

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592405

研究課題名(和文) 磁性ナノビーズを用いた前立腺癌におけるタキサン系抗癌剤耐性獲得機序の解明

研究課題名(英文) Identification of taxane-binding protein by utilizing magnetic beads to clarify the molecular mechanism how to develop taxane-resistance in prostate cancer

研究代表者

高羽 夏樹 (TAKAHA, Natuski)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・客員講師

研究者番号：80294081

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：前立腺癌細胞株DU145の親株(ドセタキセル感受性株)とそのドセタキセル耐性株より、磁性ナノビーズを用いて耐性株で発現増強しているドセタキセル結合タンパクとしてtubulin、coatomer protein complex subunit alpha、basonuclin-1を精製・同定した。これらの相対的RNA発現量(耐性株/感受性株)は順に、約70%、約100%、約20%であった。ドセタキセルの標的であるtubulinが同定されたことより、ドセタキセル結合タンパク精製法として適切であったが、RNAとタンパクの発現量が相反する結果であったため、耐性獲得に関する役割について判断できなかった。

研究成果の概要(英文)：We identified tubulin, coatomer protein complex subunit alpha, and basonuclin-1 as docetaxel-binding protein overexpressed in docetaxel-resistant subcell line established from prostate cancer cell line DU145 by utilizing magnetic beads. The relative RNA expression level (docetaxel resistant/sensitive) of those molecules was about 70%, 100%, and 20%, respectively. As tubulin, which is a target molecule for docetaxel was identified, the applied method should be appropriate as purifying docetaxel-binding protein. However, the expression profile of RNA and that of protein did not coincide, which made it difficult to judge the role of the identified docetaxel-binding protein in the development of docetaxel-resistance.

研究分野：泌尿器腫瘍学

キーワード：前立腺癌 抗癌剤耐性 タキサン ナノビーズ ケミカルバイオロジー

1. 研究開始当初の背景

ビカルタミドを中心とした内分泌治療を導入した後、それが無効となった去勢抵抗性前立腺癌 (CRPC) の現行の標準治療としてタキサン系抗癌剤のドセタキセルが使用されている。ドセタキセル抵抗性となった前立腺癌に対して有効な治療法はなかったが、近年、同じくタキサン系抗癌剤であるカバジタキセルがこの様な前立腺癌に有効であることが示された。

カバジタキセル、ドセタキセルともにタキサン系抗癌剤であり、作用機序のひとつは微小管機能障害による G2-M 期の停止である。両薬剤には類似点が多いにもかかわらず、上記のごとく治療効果に違いがあることより、これらの薬剤の分子機構を解析・比較し、それらの結果に基づいた治療戦略 (症例選択や両薬剤使用順序の適正化) を構築したり、新たな治療方法を開発したりすることが去勢抵抗性前立腺癌の治療成績を向上させるためには重要である。

本研究では、まず前立腺癌におけるドセタキセル、カバジタキセルに関する薬剤抵抗性獲得に関与する分子の同定を薬剤感受性の細胞株と薬剤抵抗性の細胞株の比較により行うことを目標とする。このような目的で従来行われてきた代表的な方法として、cDNA マイクロアレイと二次元電気泳動を用いたプロテオミクスがある。両者とも網羅的に遺伝子変化を検出できるが、薬剤抵抗性獲得の結果生じた二次的または三次的な遺伝子変化を検出する可能性が高い。そこで、注目したのがナノ磁性ビーズを用いたケミカルバイオロジーの手法である。この方法では、薬剤に結合するタンパクを特異的に精製するため、高い確率で薬剤感受性に関わる分子を同定できると考えられる。実際この方法により、薬剤や毒性蛋白が直接結合する蛋白を探索し、その結合蛋白から種々の薬剤、毒性蛋白の作用機序が明らかにされている (Nat. Biotechnol. 2000)。一方で、ドセタキセルやカバジタキセルなどの OH 基を有する薬剤をナノ磁性ビーズに固定することは困難であるとされてきた。我々は、固定方法を改良することにより、OH 基を有する抗アンドロゲン剤であるビカルタミドの結合タンパクを精製できることを明らかにした。また、この方法で前立腺癌細胞のビカルタミド感受性株と耐性株の間で発現量の異なる結合タンパクがあることも見出している。

以上の背景より、ナノ磁性ビーズを用いたケミカルバイオロジーの手法を用いて、OH 基を有するドセタキセルおよびカバジタキセルの結合タンパクの同定を行い、最終的にはそれぞれの感受性調節タンパクを選定し、両薬剤の感受性調節機序および抵抗性獲得機序を解明することを着想した。

2. 研究の目的

ナノ磁性ビーズを用いたケミカルバイオロジーの手法を用いて、ドセタキセルおよび

カバジタキセル抵抗性獲得の分子生物学的作用機序を解明することにより、CRPC の治療方法のアルゴリズムの決定および治療成績向上に貢献することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

我々はこれまでに、high mobility group protein AT-hook 1 (HMGA1) が前立腺癌の進展およびアンドロゲン非感受性獲得に関与することを報告してきた (Prostate 2004, Prostate 2012) が、他の癌では抗癌剤抵抗性獲得に関与することが報告されている。また、ATP-binding Cassette Sub-family B Member 1 (ABCB1、別称 Multiple drug resistance 1;MDR1) は、抗癌剤を細胞外に排出することで種々の癌細胞において抗癌剤の感受性を低下させることが知られている。以上のことより、これらが前立腺癌におけるドセタキセル抵抗性獲得に関与していることが予測されるため、本研究ではナノビーズを用いて同定される分子に加えて、HMGA1 および ABCB1 についても前立腺癌細胞におけるドセタキセル抵抗性獲得に関与しているか検討することとした。

(1) アンドロゲン感受性前立腺癌細胞株 LNCaP に発現ベクターを導入し HMGA1 を強制発現した細胞株 (LN-H1) とコントロールベクターを導入した細胞株 (LN-EV) におけるドセタキセル感受性と ABCB1 の発現を比較検討する。

(2) 他施設より譲渡された、アンドロゲン非感受性前立腺癌細胞株 DU145 の親株 (ドセタキセル感受性株) と、DU145 をドセタキセル存在下に継続培養することにより樹立した 2 個の DU145 ドセタキセル耐性株 (DRD, DRD-1G7) のドセタキセル感受性を評価する。

(3) DU145 親株 (ドセタキセル感受性株) と DU145 ドセタキセル耐性株 (DRD, DRD-1G7) における HMGA1 と ABCB1 の発現を比較検討する。

(4) DU145、DRD、DRD-1G7 から抽出したタンパク試料からナノ磁性ビーズを用いてドセタキセル結合タンパクを精製する方法の至適条件を検討する。

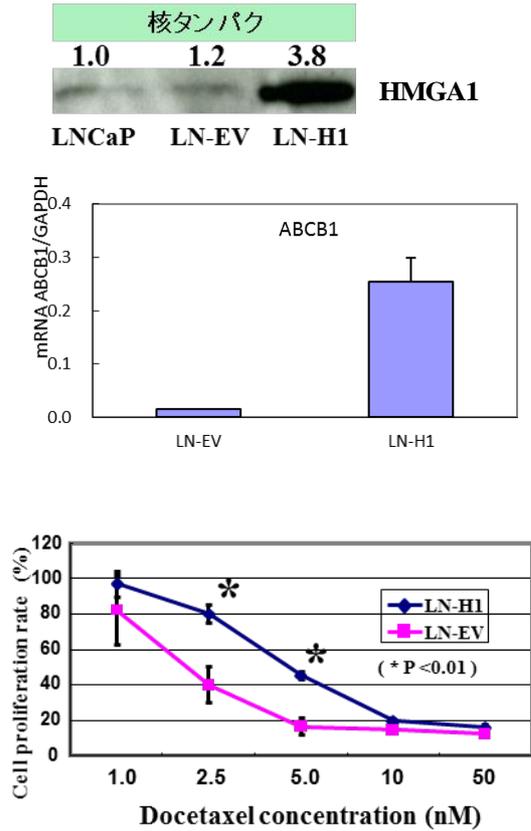
(5) DU145 ドセタキセル耐性株に発現するドセタキセル結合タンパクを選定し、質量分析計により同定する。

(6) 同定されたドセタキセル結合タンパクの DU145、DRD、DRD-1G7 における RNA 発現量を検討する。

4. 研究成果

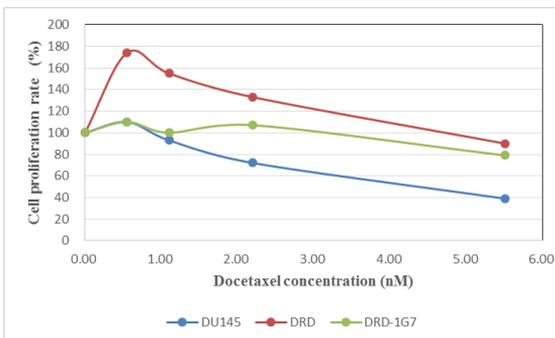
(1) HMGA1 がドセタキセル感受性および ABCB1 の発現にどのような影響を及ぼすかについて、アンドロゲン感受性前立腺癌細胞株 LNCaP に HMGA1 を強制発現させた株 (LN-H1) とコントロールベクターを導入した細胞株 (LN-EV) を用いて検討した。LN-H1 における HMGA1 タンパクの発現量は

LN-EV の約 3 倍になっていた。定量 RT-PCR で ABCB1 の RNA 発現量を測定したところ、LN-H1 における ABCB1 発現量は LN-EV の 17 倍となっていた。WST アッセイで細胞増殖率を測定したところ、HMGA1 の過剰発現により、LN-H1 のドセタキセル感受性は LN-EV に比べ有意に低下していた。



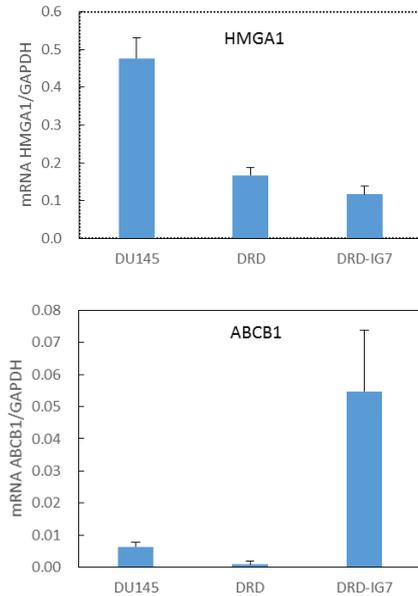
以上より、LNCaP においては HMGA1 の発現は ABCB1 の増加を伴いドセタキセル抵抗性獲得に関与していることが示唆された。

(2) 他施設より譲渡された、アンドロゲン非感受性前立腺癌細胞株 DU145 の親株 (ドセタキセル感受性株) と 2 個の DU145 ドセタキセル耐性株 (DRD, DRD-1G7) のドセタキセル感受性を WST アッセイで評価したところ、DRD, DRD-1G7 はともにドセタキセル抵抗性を維持していることが確認できた。



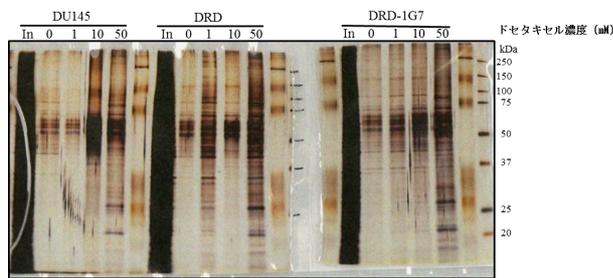
(3) DU145 親株 (ドセタキセル感受性株) と DU145 ドセタキセル耐性株 (DRD,

DRD-1G7) における HMGA1 と ABCB1 の mRNA 発現を RT-PCR で測定したところ、HMGA1 の発現は両方の耐性株で低下していた。LNCaP に HMGA1 を強制発現させた場合に見られた HMGA1 発現量とドセタキセル感受性との間の相関とは逆の相関関係となっていた。一方、ABCB1 の発現は DU145 親株に比べ、DRD では著明に低下し、DRD-1G7 では増強しており、同じ耐性株の中でも一定の傾向はなかった。

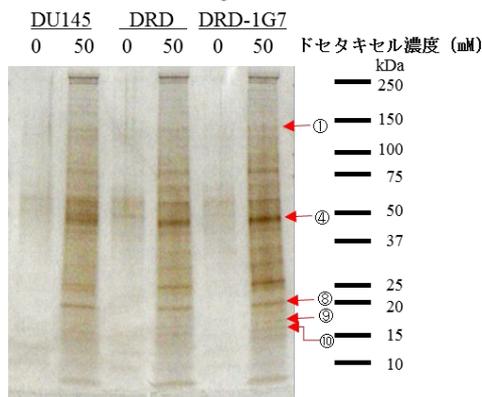


以上より、DU145 のドセタキセル耐性獲得には HMGA1、ABCB1 以外の分子が強く関与していることが示唆された。これらの候補分子を同定するため、DU145、DRD、DRD-1G7 よりナノ磁性ビーズを用いてドセタキセル結合タンパクを精製することとした。

(4) ナノ磁性ビーズを用いてドセタキセル結合タンパクを精製する方法の至適条件を検討した。DU145、DRD、DRD-1G7 から抽出したタンパク試料 (whole cell lysate) とドセタキセルを表面に固定したナノ磁性ビーズを反応させた後、ドセタキセル結合タンパクを精製・回収し、ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動で分離し、銀染色で検出した。異なる濃度のドセタキセルでナノビーズに固定したところ、50mM のドセタキセルでは、0mM では見られないバンドが銀染色で検出された。以降の実験では、50mM のドセタキセルをナノビーズに固定することとした。12% ポリアクリルアミドゲルを用いたが、ケラチンの混入によると思われるバンドの乱れが見られ、高分子量のタンパクの分離・視認が不良であった。これらを改善する目的で市販の 4-20% ポリアクリルアミドゲルを用いたところ、バンドの乱れは消失し、高分子量、低分子量のタンパクとも良好に分離され、銀染色でも視認できるようになった。



12% ポリアクリルアミドゲル (In: Input)

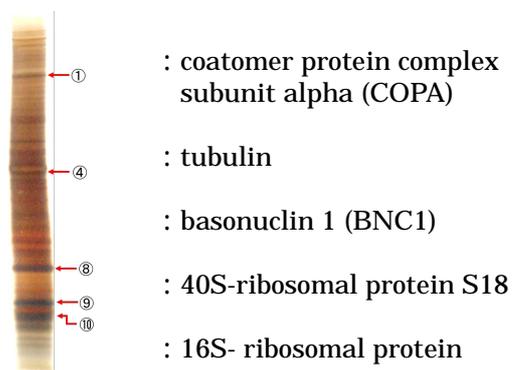


4-20% ポリアクリルアミドゲル

ドセタキセル抵抗性獲得に関連するタンパクの候補として、DU145 に比べ DRD、DRD-1G7 において発現が増強していると思われるバンドを選定した。

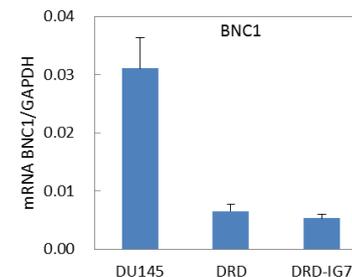
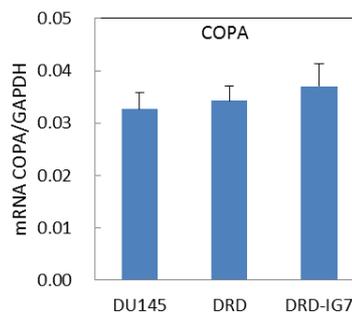
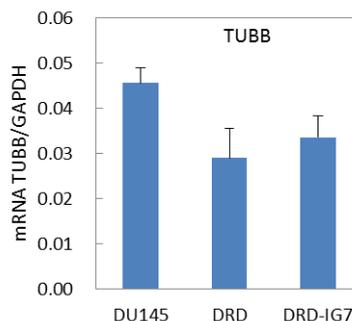
(5) 上記に選定したバンドのタンパクを質量分析で同定するため、約 10 倍の濃度のドセタキセル結合タンパクを精製・調整した後、上記と同様に 4-20% ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動で分離した。銀染色を行った後、それぞれのバンドを切り出し、質量分析 (MALDI-TOF) に提出した。

質量分析の結果、5 個の候補分子は下記の通り同定された。



(6) 本研究ではドセタキセル耐性獲得に関連する新規の non-ubiquitous protein の同定を目的とするため、上記に同定したタンパクのうち Golgi 体・小胞体の機能や核膜分解に関わるタンパクである COPA と zinc finger

protein である BNC1 についてさらに検討を行うこととした。定量 PCR により、DU145 の親株 (ドセタキセル感受性株) とドセタキセル耐性株 (DRD、DRD-1G7) における RNA 発現量を比較した。各分子の相対的 RNA 発現量 (耐性株/感受性株) は以下の通りであった: tubulin 約 70% COPA 約 100% BNC1 約 20%。RNA 発現量の結果から、ドセタキセル耐性獲得に関与する可能性が考えられるのは BNC1 であるが、ドセタキセル結合タンパクとして精製した過程では本タンパクは耐性株でむしろ発現増強していると考えられた。以上の結果より、BNC1 の発現が直接ドセタキセル耐性獲得に関与しているかについての評価は現時点では困難と判断した。



今後、DU145 を用いて BNC1 の knock-down を行い、ドセタキセル感受性が低下するかを検討する予定である。また、詳細な immunoblot により、DU145、DRD、DRD-1G7 における BNC1 タンパクの発現量やタンパクの翻訳後修飾の状態を確かめ、ドセタキセル結合能やドセタキセル感受性への影響につき検討を行う予定である。

今回、行った実験方法では、ドセタキセルの直接の標的分子である tubulin が精製・同定できたことより、ドセタキセル結合タンパク精製の方法としては適切で有用であると考えられた。

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
下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計3件)

前立腺癌細胞のアンドロゲン非依存性増殖およびドセタキセル抵抗性獲得における high mobility group protein AT-hook 1(HMGA1)の役割. 高羽 夏樹、曾和 義広、竹内 一郎、上田 崇、木村 泰典、岩田 健、中村 晃和、本郷 文弥、三神 一哉、鴨井 和実、沖原 宏治、河内 明宏、三木 恒治. 第100回日本泌尿器科学会総会. 2012年4月22日. 横浜
前立腺癌細胞におけるアンドロゲン非依存性細胞生存とドセタキセル抵抗性に関する HMGA1 の関連. 高羽 夏樹、曾和 義広、竹内 一郎、上田 崇、木村 泰典、岩田 健、中村 晃和、本郷 文弥、鴨井 和実、沖原 宏治、河内 明宏、三木 恒治. 第71回日本癌学会学術総会. 2012年9月20日. 札幌.
HIGH MOBILITY GROUP PROTEIN AT-HOOK 1 (HMGA1) IS ASSOCIATED WITH THE DEVELOPMENT OF ANDROGEN INDEPENDENCE AND DOCETAXEL-RESISTANCE IN PROSTATE CANCER CELLS. Natsuki Takaha, Yoshihiro Sowa, Ichiro Takeuchi, Takashi Ueda, Saya Ito-Ueda, Yasunori Kimura, Tsuyoshi Iwata, Terukazu Nakamura, Fumiya Hongo, Kazumi Kamoi, Koji Okihara, Akihiro Kawauchi, Tsuneharu Miki. 108th American Urological Association Annual Meeting. 2013/5/5. San Diego, USA.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

高羽 夏樹 (TAKAHA, Natsuki)
京都府立医科大学・医学研究科・客員講師
研究者番号：80294081

(2)研究分担者

三木 恒治 (MIKI, Tsuneharu)
京都府立医科大学・医学研究科・教授
研究者番号：10243239

河内 明宏 (KAWAUCHI, Akihiro)
滋賀医科大学・医学部・教授
研究者番号：90240952

鴨井 和実 (KAMOI, Kazumi)
京都府立医科大学・医学研究科・講師
研究者番号：40295663

沖原 宏治 (OKIHARA, Koji)
京都府立医科大学・医学研究科・准教授
研究者番号：80285270

木村 泰典 (KIMURA, Yasunori)
京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号：平成25年6月退職により資格喪失

上田 崇 (UEDA, Takashi)
京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号：50601598

岩田 健 (IWATA, Tsuyoshi)
京都府立医科大学・医学研究科・客員講師
研究者番号：00552209

大石 正勝 (OISHI, Masakatsu)
京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号：90405316

上田 紗弥 (伊藤 紗弥)(UEDA, Saya
(Ito, Saya))
京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号：90534511

(3)連携研究者
該当なし