

## 論文の内容の要旨および論文審査の結果の要旨

学位申請者氏名：伴野 拓巳

学位の種類：博士（薬学）

学位記番号：博（薬）甲第二号

学位授与年月日：平成30年3月7日

### 審査委員

主査 高崎健康福祉大学大学院薬学研究科教授 林 正弘

副査 高崎健康福祉大学大学院薬学研究科教授 松岡 功

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

### 論文題目

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

### 【論文内容の要旨】

肺がんの治療は化学療法によるものがほとんどであり、治療に用いる抗がん薬の種類は比較的多いにも関わらず、遠隔転移症例の5年生存率は約3.6%と治療奏効率は低く、その背景としてがん細胞の薬物耐性化の関与が示唆されている。

P-glycoprotein (P-gp)は、細胞内から細胞外へと基質を能動的に排出するトランスポーターであり、がん化学療法の治療奏効率を低下させる因子の一つとして、がん細胞の薬物耐性に関与すると考えられている。P-gpの基質認識性は幅広く、肺がん治療に用いられる抗がん薬の多くがP-gpの基質となり得る。

転写因子であるSnailは、様々な遺伝子の発現に関与しており、がん細胞におけるSnailの発現上昇は上皮間葉転換(EMT: epithelial to mesenchymal transition)を引き起こし、がん転移に関与するとされている。上皮系のがん細胞に誘発されるEMTは、浸潤や転移といった悪性度を促進し易くなるだけでなく、様々な機構を介してがんの薬物耐性化に関与することが明らかになっている。しかしながら、肺がん細胞において、EMTに伴いP-gpの発現や機能がどのように変動するかは、ほとんど解明されていないのが現状である。

本論文は、第1章「序論」、第2章「非小細胞肺がん(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3章「EntinostatによるSnail過剰発現時のP-gp機能亢進抑制」、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7章「総括」、第8章「実験方法の部」

から構成されている。

序論に続く第2章では、ヒト NSCLC 細胞株である HCC827 に Snail を過剰発現させることにより、各種 EMT マーカーの変動が見出され、EMT が誘導されることが確認された。またその際に、タンパク発現量は変化しなかったにも関わらず、P-gp の活性化が認められた。従って、Snail による EMT 誘導時には同時に P-gp の機能が亢進することが明らかになった。第3章では、EMT 誘導抑制効果が報告されている Entinostat (Ent)を用いて、Snail 過剰発現時における P-gp 活性化の抑制が試みられた。その結果、Ent は Snail 過剰発現細胞における EMT を部分的に抑制するとともに、P-gp の活性化を抑制することが示唆された。第4章では、Snail 過剰発現細胞における P-gp 活性化メカニズムを解析するために、P-gp の活性化に関与する膜タンパク質である caveolin-1 に着目し検討された。その結果、Snail 過剰発現細胞では、P-gp の不活性化に関与するリン酸化 caveolin-1 の低下が関与していると考えられた。第5章では、P-gp の細胞膜局在に関与し、活性を調節する ERM タンパク質が着目された。その結果、Snail 過剰発現細胞では ERM のうち、moesin (Msn) の mRNA およびタンパク発現量が顕著に増加していた。siRNA 処理による Msn の knockdown は、Snail 過剰発現細胞における P-gp 基質薬物の排出亢進と薬物耐性化を抑制した。以上から、Snail 過剰発現細胞における P-gp 活性化に Msn が寄与していると考えられた。第6章では、4種類のヒト NSCLC 細胞株及び肺癌患者由来組織（臨床検体）における Snail と P-gp 機能調節因子の mRNA 発現量を解析し、両者の相関が評価された。その結果、Snail の発現が高い細胞ほど ERM の発現も高い傾向が認められた。さらに、肺癌患者由来のがん組織においても Snail と ERM の発現は良好な正の相関を示したが、正常組織では相関は認められなかった。以上の結果より、ヒト肺癌組織においても、Snail は ERM の発現上昇を引き起こし、P-gp を活性化し得ると考えられた。

以上をまとめると、(1)肺癌細胞において、EMT を誘導する Snail 過剰発現状態は、P-gp のタンパク量に影響することなくその機能を活性化すること、さらにその活性化の際には Msn を始めとした ERM タンパク質が増加し、P-gp の細胞膜への局在を増加させる可能性があることが示唆された。(2)ヒト肺癌組織では、Snail と ERM の mRNA 発現量は正の相関を示したが、肺正常組織では相関していなかった。これらの結果から、Snail を肺癌治療の標的とすることは、EMT による浸潤・転移を抑制するだけでなく、肺癌組織選択的に P-gp の機能を抑制し、薬物耐性化を克服し得る可能性が示された。

#### 【論文審査結果の要旨】

論文審査は、主査と副査 2 名による予備審査及び公開発表の場における最終試験により行われた。

予備審査会では、予め提出された論文に記述された全ての内容に基づくプレゼンテーションが行われ、続いてタイトル表現の不備、Figure Legend の説明不足、実験結果からの考察を通し結論を導く際の説明不足、章ごとの論理的なつながりの不足等、論文全体に関する

指摘がなされた。さらに章ごとに、以下のような問題点の指摘、質疑応答が行われた。第1章(序論)では、論文全体に関係する重要な内容のみを記述するように指摘された。第2章では、研究に用いた細胞株の特徴を Table 等にまとめるように指示された。第3章では、Ent による P-gp 抑制機構を説明する必要性および低用量の Ent による P-gp 抑制作用が考えられることを論文中に追記することが要求された。第4章では、caveolin-1 のリン酸化経路の考察が短絡的であるとの指摘があり、考察を追加することになった。さらに本章のまとめの Scheme が視覚的にわかりにくいとの指摘があり、修正するように指示された。第5章では細胞膜上の発現評価等の検討の必要性に関して、加筆が要求された。第6章では、がん組織(臨床検体)を用いているので、その患者背景を Table にまとめるように指示された。また発現傾向・相関解析は GAPDH の発現量に基づく因子の発現量で評価すべきであること、正常とがん組織間での各因子の発現量について、解析し加筆するように指示された。以上のように、いくつかの改善すべき点、加筆修正すべき点が指摘されたが、本研究は広い視点で種々の解析を行っており、科学的、臨床的に意義のある新知見が示されているところから、適切な改善、加筆修正がなされれば、博士の学位論文として、受理できると結論された。

予備審査における指摘事項に関して加筆修正した後に行われた公開の場での最終試験では、論文の主要部分に関するプレゼンテーションが行われ、その後以下のような質疑応答が実施された。

第1章に関しては、P-gp 阻害剤の開発状況について質問があり、治療薬としての開発は進んでおらず、本研究成果がそれを解決する重要な戦略に結び付く可能性があることが回答された。第2章では、P-gp 以外のトランスポーターに対する Snail 過剰発現の影響及びその調節機構について質問があり、P-gp 以外では MRP において、ERM による機能調節に関する報告例があることが回答された。第5章では、抑制性の転写因子である Snail による Msn の発現上昇の機構について質問があり、Snail による転写亢進及び Snail が Msn の転写を抑制している miRNA を抑制し、結果的に Msn の転写が活性化されるという2つの可能性が回答された。第6章におけるヒト組織を用いた解析結果と、それまでに示した培養細胞実験での結果は、どの程度対応しているかという質問があり、培養細胞に強制発現した場合とヒト組織とでは、Snail の発現量は大きく乖離しているため、完全に同一の現象を見ているとは言い切れないことが回答された。その他として、Msn の関与以外に P-gp 機能を直接制御する機構の存在が問われ、本論文第4章の caveolin-1 の関与について研究成果の要点が説明された。

上記最終試験の結果、本研究は Snail を標的とした戦略により、がん特異的に P-gp 機能抑制が可能となることが示された。さらに Snail 以外の要因による EMT でも同様の知見が得られれば、EMT 抑制は、がんの浸潤・転移と P-gp 活性化に起因する薬物耐性を同時に抑制し得ることから、本研究は将来性のある研究として、高く評価されると結論づけられた。以上により、論文審査および最終試験の結果に基づき、審査委員会において慎重に審査した結果、本論文が博士(薬学)の学位に十分値するものであると判断した。