

令和元年6月17日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18442

研究課題名(和文) 肺癌のパクリタキセル耐性に関わる関連タンパク質の同定とその機能解明

研究課題名(英文) Identification and mechanisms of paclitaxel resistance related protein in lung cancer cell lines

研究代表者

下村 雅律 (Shimomura, Masanori)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90433268

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々はパクリタキセル結合タンパク質の候補としてヒトFIGNL1を同定した。超解像蛍光顕微鏡を用いた観察でFIGNL1は微小管のアセチル化チューブリンに高頻度に結合することが観察された。さらにFIGNL1ノックダウン細胞においてチューブリンの重合とアセチル化は共に著しく増加し、パクリタキセルに対する耐性を低下させた。またタンパク質-リガンド結合のin silico解析から、パクリタキセルがFIGNL1の二量体化で新たに形成された表面ポケットへ結合することが予測された。パクリタキセルが活性型FIGNL1多量体への結合を通じてアセチル化微小管切断酵素作用を抑制する可能性を考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

パクリタキセルはチューブリンに結合して微小管の重合化及び安定化を促進することで抗腫瘍効果をきたすとされている。パクリタキセルの感受性を規定する因子は未だ十分に解明されていない。われわれはプロテオーム解析を経て得られたパクリタキセル結合タンパク質の同定を行った。そのひとつとしてFIGNL1タンパクが同定され、安定化したアセチル化チューブリンに結合しそれらを切断することで微小管の不安定化をきたし薬剤耐性が生じている可能性が考えられた。新たな耐性機構の解明につながる成果であり、薬剤耐性克服の一助になる可能性を考えている。

研究成果の概要(英文)：We have identified human FIGNL1 as a candidate of paclitaxel binding protein with an affinity pull-down method followed by LC-MS/MS. Higher expression of FIGNL1 protein was detected in the drug-resistant lung cancer cell line than in the sensitive ones. We observed that cytoplasmic FIGNL1 is frequently attached to acetylated tubulin in microtubules with super-resolution fluorescent microscopy, and that FIGNL1 knock-downed cell had a tendency of increase in both polymerization and acetylation of tubulins and decrease in paclitaxel resistance. Stabilization of tubulins by paclitaxel may be antagonized by the severing activity of FIGNL1. Now, in silico protein-ligand docking analysis did not predict the binding of the drug to the catalytic domain but to the surface pocket newly formed in a FIGNL1 dimer. Because the octamer of Fidgetin is known to be its active form, we speculate that the drug contributes to the binding to the active form, enhancing the above antagonistic action.

研究分野：呼吸器外科学，腫瘍診断学，分子生物学

キーワード：パクリタキセル FIGNL1 抗がん剤耐性機序

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

パクリタキセルは  $\alpha$ -tubulin に結合して微小管の重合化及び安定化を促進することで抗腫瘍効果をきたすとされている。プラチナ系抗癌剤と組み合わせたレジメンが肺癌化学療法で広く用いられているが、パクリタキセルの感受性を規定する因子は未だ十分に解明されていない。一方、肺癌分子標的治療薬である epithelial growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor (EGFR-TKI) 投与にあたり、特定遺伝子配列の変異の有無が薬剤の感受性予測にきわめて有用であることが実地臨床でも証明されており、一般的な抗がん剤においても感受性予測が重要であることは論を待たない。パクリタキセルに対する耐性機序は不明な点も多く、われわれは、肺癌細胞株 3 種類 (H18, A549, RERF-LC-KJ) におけるパクリタキセルに対する感受性を検討し、50%抑制濃度 (50% inhibitory concentration:  $IC_{50}$ ) に大きな差異があることを見いだした (図 1)。また、もっとも耐性の高い細胞株である RERF-LC-KJ において、細胞内にパクリタキセルが細胞内小体状に集積し、感受性株よりも顕著であったことを確認し、パクリタキセルに対する耐性機序に関与すると報告した。(Shimomura et al, International Journal of oncology 40: 995-1004, 2012) FG ビーズ (多摩川精機) にパクリタキセルをリガンドとして固定化し、これを用いて、細胞溶解液からパクリタキセルの結合タンパクを回収した。パクリタキセルに対して耐性が異なる 3 種類の肺腺癌細胞株 RERF-LC-KJ ( $IC_{50}$ : 100  $\mu$ M), A549 ( $IC_{50}$ : 100 nM), H18 ( $IC_{50}$ : 4.7 nM) から得られたパクリタキセル結合タンパク質の発現パターンを銀染色にて比較し、明らかに細胞間で異なる分子量のバンドが複数確認され、パクリタキセルに対して直接的、あるいは間接的に相互作用を持つタンパク質の存在が示唆された。

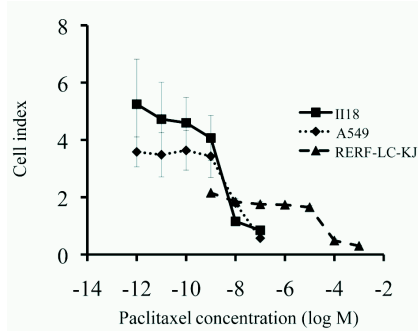
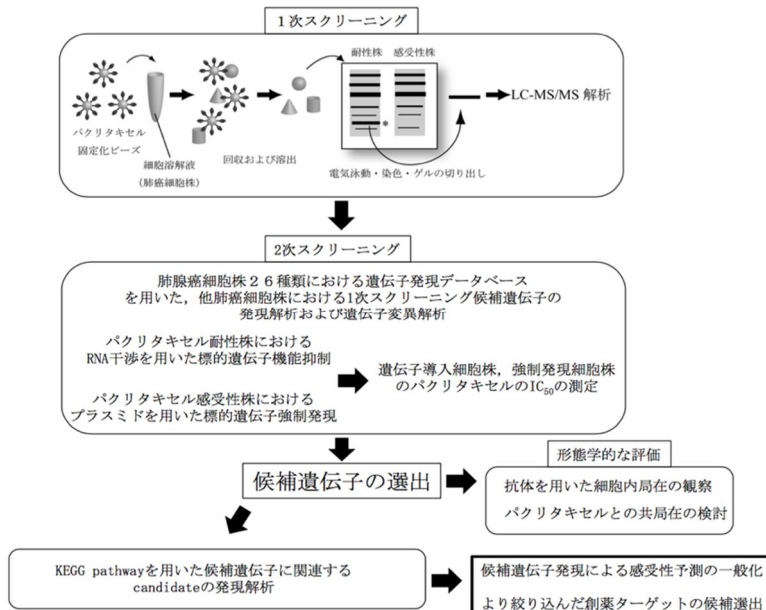


図 1, xCelligence system により測定したパクリタキセル濃度と細胞傷害の関係。RERF-LC-KJ はもっとも耐性が高い。Normalized cell index: ウェルと細胞間のインピーダンスを数値化したもので、細胞の生着率を反映する。

### 2. 研究の目的

1 次スクリーニングとして、パクリタキセル固定化ビーズで回収した結合タンパク質のうち、細胞株によって差次的に得られたバンドから質量分析を行う。それによって得られたタンパク質について、ノックアウト、強制発現による耐性変化を細胞株にて検討する。これらの結果を踏まえ、癌臨床検体を用いて初代培養システムで各検体におけるパクリタキセルの感受性を測定し、そのデータと同タンパク質の遺伝子レベルでの発現量との間に相関があるかを検討する。

### 3. 研究の方法



#### 4. 研究成果

##### 1) パクリタキセル耐性関連タンパク質の同定

MS 解析により FIGNL1 タンパクが同定された。そこで、パクリタキセル耐性細胞株において siRNA を用いた抑制実験を行うと、細胞株におけるパクリタキセルに対する耐性が低下することを示した(図 2)。

##### 2) FIGNL1 タンパクの機能解明

超解像蛍光顕微鏡による RERF-LC-KJ 細胞株の観察により、FIGNL1 が細胞質内に局在すること、FIGNL1 の発現抑制により微小管アセチル化領域が顕著に拡大していること(図 3)、および微小管と共局在するものはアセチル化領域に限局されること(図 4)を見いだした。耐性株における FIGNL1 発現亢進は、パクリタキセルの微小管へのアクセスを低下させる一方、パクリタキセルによる重合安定化効果を低下させるという状況を生み出すことで、耐性獲得に寄与することが示唆された。

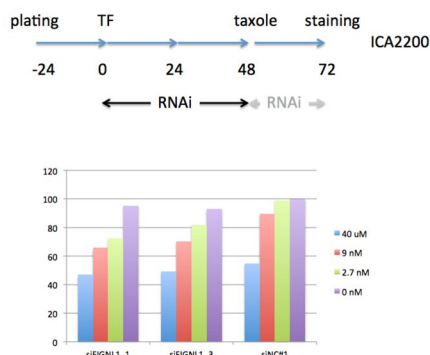


図 2, siRNA を用いた FIGNL1 抑制による耐性細胞株の生存率の変化

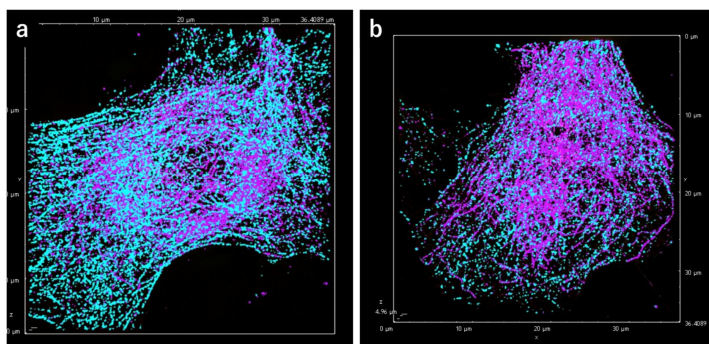


図 3, 超解像蛍光顕微鏡による RERF-LC-KJ 細胞株における FIGNL1 (Cyan) とアセチル化チューブリン(Magenta)の像 .a, 野生型細胞株 .b, FIGNL1 ノックダウン株 .FIGNL1 ノックダウンにより微小管アセチル化領域が顕著に拡大している。

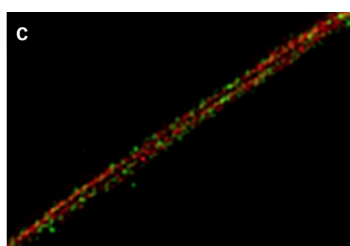


図 4, 超解像蛍光顕微鏡による RERF-LC-KJ 細胞株における FIGNL1(Green) とアセチル化チューブリン(Red)の像。微小管と共局在している FIGNL1 はアセチル化領域に限局している。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 件)

[学会発表](計 件)

[図書](計 件)

〔産業財産権〕  
出願状況（計 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。