Lung Cancer Cells is a Trigger for Multi-Drug Resistance Mediated by P-glycoprotein.  
*Biochemical and Biophysical Research Communications* 476: 183-187, 2016

以上、全て査読有り。

## 副論文目録

1. 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.  
*Biological and Pharmaceutical Bulletin* 38: 1960-1963, 2015
2. Yano K, Tomono T, Ogihara T.  
Advances in Studies of P-Glycoprotein and Its Expression Regulators.  
*Biological and Pharmaceutical Bulletin* 41: 11-19, 2018
3. Yano K, Tomono T, Ogihara T.  
Gastrointestinal Hormone Cholecystokinin Increases P-Glycoprotein Membrane Localization and Transport Activity in Caco-2 Cells.  
*Journal of Pharmaceutical Sciences* 106: 2650-2656, 2017
4. Arakawa H, Ohmachi T, Ichiba K, Kamioka H, Tomono T, Kanagawa M, Idota Y, Hatano Y, Yano K, Morimoto K, Ogihara T.  
Interaction of Peptide Transporter 1 With D-Glucose and L-Glutamic Acid; Possible Involvement of Taste Receptors.  
*Journal of Pharmaceutical Sciences* 106: 2650-2656, 2017
5. Ono A, Tomono T, Ogihara T, Terada K, Sugano K.  
Investigation of biopharmaceutical and physicochemical drug properties suitable for orally disintegrating tablets.  
*ADMET and DMPK* 4: 335-360, 2016
6. Yano K, Takimoto S, Motegi T, Tomono T, Hagiwara M, Idota Y, Morimoto K, Takahara A, Ogihara T.  
Role of P-glycoprotein in Regulating Cilnidipine Distribution to Intact and Ischemic Brain.  
*Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 29: 254-258, 2014
7. Yano K, Tomono T, Sakai R, Kano T, Morimoto K, Kato Y, Ogihara T.  
Contribution of Radixin to P-Glycoprotein Expression and Transport Activity

in Mouse Small Intestine *In Vivo*.

*Journal of Pharmaceutical Sciences* 102: 2875-2881, 2013

8. Idota Y, Harada H, Tomono T, Morimoto K, Kobayashi S, Kakinuma C, Miyajima C, Kasahara F, and Ogihara T.

Alginate Enhances Excretion and Reduces Absorption of Strontium and Cesium in Rats.

*Biological and Pharmaceutical Bulletin* 36: 485-491, 2013

9. 矢野健太郎, 伴野拓巳, 金川雅彦, 秋山滋男, 荻原琢男.

リン酸結合剤が降圧薬の消化管吸収に及ぼす影響についての検討.

薬局薬学 9: 239-245, 2017

10. 橋場弘武, 矢野健太郎, 伴野拓巳, 金川雅彦, 荻原琢男.

抗うつ薬の QT 延長症候群発生リスクの比較検討.

日本病院薬剤師会雑誌 52: 1148-1152, 2016

以上、全て査読有り。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、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御助言を賜りました高崎健康福祉大学大学院薬学研究科 林 正弘 教授、松岡 功 教授、大根田 絹子 教授に深く感謝申し上げます。

本研究を行うにあたり、多くの御助言、御指導ならびに御討論を賜りました高崎健康福祉大学薬学部薬学科 生物薬剤学研究室 矢野 健太郎 助教、小山 智志 助手、金沢大学医薬保健研究域薬学系 創薬科学分野 荒川 大 助教、MSD 株式会社 梶田 昌裕 博士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-161101)。

各種実験の遂行に尽力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 上岡 宏規 氏、高崎健康福祉大学薬学部薬学科 生物薬剤学研究室 町田 幸也 氏、柴崎 由実 氏に深く感謝致します。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 氏に厚く感謝の意を表します。

最後に、今日まで御指導、御支援を賜りました諸先生方と友人達、先輩、後輩、温かく見守り支えて下さった家族、親族の皆様心より感謝申し上げます。

2018年 2月 吉日 伴野 拓巳

## 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 林 正弘 (薬学博士)

副査 高崎健康福祉大学大学院薬学研究科 教授 松岡 功 (薬学博士)

副査 高崎健康福祉大学大学院薬学研究科 教授 大根田 絹子 (医学博士)