

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：24402

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16418

研究課題名（和文）トリプルネガティブ乳癌における薬剤感受性調節薬および治療効果予測マーカの開発

研究課題名（英文）Development of Drug Sensitivity Modulators and Predictive Markers of Therapeutic Response in Triple Negative Breast Cancer

研究代表者

高橋 克之（TAKAHASHI, KATSUYUKI）

大阪市立大学・大学院医学研究科・薬剤部職員

研究者番号：10597751

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：乳癌は適切な治療により予後の延長が期待できる癌種である。しかしながら、トリプルネガティブ乳癌（TNBC）は乳癌の約20%を占め、予後不良なサブタイプである。そのため、抗がん剤の感受性を高める薬剤の標的分子や抗がん剤の効果を予測するバイオマーカの開発が切望されている。そこで我々は、TNBCにおけるHsp72のクライアントタンパク質が薬剤耐性に重要な役割を果たしているのではないかと仮説を立てた。その結果、標的分子を同定したが、一貫した結果を得ることができなかった。以上より、Hsp72の発現プロファイルがHsp72クライアント蛋白質が薬剤感受性に影響するかどうかを規定している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

トリプルネガティブ乳がんの薬物治療の選択肢は殺細胞性抗癌剤のみであり、予後不良なサブタイプである。そのため、抗がん剤の感受性を高める薬剤の標的分子や抗がん剤の効果を予測するバイオマーカの開発が切望されており、候補分子が明らかとなれば、癌研究・医療に多大な貢献をもたらすことが期待できる。今回の結果は一貫した結果は得られなかったが、その理由がHsp72の発現プロファイルによるものと考えられることから、今後はHsp72の発現比較を実施し、発現亢進がみられる細胞株での再解析により真の候補分子が見いだされることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：Breast cancer is a type of cancer that can be expected to have a prolonged prognosis with appropriate treatment. However, triple negative breast cancer (TNBC) accounts for about 20% of breast cancers and is a poor prognosis subtype. Therefore, the development of drug target molecules that increase sensitivity to anticancer drugs and biomarkers that predict the efficacy of anticancer drugs is much needed. Therefore, we hypothesized that Hsp72 client proteins in TNBC may play an important role in drug resistance. We identified several target molecules, but were unable to obtain consistent results. These results suggest that the expression profile of Hsp72 may determine whether Hsp72 client proteins affect drug sensitivity.

研究分野：腫瘍学

キーワード：トリプルネガティブ乳癌 分子シャペロン 抗がん剤感受性

1. 研究開始当初の背景

(1) トリプルネガティブ乳癌に対する薬物療法の問題点と課題

乳癌は女性の部位別罹患患者数で第1位と最も多い罹患数であるが、死亡者数は第5位と罹患患者数に比して死亡数が少ないがんであり、適切な治療により予後の延長が期待できる癌種である。その背景として、ホルモン剤や分子標的薬を含む、化学療法の発展によるものが大きい。乳がんの治療方針はサブタイプにより決定される。中でもエストロゲン受容体、プロゲステロン受容体、human epidermal growth factor receptor (HER)が陰性であるトリプルネガティブ乳癌 (TNBC) は乳癌の約20%を占め、ホルモン受容体陽性乳癌に比較し、予後不良である。TNBC に対しては内分泌療法、抗HER2療法が使用できず、治療効果が期待できるのは殺細胞性抗癌剤のみであり、治療選択肢が少ないため生存期間が短い。唯一、完治が望める方法は外科的切除であるが、切除単独では再発率も高率であるため、再発率の低下や生存割合の向上を目指し、術後補助化学療法が開発され、その効果が認められている。しかしながら、TNBCにおいては前述の通り、術後補助化学療法においても、内分泌療法、抗HER2療法が使用できず、殺細胞性抗癌剤のみが使用されており、他のサブタイプと比較し、再発率も高率である。したがって、術後補助化学療法薬の感受性を高める薬剤の標的分子や術後補助化学療法の効果を予測するバイオマーカーの開発が切望される。

(2) Heat shock protein 72 と抗がん剤の感受性

Heat shock protein (Hsp70)のアイソフォームの1つであるHsp72は新生蛋白質や変性蛋白質に対しシャペロン機能を有し、細胞保護の働きを示す。またアポトーシスを様々なシグナル伝達ポイントで抑制することが知られている[Garrido et al. Cell Cycle, 2006]。癌細胞は正常細胞と比較してHsp72が高発現していること、悪性度の高い低分化癌ではさらに高発現していることが報告されている[Calderwood SK et al. Trends Biochem Sci, 2006]。このような背景から、Hsp72は抗癌剤の感受性に寄与していると考えられ、Hsp72自体が抗がん剤の感受性を増感させる標的となる可能性が予測される。しかしながら、Hsp72は正常細胞においても発現し、細胞内恒常性の維持に貢献するため、その機能阻害は重大な有害反応を引き起こすと予想される。分子シャペロンであるHsp72と結合する蛋白質は、新生され、Hsp72によりフォールディングされている分子、変性しておりHsp72により修復(リフォールディング)されている分子、に大別される。そこで、抗癌剤耐性株でHsp72に結合している蛋白質こそ、抗癌剤耐性に重要な分子であると考えられる。実際、我々はオキサリプラチンに感受性を持たない、スキルス胃がん細胞株を用いて、Hsp72に結合している蛋白質を解析することで、オキサリプラチンの感受性を亢進する分子を同定した。[Takahashi K et al. Cancer Letters, 2016]。

(3) トリプルネガティブ乳癌の抗がん剤耐性

耐性を解除する新たな標的分子の同定を行うために乳癌のキー・ドラッグである5-fluorouracil (5-FU) に対して耐性を示すTNBC株を樹立し、定量的プロテオミクス解析を行った[Takahashi K et al. Int J Oncol, 2013]。その結果、178種の蛋白質が有意に発現変動していた。既知の耐性関与分子の発現亢進も認められたが、耐性を獲得することで多くの蛋白質が変化したことから、耐性を解除する標的分子の特定は困難であった。そこで、樹立したTNBC 5-FU耐性株を用いて、真に重要な蛋白質の抽出ができれば、5-FU耐性を解除する標的分子の同定が可能であると考え、Hsp72結合分子解析を行い、5-FUの感受性や5-FU耐性細胞株の増殖に重要な分子を複数同定した。

2. 研究の目的

以上の背景より、本研究はTNBC細胞株MDA-MB-231および5-FU耐性MDA-MB-231株(MDA-MB-231/5-FU)を用いて同定した候補分子が抗癌剤の感受性を亢進させる(耐性を解除する)薬剤開発の標的分子、または、5-FU感受性予測バイオマーカーとして使用可能であるか検証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) TNBC細胞株を用いた抗癌剤耐性分子の探索

抗癌剤耐性株の抗癌剤による細胞死の回避関連分子同定を目的とし、これまでに樹立した5-FU耐性TNBC株(MDA-MB-231/5-FU)およびその親株(MDA-MB-231)のHsp72結合分子を同定した。

具体的な方法はMDA-MB-231株およびMDA-MB-231/5-FU株の細胞抽出液に含まれるHsp72複合体の精製には申請者がこれまでに作製した抗Hsp72モノクローナル抗体を共有結合させたNHS-activated Sepharose [Tanaka M, Takahashi K et al. *J Proteomics*, 2016]を使用した。精製したサンプルに含まれる全蛋白質を質量分析計にてショットガン分析法を用いて同定した。

(2) MDA-MB-231 および MDA-MB-231/5-FU の Hsp72 結合分子の比較

両株の Hsp72 結合分子を比較し、いずれかのみで同定された蛋白質を耐性解除の標的分子候補とした。

(3) 耐性解除薬標的分子としての検討

MDA-MB-231/5-FU 株に siRNA を用いて候補分子の発現抑制を行い、5-FU に対する感受性により評価した。また、堅牢性を向上させるため、以降の検討には既に樹立済みの TNBC 5-FU 耐性株 (BT549/5-FU) を併せて用いた。

4. 研究成果

(1) TNBC 細胞株を用いた抗癌剤耐性分子の探索

MDA-MB-231 株および MDA-MB-231/5-FU 株の細胞抽出液中の Hsp72 複合体を精製し、ゲルシヨットガン法にて全蛋白質を LC-MS にて測定した。その後、Mascot にてデータベースと照合し、95%以上の confidence をカットオフ値とし、Hsp72 結合蛋白質を同定した。その結果、MDA-MB-231 で 256 種、MDA-MB-231/5-FU で 184 種の蛋白質が同定され、そのうち 34 種類が MDA-MB-231/5-FU のみで同定された。

(2) 耐性解除薬標的分子としての検討

(1) で同定されたタンパク質の中より 5 種類 (A、B、C、D、E) に着目し、それぞれの siRNA を MDA-MB-231/5-FU 株に導入することで発現抑制を行い、5-FU に対する感受性を検討した。その結果、A、B、C、D の 4 種の蛋白質の発現抑制により、5-FU の感受性が亢進することが明らかとなった (図 1)。

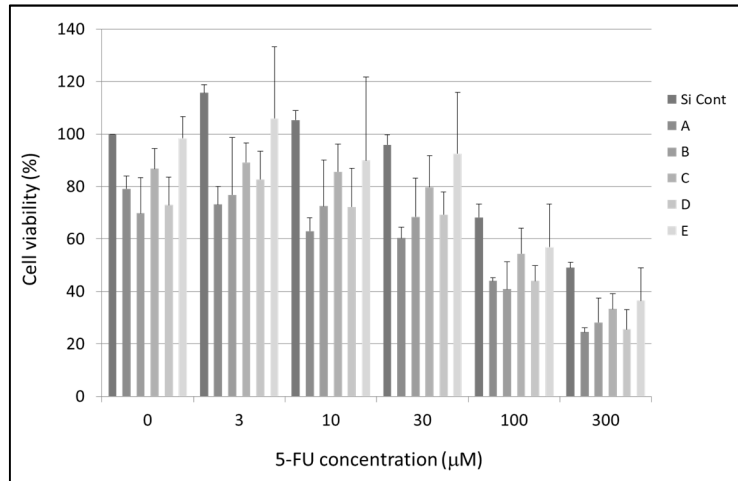


図 1 MDA-MB-231/5-FU 株に対する標的分子阻害による 5-FU 感受性の変化

また、堅牢性を向上させるため、異なる TNBC 5-FU 耐性株である BT549/5-FU 株に対しても同様に、5 つの分子の発現抑制を行い、5-FU に対する感受性を検討した。その結果、B の発現抑制のみで、5-FU の感受性が亢進することが明らかとなった (図 2)。

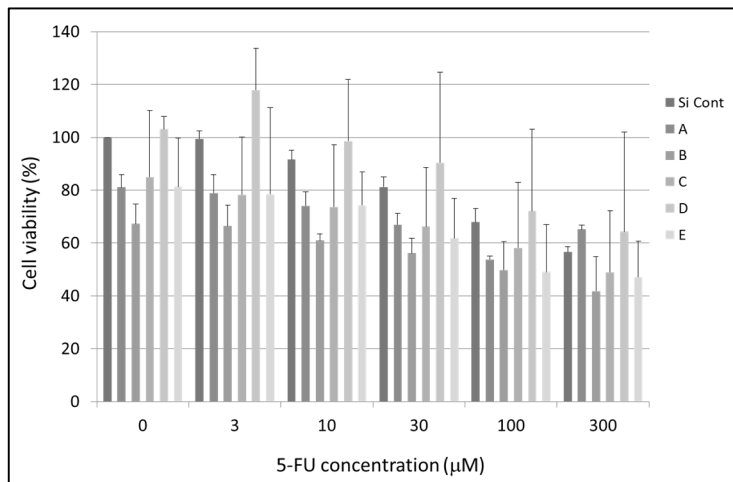


図 2 BT549/5-FU 株に対する標的分子阻害による 5-FU 感受性の変化

以上の結果から、Hsp72 結合蛋白質 B は複数の 5-FU 耐性 TNBC 株の感受性に関わる分子であり、薬剤の標的となりうる可能性があると考えられた。しかしながら、TNBC 株において、異なる結果となったため、さらに B の発現抑制を異なる種類の siRNA を用いて妥当性の検証を行った。その結果、MDA-MB-231/5-FU 株および BT549/5-FU 株のいずれにおいても 5-FU の感受性の亢進は見られなかった(図 3、4)。

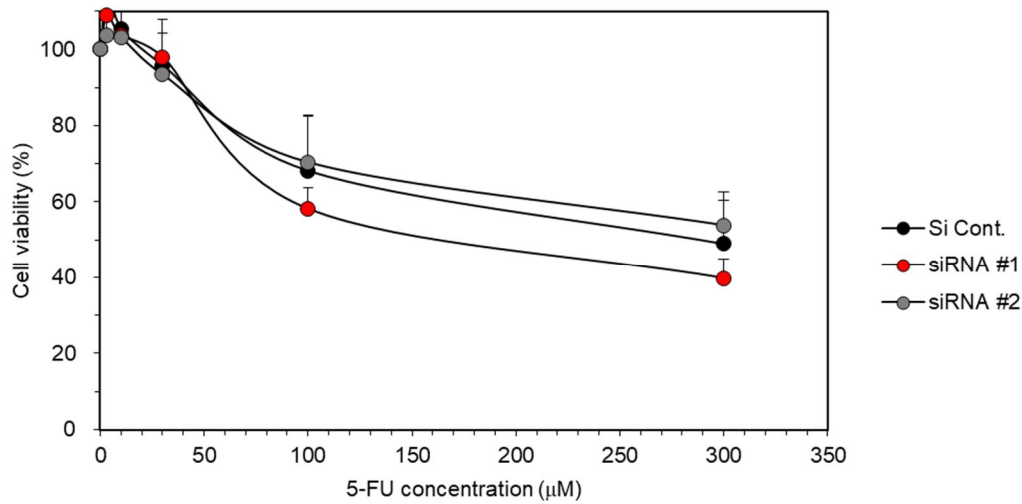


図 3 MDA-MB231/5-FU 株に対する標的分子阻害による 5-FU の用量反応曲線

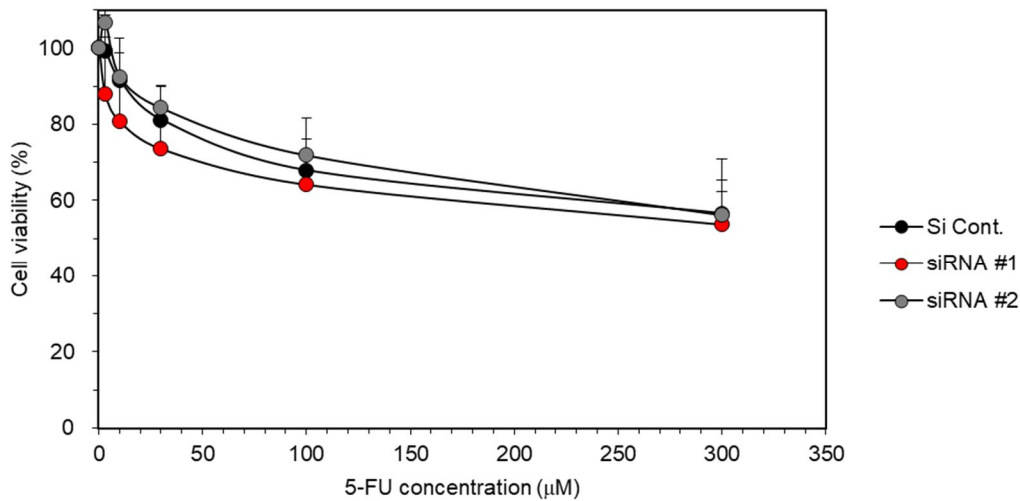


図 4 BT549/5-FU 株に対する標的分子阻害による 5-FU の用量反応曲線

以上の結果から、今回候補となった Hsp72 結合蛋白質は 5-FU 感受性に影響する一貫した結果が得られず、現時点では候補分子としてのエビデンスは乏しいと考えられる。オキサリプラチン耐性のスキルス胃がん細胞では Hsp72 過剰発現しているが、今回、標的分子の探索に用いた MDA-MB-231/5-FU 株では Hsp72 ではなく、その他の Hsp ファミリーの過剰発現が確認されている(表 1) [Takahashi K et al. Int J Oncol, 2013]。以上のことから、Hsp72 結合解析での標的分子のスクリーニングが困難であったことが考えられる。今後は BT-549/5-FU 株を含む、TNBC 細胞株における Hsp72 の発現比較を実施し、発現亢進がみられる細胞株での再解析が必要であると考えられる。

Accession no.	Protein name	Ratio	p value
gi 9257257	WD repeat-containing protein 1 isoform 1	2.333	0.007
gi 156523970	alpha-2-HS-glycoprotein preproprotein	2.216	0.000
gi 4506145	trypsin-1 preproprotein	2.193	0.000
gi 62414289	vimentin	2.014	0.000
gi 5803013	endoplasmic reticulum resident protein 29 isoform 1 precursor	1.905	0.037
gi 5031635	cofilin-1	1.821	0.000
gi 4507879	voltage-dependent anion-selective channel protein 1	1.781	0.013
gi 50053795	eukaryotic translation initiation factor 4B	1.679	0.002
gi 167614506	plastin-2	1.669	0.028
gi 4758516	hepatoma-derived growth factor isoform a	1.663	0.015
gi 4758756	nucleosome assembly protein 1-like 1	1.575	0.000
gi 4503481	elongation factor 1-gamma	1.560	0.000
gi 23110935	proteasome subunit alpha type-1 isoform 1	1.493	0.024
gi 19743823	integrin beta-1 isoform 1A precursor	1.488	0.001
gi 4506671	60S acidic ribosomal protein P2	1.479	0.000
gi 5032057	protein S100-A11	1.479	0.005
gi 4757768	rho GDP-dissociation inhibitor 1 isoform a	1.454	0.003
gi 5901912	calmodulin	1.448	0.001
gi 386642862	threonine--tRNA ligase, cytoplasmic isoform 2	1.444	0.010
gi 4758484	glutathione S-transferase omega-1 isoform 1	1.441	0.023
gi 4504251	histone H2A type 2-A	1.429	0.021
gi 6031192	phosphate carrier protein, mitochondrial isoform a precursor	1.427	0.024
gi 10863927	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	1.414	0.001
gi 73486658	aspartate aminotransferase, mitochondrial precursor	1.396	0.019
gi 385298707	hippocalcin-like protein 1	1.370	0.005
gi 50592994	thioredoxin isoform 1	1.356	0.045
gi 4503471	elongation factor 1-alpha 1	1.305	0.002
gi 24307939	T-complex protein 1 subunit epsilon	1.297	0.003
gi 4758950	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B precursor	1.289	0.009
gi 38327039	heat shock 70 kDa protein 4	1.286	0.003
gi 42544159	heat shock protein 105 kDa	1.258	0.008
gi 98986464	transmembrane emp24 domain-containing protein 10 precursor	1.242	0.002
gi 4758012	clathrin heavy chain 1	1.221	0.011
gi 5453603	T-complex protein 1 subunit beta isoform 1	1.215	0.022
gi 4506663	60S ribosomal protein L8	1.206	0.041
gi 5901922	hsp90 co-chaperone Cdc37	1.204	0.045

表 1 MDA-MB-231/5-FU細胞で過剰発現が見られた蛋白質

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------