

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書



平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19953

研究課題名（和文）HSP27を標的に5-FU耐性を克服する新規薬剤の臨床化に向けた基礎研究

研究課題名（英文）Basic research of Heat Shock Protein 27 as a new target to overcome 5-fluorouracil resistance.

研究代表者

浅田 祐介（ASADA, YUSUKE）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教

研究者番号：50649952

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000 円

研究成果の概要（和文）：ヒト大腸癌細胞株WiDr（親株）に5-fluorouracil（5-FU）を曝露することで、耐性が出現した細胞株（耐性株）を樹立した。耐性株では、親株と比較してHeat Shock Protein 27（HSP27）の発現が増強していた。耐性株において増強したHSP27を再抑制することで、一旦出現した耐性の緩和を認めた。特に大腸癌化学療法中の耐性出現時における、HSP27を標的とした新たな治療の開発に向けた重要なデータである。

研究成果の概要（英文）：We generated the drug-resistant subclone of human colon cancer cell line WiDr by exposure to 5-fluorouracil (5-FU). Higher Heat Shock Protein 27 (HSP27) level was demonstrated in drug-resistant subclone than in naïve cell line. Down-regulation of overexpressed HSP27 suppressed generated 5-FU resistance in drug-resistant subclone. These data is important to develop a new therapy targeted on HSP27, especially to overcome generated resistance during chemotherapy in colon cancer.

研究分野：外科学

キーワード：大腸癌 化学療法 耐性 5-fluorouracil Heat Shock Protein 27

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 切除不能進行・再発大腸癌に対する化学療法と薬剤耐性

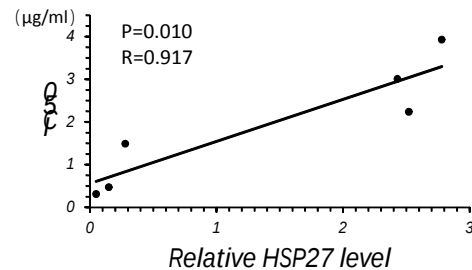
切除不能進行・再発大腸癌の予後は不良であり、近年飛躍的な進歩を遂げた化学療法によっても生存期間は2年程度にとどまる。その主な原因が化学療法に対する薬剤耐性であり、耐性メカニズム解明と克服に向けたさらなる基礎研究は、今後の大腸癌治療において極めて重要である。

### (2) 本研究に至る我々の研究成果

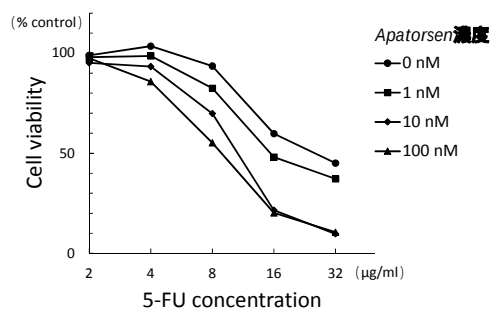
Fluorouracil (5-FU) は大腸癌化学療法における key drug である。これまで我々は、「大腸癌における Heat Shock Protein 27 (HSP27) の発現は、5-FU 感受性を規定している。」という仮説を証明すべく研究を進めてきた。HSP27 は正常細胞においてもストレスによって誘導され細胞保護作用を有するが、この作用が逆に癌細胞では 5-FU 耐性をもたらすと我々は考えた。

まず、6 種類のヒト大腸癌細胞株において HSP27 発現と 5-FU 感受性は逆相関した(図 1)。次に、HSP27 高発現株(5-FU 低感受性)に HSP27 siRNA を導入して発現を抑制すると 5-FU 感受性が上昇した(Tsuruta et al. Oncol Rep. 2008)。さらに、HSP27 高発現株に HSP27 shRNA を導入して発現を抑制した細胞株を移植したマウスでは、親株(非抑制株)移植マウスと比較して 5-FU 感受性が上昇した(Hayashi et al. Oncol Rep. 2012)。

これらの結果は、我々の仮説通り大腸癌における HSP27 発現と 5-FU 耐性の強い関連を示唆しており、HSP27 抑制をターゲットとして 5-FU 耐性を克服する新たな薬剤の臨床化に寄与する。実際に現在、HSP27 mRNA の翻訳阻害により発現を抑制する薬剤である Apatorsen を用いて、5-FU 耐性の克服を目指している。HSP27 高発現株(5-FU 低感受性)に対する Apatorsen 曝露により濃度依存性に HSP27 発現が抑制され、5-FU 感受性が上昇した(図 2)。さらに、HSP27 高発現株を移植したマウスにおいて、5-FU と Apatorsen の併用による抗腫瘍効果の増強を検討している。



**図 1** ヒト大腸癌細胞株において、HSP27 発現と 5-FU 感受性は逆相関した (IC50: MTT assay において、cell viability を % control で 50% とするために必要な濃度)



**図 2** HSP27 高発現株(5-FU 低感受性)に対する Apatorsen 曝露により、濃度依存性に 5-FU 感受性が上昇した (MTT assay で cell viability が速やかに低下)

## 2. 研究の目的

これまでの我々の研究は、HSP27 高発現の大腸癌が 5-FU に対する自然耐性を有することを明らかにした。一方で、進行大腸癌に対する一次化学療法の奏効率率は 50% 以上と比較的良好である。すなわち、臨床的により重要な予後不良因子は、むしろ同一化学療法の反復投与により出現する薬剤耐性(獲得耐性)である。

そこで本研究は、HSP27 が 5-FU に対する獲得耐性にも関与することの証明を目的とする。さらに、一旦出現した獲得耐性が休薬により改善する現象(いわゆる stop and go)が臨床的に知られており、これと HSP27 の関連も明らかにする。

## 3. 研究の方法

今回我々は、HSP27 が 5-FU 反復投与により出現する獲得耐性にも関与すると考え、これを証明する。

方法は以下の三段階である（図3）。

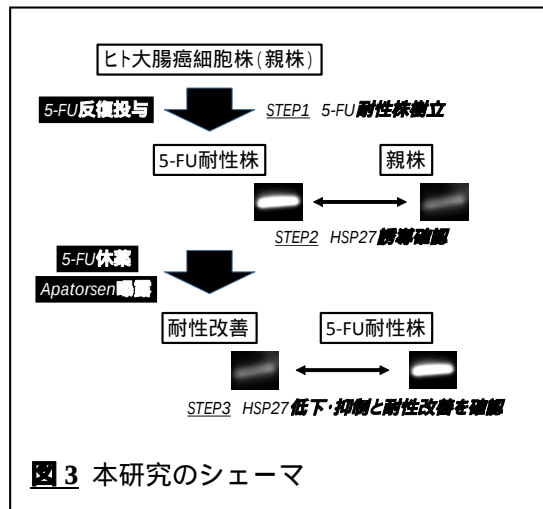
（1）5-FU に対して獲得耐性が出現したヒト大腸癌細胞株（5-FU 耐性株）の樹立

（2）5-FU 耐性株において HSP27 が誘導されていることの確認

（3）一旦誘導された HSP27 の低下や抑制による獲得耐性改善の確認

5-FU 休薬による HSP27 低下と獲得耐性改善

Apatorsen（HSP27 mRNA の翻訳を阻害する薬剤）曝露による HSP27 抑制と獲得耐性改善



#### 4．研究成果

##### （1）実験結果

上記で計画した研究目的・方法に基づき、以下の三段階の実験結果を得た。

5-FU に対して獲得耐性が出現したヒト大腸癌細胞株（5-FU 耐性株）の樹立：比較的 5-FU に対する感受性が高く、HSP27 発現量が低いヒト大腸癌細胞株 WiDr に 5-FU を曝露し、5-FU 耐性株を樹立した。具体的には 150  $\mu$ g/ml の 5-FU を WiDr に 24 時間曝露させ、生存した細胞を培養し、耐性株モデルとした。親株（WiDr）および樹立に成功した耐性株（WiDr-R）の IC<sub>50</sub> はそれぞれ 2.4、46.9  $\mu$ g/ml であり、耐性の獲得が確認された（図4）。

5-FU 耐性株において HSP27 が誘導されていることの確認：

WiDr-P および WiDr-R150 における HSP27 発現を real-time RT-PCR（図5）および Western blot（図6）で評価したところ、ともに、WiDr-R で HSP27 発現が増強していた。耐性獲得に伴い、HSP27 が誘導されたと考えられた。

一旦誘導された HSP27 の低下や抑制による獲得耐性改善の確認：

耐性株において誘導された HSP27 を、HSP27 siRNA 導入により再抑制することで、一旦獲

得した耐性が緩和された。一方で、親株において少ないながらも発現した HSP27 を抑制しても、さらなる 5-FU 感受性の増強は認めなかった。

##### （2）得られた結果の意義

これまでの我々の研究は、大腸癌の 5-FU に対する自然耐性における HSP27 の役割を解明し、HSP27 発現を抑制する Apatorsen と 5-FU を併用する新たな治療法の可能性が示唆された。一方で、臨床的にしばしば苦慮するのはむしろ獲得耐性であり、Apatorsen を全症例に化学療法開始当初より併用することは費用対効果（分子標的薬は非常に高価である）や副作用等の点から現実的ではない。すなわち、Apatorsen の臨床化に向けては、適切な症例選択や投与タイミングに関するさらなる基礎的研究が必須である。本研究は、例えば 5-FU を含む一次化学療法の反復により治療不応となった症例に限った Apatorsen の併用といった、臨床に即した投与方法を裏付ける極めて重要なデータとなる。これらの知見は、より費用対効果や副作用制御に優れたオーダーメイド大腸癌化学療法の確立に寄与する。

一方で、現時点では invitro における siRNA を用いた検討にとどまっており、in vivo における同様の検討、および実際に Apatorsen を用いた検討が今後必要である。

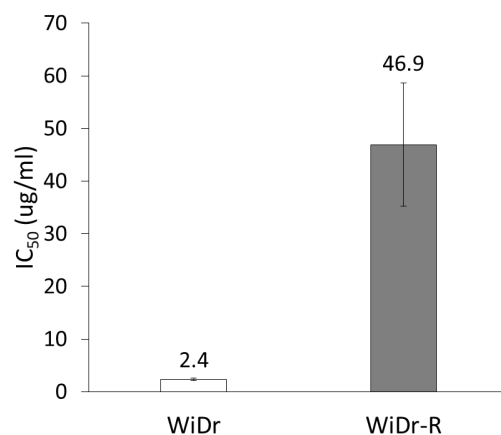
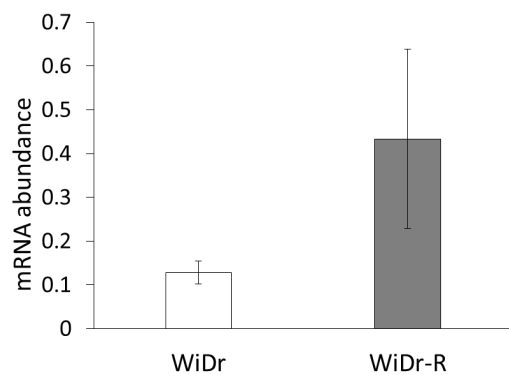
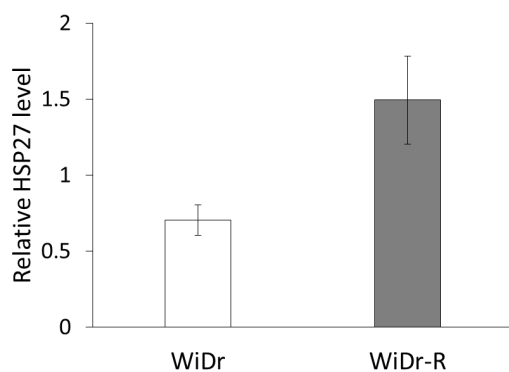


図4 5-FU 耐性株の樹立



**図 5** 5-FU 耐性株における HSP27 誘導 (real-time RT-PCR)



**図 6** 5-FU 耐性株における HSP27 誘導 (Western blot)

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔学会発表〕(計 1 件)

1. 浅田 祐介、5-fluorouracil 耐性大腸癌細胞株における Heat shock protein 27 発現、第 50 回制癌剤適応研究会、2017 年

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

浅田 祐介 (ASADA, Yusuke)

慶應義塾大学・医学部 (信濃町)・助教

研究者番号: 50649952

### (2) 研究協力者

鶴田 雅士 (TSURUTA, Masashi)