

- 14) Kambe, T. & Andrews, G.K. (2009) *Mol. Cell Biol.*, 29, 129–139.

福中 彩子, 神戸 大朋  
(京都大学大学院生命科学研究科)

Mechanism of zinc transport by zinc transporters, ZnT and ZIP

Ayako Fukunaka and Taiho Kambe (Division of Integrated Life Science, Graduate School of Biostudies, Kyoto University, Kitashirakawa-Oiwake-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8502, Japan)

## がん細胞の薬剤耐性制御機構の新展開

### 1. はじめに

我が国の死因の一位を占めるのは「がん」であり、働き盛りの年齢層における最大の死因でもあり、保健医療上の重要性は極めて高い。がんの本態はゲノム不安定性を背景に、多段階過程を通して複数の遺伝子構造・発現異常が体細胞（がん細胞）に集積することに起因する。従ってがん細胞・組織のゲノム解析は、診断・治療の分子標的を同定し、個別化された予知医療を確立するために極めて有効である。国内でも代表的ながんを対象にゲノム・遺伝子網羅的解析が進み、新たながん関連遺伝子・治療応答性関連遺伝子やその候補領域が多数同定され、機能解析から医薬への応用がはかられようとしている。

がんの予後を左右する因子としては、転移と薬剤耐性があげられる。この二つの問題をどうコントロールするかが患者の存命の鍵となるが、いずれもそのメカニズム解明が様々に検討されているものの、その基礎研究の成果が十分に臨床に反映されていないのが実情である。例えばタキサン系の抗がん剤として知られるドセタキセルはチューブリンの重合を促進して微小管を安定化し、細胞分裂を停止させ、がん細胞のアポトーシスを誘導する薬剤である。ドセタキセルは乳がん治療に有効な薬剤であるが、患者の約半数には奏効せず、奏効者においても乳がん細胞が次第にドセタキセル耐性化することが治療の障害となっている。しかしながら、ドセタキセル感受性や薬剤耐性化を予測する有用な診断キットは一般にはひろまっておらず、薬剤感受性を増感するための治療標的分子も見つかっていないことから、抗がん剤治療の臨床の現場での患者や医師の苦悩は

解決していない。本稿では、筆者らの研究室で発見された薬剤耐性メカニズムを制御する新たな分子の概説と、最近のトピックスである、薬剤耐性のメカニズム理解と根絶に寄与することが期待される microRNA の関与についての知見を紹介する。

### 2. 薬剤耐性機構の新たな主役の発見

RNA 干渉法を利用した網羅的な遺伝子機能解析セルトランスフェクションアレイによって、薬剤耐性を解除する分子を検索した。まず、ドセタキセル非奏効者の乳がん組織で発現上昇している遺伝子の small interfering RNA (siRNA) を合成し、ドセタキセル耐性乳がん細胞株に導入して、RNA 干渉 (RNAi) による機能スクリーニングを実施した。その結果、ribophorin II (RPN2) に対する siRNA は、ドセタキセル存在下で強い細胞増殖抑制とアポトーシス誘導を示し、RPN2 は乳がんの薬剤耐性化に関与していることが明らかになった<sup>1)</sup>。RPN2 の機能を個体レベルで検証するため、薬剤耐性乳がんマウスにドセタキセルと同時に RPN2 siRNA を投与したところ、著しい腫瘍の縮小が認められ、ドセタキセルへの感受性が回復することが確認された。

### 3. 薬剤耐性における RPN2 の機能と糖鎖修飾

RPN2 分子とがんとの関わりは、今までほとんど報告されていない。図 1 左に示すように RPN2 は、粗面小胞体に局在する I 型膜タンパク質で、オリゴ糖転移酵素 (oligosaccharyl transferase: OST) 複合体を構成する成分のひとつである<sup>2)</sup>。OST は、新生ポリペプチド鎖に N-結合型糖鎖を付加する機能を持ち、糖タンパク質の品質管理機構に関与しているとされることから、OST 複合体の 1 成分である RPN2 の役割に着目した。

がん細胞の薬剤耐性化に関与する糖タンパク質として、P-糖タンパク質 (P-gp) は広く認知されている。実際に、薬剤耐性 MCF7-ADR 細胞では、P-gp の発現がその親株 MCF7 に比べ著しく亢進しており、ドセタキセルの排出ポンプとして働いている。P-gp は 140 kDa の新生タンパク質として合成され、糖鎖付加により 170 kDa の糖タンパク質となる。170 kDa の P-gp は細胞膜に移動したうえでリン酸化を受け、ようやく薬剤排出ポンプとして機能する (図 2)。そこで、RPN2 のノックダウンが P-gp の糖鎖修飾を抑制し、薬剤排出能を阻害するかをウエスタンブロット法により確認した。その結果、コントロール siRNA では 170 kDa の成熟型糖鎖の P-gp が主であったの

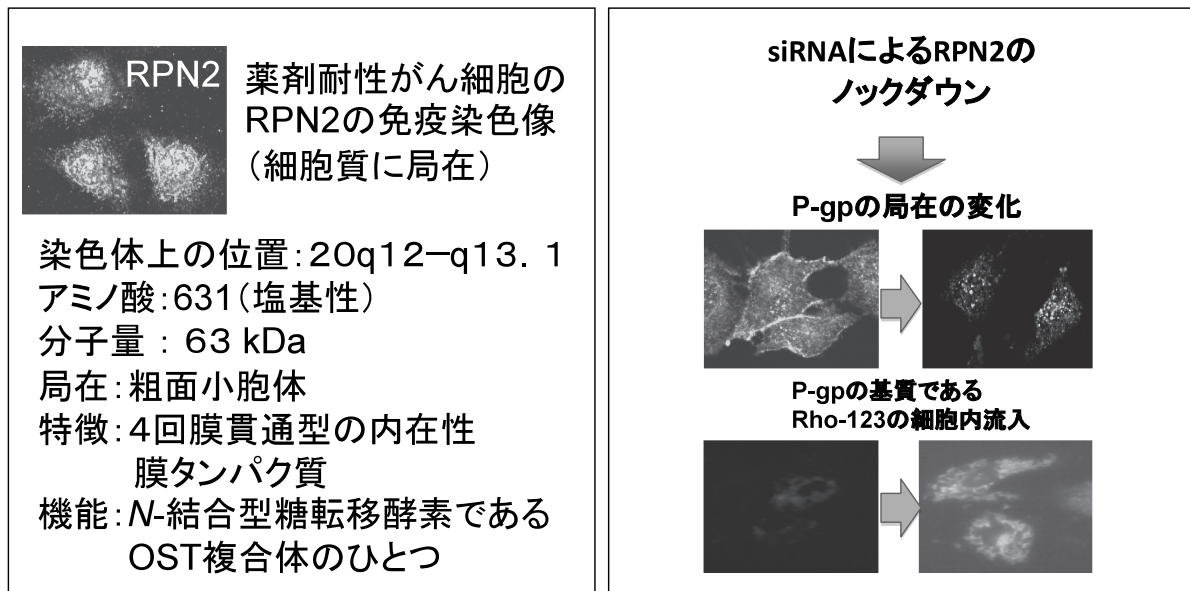


図1 RPN2分子の特徴と薬剤耐性メカニズム

RPN2分子は粗面小胞体に存在する膜貫通型の塩基性タンパク質である。

この分子は糖転移酵素である OST 複合体のコンポーネントであることがわかっているが、がんとの関連はこれまで報告が無かった。RPN2は薬剤耐性のがん細胞で高発現しており、siRNAなどでノックダウンすると、ABCトランスポーターである P-gp は薬剤耐性のがん細胞の膜表面から消失し (局在の変化)、P-gp の基質である Rhodamin-123 が細胞内に流入する結果となり、がん細胞は薬剤耐性能力を失う。

に対し、RPN2 siRNA では 170 kDa のメインバンドは明らかに減弱したスミアパターンとなり、140 kDa の糖鎖未修飾 P-gp が明確に検出されたことから、RPN2 をノックダウンした薬剤耐性細胞では、P-gp が部分的な糖鎖修飾あるいは未修飾の状態が存在し、糖鎖修飾が不完全であることがわかった。また、薬剤耐性細胞では通常細胞膜表面に強く局在する P-gp が、RPN2 をノックダウンすることで細胞膜から完全に消失しており (図1右上)、さらに、Rhodamin-123 の取り込みによる薬剤排出能試験でも、RPN2 をノックダウンした細胞では、P-gp の基質である Rhodamin-123 は排出されず、細胞内に蓄積していた (図1右下)。これらのデータは、RPN2 のサイレンシングが、P-gp の糖鎖修飾を抑え、細胞膜への移動を障害し、薬剤排出ポンプの機能を失わせることによって、MCF7-ADR のドセタキセル感受性を増感することを示唆している。RPN2 は、OST 活性の必須分子ではないとされており<sup>4)</sup>、P-gp 糖鎖修飾の促進因子あるいは安定化因子として、P-gp による薬剤排出能をコントロールしていると考えられる (図2)。また RPN2 は乳がんだけでなく、肺がんや大腸がんの薬剤耐性にも関係しており、ドセタキセル以外の薬剤への耐性にも機能している。以上のことから、

RPN2 は新たな薬剤応答性マーカーや RNAi 医薬の標的として期待されている<sup>3,4)</sup>。

#### 4. 薬剤耐性を制御する microRNA の働き

新たな発現調節分子として non-coding small RNA である microRNA (miRNA) が注目され、がんの薬剤耐性獲得との関連についてもその実態が明らかになりつつある。miRNA は、ヒトでは 800 種類ほどが登録されており、生物の発生から老化をはじめ、発がん、転移等の疾患にも関与することが明らかになりつつある。その最大の特徴は、たった一つの miRNA が、多くの標的となる分子 (時には数百から千を越える) や複数のパスウェイを制御している点である。

抗がん剤の耐性の獲得においても、様々な miRNA の発現の変動を伴うことが発見され、その制御機構や標的分子の探索により、新たな標的分子が明らかにされつつある。各種がんの薬剤耐性に関与すると考えられている miRNA を表1にまとめた。以下に薬剤耐性にかかわる miRNA をがん種ごとにまとめてみた。

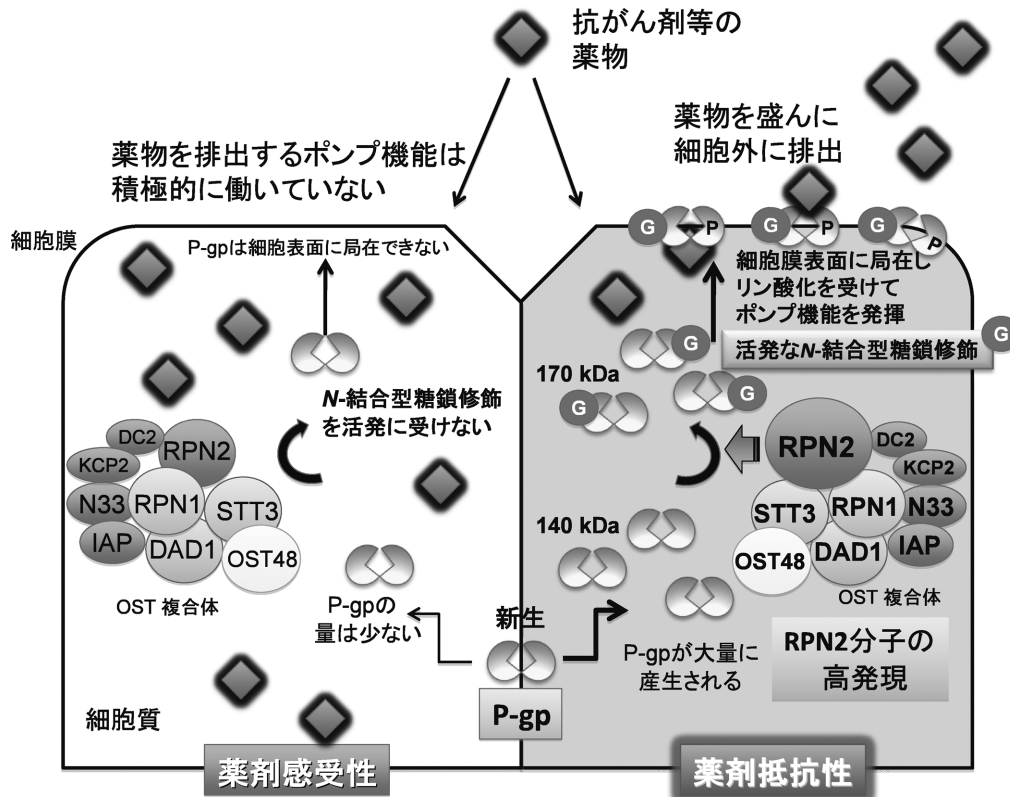


図2 RPN2による薬剤耐性化機構の概説

薬剤感受性細胞 (図左) では、ABC トランスポーターの一種であり、薬剤を細胞外に排出する P-gp の産生は低く、N-結合型糖鎖修飾に働く転移酵素である OST 複合体も活発に働いていないため、薬剤は細胞内に到達しやすい。ところが薬剤耐性がん細胞 (図右) では、P-gp が盛んに合成されるとともに、RPN2 が高発現しており、OST 複合体は P-gp に糖鎖(G)を付加、P-gp は細胞膜に移動し、薬剤を排出する。このため細胞は薬剤耐性を示すことになる。一方、RPN2 を siRNA などサイレンシングすると、P-gp の糖鎖修飾が低下し、細胞膜への移動が阻害され、P-gp はリン酸化されることも無く薬剤排出能を失い、細胞内にドセタキセルを保持、感受性が回復する。

表1 がんの薬剤耐性を制御する microRNAs

がんの種類	耐性薬剤	microRNA	
		発現上昇	発現低下
乳がん	ドキシソルピシン	21, 28, 106a, 206	let-7, 27b, 34a, 127, 200c
	タモキシフェン	32, 171, 181b, 203, 213, 221/222, 375	21, 23, 24, 27, 200, 342, 489
	シスプラチン他	1b-1, 22, 126, 152, 196a, 198, 214, 216, 223, 370, 519e, 520, 521	let-7i, -321, -509
卵巣がん	ドキシソルピシン	27a, 99a, 100, 125b1, 451	
	シスプラチン	1b-1, 22, 125b, 126, 152, 196a, 198, 214, 216, 223, 370, 520, 521, 519e	Let-7e, let-7i, 30c, 130, 321, 335, 509
胆管がん	パクリタキセル	let7e	30c, 125b, 130, 335
	ゲムシタピン	-21, -200b	
前立腺がん	カンプトテシン		34a
胃がん	ビンクリスチン他	302b, 492	let-7a, 15b, 16, 17-5p, 20a, 23b, 106a, 106b, 196a, 320

#### 4-1. 乳がん

Kovalchukらは、ヒト乳がん細胞株のドキシソルビンに対する感受性株と耐性株との間のmiRNAの発現をmiRNAアレイにより比較した結果、microRNA-21 (miR-21)、-28、-106a、-206が薬剤耐性株で発現が上昇し、逆にmiR-27b、-127、-34a、-200c、let-7の発現は減少していることを明らかにした<sup>5)</sup>。そしてそれぞれのmiRNAのデータベースで予測される標的遺伝子の抑制も実際にタンパクレベルで確認できた。また、ドキシソルビン耐性株ではmiRNAのプロセッシングに必要なDicerとArgonaute 2の発現が抑制されており、乳がん細胞の薬剤耐性化には、miRNAの発現だけでなく、miRNAの成熟過程の異常が関与することも示唆した。さらに、P-gpのMDR1を抑制することが予測される、miR-451を耐性株に導入した場合、ドキシソルビンに対する感受性が回復することを見いだした。しかし、Zhuらは、ドキシソルビン耐性の卵巣がん細胞でmiR-451とmiR-27aを過剰発現させると、MDR1の発現は上昇し、逆にmiR-451とmiR-27aを抑制するとMDR1の発現と薬剤排出能は低下すると報告しており<sup>6)</sup>、miR-451の機能解明にはさらなる解析が必要とされる。また、Millerらの報告によれば、タモキシフェンに対して耐性を示す乳がん細胞株では前述のドキシソルビン耐性株と異なり、miR-221、-222、-181が感受性株と比較して上昇し、miR-21、-342、-489は減少していた<sup>7)</sup>。よって、抗がん剤によって耐性獲得に関与するmiRNAが異なることが考えられる。さらに同グループはヒトの乳がん組織において、Her2陽性の乳がんでmiR-221/222の発現が高いことから、内分泌療法抵抗性とmiR-221/222の発現上昇にも関連があることを示した。またmiR-221/222の標的遺伝子については、p27<sup>Kip1</sup>を挙げており、p27<sup>Kip1</sup>の発現抑制ががんの悪性化に寄与していると推測した。このmiR-221/222の発現上昇が、乳がん細胞株のタモキシフェン耐性に関与することは、Zaoらも報告しているが、彼らはmiR-221/222がestrogen receptor alpha (ERalpha)を抑制することを見だし、抗エストロゲン療法に対する抵抗性との関与を示唆した<sup>8)</sup>。そして、この現象を複数のヒト乳がん細胞株でも確認し、miR-221/222の難治性乳がんにおける重要性を示した。

#### 4-2. 胆管がん

それ以前の2006年のMengらの報告では、胆管がん細胞において良性腫瘍細胞株と比較して発現の高かったmiRNAのうち、miR-21、-200bを抑制すると、ゲムシタ

ビンに対する感受性が亢進することを示した<sup>9)</sup>。さらに、マウスへ腫瘍の移植実験では、ゲムシタビンの投与により移植腫瘍中のmiR-21の発現が上昇すること、さらにmiR-21はがん抑制遺伝子であるPTENを抑制し、がんの悪性化に寄与することを示唆した。このPTENを標的としたmiRNAについてはYangらも注目し、miR-214をヒト卵巣がん細胞株へ導入すると、PTENを抑制し、プロテインキナーゼであるAKTを活性化し、シスプラチンに対し耐性を示すことを報告した<sup>10)</sup>。

#### 4-3. 前立腺がん

前立腺がん細胞においてもFujitaらの報告があり、miR-34aはp53により転写調節を受けるが<sup>11-13)</sup>、p53がホモ欠損のヒト前立腺がん細胞株である、PC-3細胞や、p53の変異を持つDU145細胞は、野生型p53を持つLnCaP細胞と比較し、miR-34aの発現が著しく低下しており、PC-3細胞へmiR-34aを過剰発現させると、SIRT1、CDK6、サイクリンD1、E2F3、E2F1、BCL2の発現が抑制され、さらにカンプトテシンに対して耐性を示すことを示した。我々はmiR-16が前立腺がんの細胞株や臨床検体でその発現がloss of heterozygosity (LOH)によって低下していることを見いだした。この前立腺がんの骨転移モデルを用いたイメージング実験により、miR-16の補充療法は抗がん作用を示すことが判明した<sup>14)</sup>。miR-16と薬剤耐性やホルモン応答性との関連は明らかではない。

#### 4-4. その他のがん

胃がんに関してXiaらは、多剤耐性の胃がん細胞株とその親株とを比較し、耐性株で発現の低下していたmiR-15bとmiR-16を過剰発現させることによりBCL2の発現を抑制し、複数の薬剤に対する感受性を亢進させた<sup>15)</sup>。miR-15bとmiR-16の発現が慢性リンパ性白血病でLOHにより発現低下がみられ、標的遺伝子がBCL2であることは報告されているが<sup>16)</sup>、薬剤耐性にも関与を示す点は興味深い。

### 5. miRNAによる薬剤耐性予測

これらの報告のように、ヒトがん細胞株の親株と薬剤耐性株の間の、miRNAの発現を比較する実験が、薬剤耐性に関与するmiRNの探索では最も多く行われている。また、miRNAは培養細胞への導入、抑制が容易に行えるため、網羅的解析で候補に挙げられたmiRNAが実際に培養細胞の薬剤耐性に影響を与えるか否か、迅速な検証が可能である。Yangらの臨床サンプルによる解析では、卵巣が

ん患者のうち、化学療法に完全寛解を得た患者42例、一部寛解または非寛解27例の原発巣の凍結検体におけるmiRNAを比較検討した結果、let-7iが化学療法耐性の患者で低下しており、薬剤耐性と予後の新規のバイオマーカーとなりうることを示唆した<sup>17)</sup>。このように、薬剤耐性とその発現が強い相関を示すmiRNAは、化学療法を行う際の薬剤の選択や、予後予測の判断因子として臨床への応用が期待できる。特にmiRNAは、血液等の体液中にも安定に存在することがわかってきており、将来的には薬剤耐性や転移等の病態を即座に血液中のmiRNAの変動でモニター可能になる時代がくるかもしれない。

## 6. おわりに

本研究では、実際の乳がん患者の遺伝子発現プロファイルをもとに、RPN2という薬剤耐性乳がんの治療標的分子を同定した。従来の遺伝子機能解析では、予め期待される機能を有する候補遺伝子に絞りこむといった、かなり偏りのある解析が通例行われてきたが、われわれはセルトランスフェクションアレイという偏りの無い解析を実施することにより、薬剤耐性の鍵を握る新規標的分子RPN2を見いだすことに成功した。RPN2は粗面小胞体に局在する膜タンパク質であり、今までの創薬概念では創薬不可能な標的といえる。しかし、RNAiの出現により創薬の可能性は大きく広がり、RPN2を標的とするRNAi医薬が薬剤耐性乳がんの分子標的薬として利用できると期待される。現在は、このRPN2分子を制御するmicroRNAの同定にも成功し、そのmiRNAが薬剤耐性やリンパ節転移と相関する可能性が見いだされており、miRNAのようなnon-coding small RNAが制御する薬剤耐性化機構の全容解明は本研究分野に大きなインパクトを与えるに違いない。

## 謝辞

本研究内容は、本間紀美博士（RPN2の発見）や、国立がんセンター研究所がん転移研究室の竹下文隆博士、高橋稜宇博士（microRNAの研究）らによる研究成果である。

- 1) Honma, K., Iwao-Koizumi, K., Takeshita, F., Yamamoto, Y., Yoshida, T., Nishio, K., Nagahara, S., Kato, K., & Ochiya, T. (2008) *Nat. Med.*, 14, 939-948.
- 2) Kelleher, D.J. & Gilmore, R. (2006) *Glycobiology*, 16, 47R-62R.
- 3) Chin, G.J. (2008) *Science*, 321, 1273.
- 4) RPN2 overexpression confers resistance to docetaxel in breast cancer. (2008) *Nat. Clin. Pract. Oncol.*, 5, 686 (Research Highlight).

- 5) Kovalchuk, O., Filkowski, J., Meservy, J., Ilnytsky, Y., Tryndyak, V.P., Chekhun, V.F., & Pogribny, I.P. (2008) *Mol. Cancer Ther.*, 7, 2152-2159.
- 6) Zhu, H., Wu, H., Liu, X., Evans, B.R., Medina, D.J., Liu, C.G., & Yang, J.M. (2008) *Biochem. Pharmacol.*, 76, 582-588.
- 7) Miller, T.E., Ghoshal, K., Ramaswamy, B., Roy, S., Datta, J., Shapiro, C.L., Jacob, S., & Majumder, S. (2008) *J. Biol. Chem.*, 283, 29897-29903.
- 8) Zao, J.J., Lin, J., Yang, H., Kong, W., He, L., Ma, X., Coppola, D., & Cheng, J.Q. (2008) *J. Biol. Chem.*, 283, 31079-31086.
- 9) Meng, F., Henson, R., Lang, M., Wehbe, H., Maheshwari, S., Mendell, J.T., Jiang, J., Schmittgen, T.D., & Patel, T. (2006) *Gastroenterology*, 130, 2113-2119.
- 10) Yang, H., Kong, W., He, L., Zhao, J.J., O'Donnell, J.D., Wang, J., Wenham, R.M., Coppola, D., Kruk, P.A., Nicosia, S.V., & Cheng, J.Q. (2008) *Cancer Res.*, 68, 425-433.
- 11) Fujita, Y., Kojima, K., Hamada, N., Ohhashi, R., Akao, Y., Nozawa, Y., Deguchi, T., & Ito, M. (2008) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 377, 114-119.
- 12) Hermeking, H. (2007) *Cancer Cell*, 12, 414-418.
- 13) Tazawa, H., Tsuchiya, N., Izumiya, M., & Nakagama, H. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, 15472-15477.
- 14) Takeshita, F., Bader, A.G., Osaki, M., Takahashi, R., Yamamoto, Y., Kosaka, N., Kawamata, M., Kelnar, K., Brown, D., & Ochiya, T. (2010) *Mol. Ther.*, 18, 181-187.
- 15) Xia, L., Zhang, D., Du, R., Pan, Y., Zhao, L., Sun, S., Hong, L., Liu, J., & Fan, D. (2008) *Int. J. Cancer*, 123, 372-379.
- 16) Cimmino, A., Calin, G.A., Fabbri, M., Iorio, M.V., Ferracin, M., Shimizu, M., Wojcik, S.E., Aqeilan, R.I., Zupo, S., Dono, M., Rassenti, L., Alder, H., Volinia, S., Liu, C.G., Kipps, T.J., Negrini, M., & Croce, C.M. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 13944-13949.
- 17) Yang, N., Kaur, S., Volinia, S., Greshock, J., Lassus, H., Hasegawa, K., Liang, S., Leminen, A., Deng, S., Smith, L., Johnstone, C.N., Chen, X.M., Liu, C.G., Huang, Q., Katsaros, D., Calin, G.A., Weber, B.L., Bützow, R., Croce, C.M., Coukos, G., & Zhang, L. (2008) *Cancer Res.*, 68, 10307-10314.

落谷 孝広

(国立がんセンター研究所がん転移研究室)

Novel mechanisms of drug resistance in cancer  
Takahiro Ochiya (Section for Studies on Metastasis, National Cancer Center Research Institute, 5-1-1, Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo 104-0045, Japan)