

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23510267

研究課題名(和文) プロテオーム解析で見出した抗癌剤耐性関連蛋白質の構造機能相関の解明とその応用

研究課題名(英文) Studies on the molecular mechanism of 5-fluorouracil response proteins using a proteomic approach

研究代表者

境 晶子 (Sakai, Akiko)

大阪医科大学・医学部・講師

研究者番号：30225750

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)：5-Fluorouracil (5-FU) 耐性株において発現が亢進していたHSPB1のオリゴマー構造とリン酸化の解析を行った。耐性株において感受性株とは異なる分子量のオリゴマー構造をとること、それぞれの分子量のオリゴマーでリン酸化状態やオリゴマーの解離しやすさが異なっていることを見出した。さらに、共免疫沈降法を用いてHSPB1と相互作用するタンパク質としてCytokeratin 8, 18, 19を同定した。

研究成果の概要(英文)：The heat-shock protein (HSP) B1 expression increased with the acquisition of 5-fluorouracil resistance. We analyzed the phosphorylation and oligomeric structure of HSPB1 by one- and two-dimensional western blotting via isoelectric focusing and blue native polyacrylamide gel electrophoresis. The oligomeric structures of HSPB1 in resistant cells differed in molecular mass from those in sensitive cells, suggesting that drug resistance alters the phosphorylation and dissociability of HSPB1 oligomers. Further, cytokeratin 8, 18, 19 were identified the proteins that interact with HSPB1 by co-immunoprecipitation.

研究分野：生物学

キーワード：抗癌剤耐性 プロテオミクス HSPB1 オリゴマー化 サイトケラチン

1. 研究開始当初の背景

多くの癌の治療法として抗癌剤による化学療法が重要であるが、抗癌剤に対する感受性の低下(耐性獲得)が治療上の問題となる。5-Fluorouracil (5-FU)は大腸癌・乳癌など多くの癌で用いられる抗癌剤であるが、長期・反復投薬によって耐性を獲得する。耐性獲得の機序として5-FUが阻害する核酸代謝酵素の発現亢進が報告されているが、それが観察されない耐性も存在する。代表者境は、耐性獲得機序の解明と耐性マーカーの同定を目的としてプロテオーム解析を行ってきた。耐性獲得のモデルとして用いたヒト大腸癌由来の培養細胞DLD-1は5-FUによって細胞死を起こすが、耐性を獲得した細胞株も得られている。この5-FU感受性株と耐性株で発現するタンパク質を、改良型等電点電気泳動(IPG)法を用いた二次元電気泳動で解析した結果、耐性獲得によって発現量が変化したスポットを検出し、質量分析でタンパク質を同定した。その内訳は、アポトーシス関連タンパク質、代謝系酵素、細胞骨格タンパク質、ストレス応答タンパク質などであった。興味深いことに、耐性株ではアポトーシスに参与する複数のタンパク質が全体としてアポトーシスが減弱する方向に発現変動していた。また耐性株では5-FUによるアポトーシスが起こりにくいことを確認した。よって、耐性株では5-FUで引き起こされるアポトーシスが起こりにくくなっており、これが耐性獲得の一因であると推測した。

耐性獲得で発現が変動したタンパク質の中で、特に興味深い二つのタンパク質に注目した。一つはストレス応答タンパク質HSPB1(HSP27)で、耐性株におけるHSPB1の発現をsiRNA法で抑制すると5-FU感受性が増加したことより、この分子が抗癌剤感受性に参与していることを確認した。近年、リン酸化型HSPB1がアポトーシスの複数の経路で抑制的に関与していることが分かってきた。一方、細胞内では細胞質と核に存在すること、27 kDaの単量体から500 kDa以上の巨大オリゴマーまで様々な分子量のオリゴマー状態で存在すること、そしてこのオリゴマー化の調節は種々のリン酸化酵素によるHSPB1上の複数のリン酸化部位が関与することが報告されているが、その詳細は不明である。二つめは細胞骨格タンパク質のCytokeratin(CK)8である。本来の分子量53 kDaに加え50と40 kDaの分子が検出され、細胞内で限定分解を受けたCK8も安定に存在していることが示された。

2. 研究の目的

抗癌剤5-FUに対する耐性を獲得した細胞株のプロテオーム解析によって、耐性獲得と関連するタンパク質としてストレス応答タ

ンパク質HSPB1と細胞骨格タンパク質のCK8を同定した。本研究の目的は、これらタンパク質が耐性獲得においてどのような役割をしているかを、翻訳後修飾・オリゴマー化・タンパク質相互作用を解析することで明らかにする。さらに耐性マーカーとしての有用性を確認することである。

具体的には、以下の通りである。

(1) HSPB1とCK8の構造機能相関

耐性獲得におけるHSPB1のオリゴマー構造と機能の関係を、翻訳後修飾に注目し明らかにする。耐性獲得に関わるHSPB1のリン酸化部位は既に質量分析によって同定している。本研究では5-FU感受性株と耐性株を用いて、HSPB1のオリゴマー化の状態を解析し、リン酸化など翻訳後修飾との関連を調べる。さらに、耐性を獲得した細胞内で、HSPB1と相互作用しているタンパク質を明らかにする。また、CK8がどのような翻訳後修飾により数段階の限定分解を受け耐性獲得に関与するかを、翻訳後修飾に注目し明らかにする。

(2) Paclitaxel (PTX) 耐性プロテオミクス

作用機序が異なる抗癌剤Paclitaxel (PTX) (微小管形成を阻害)耐性株でのプロテオーム解析を完成させる。抗癌剤の作用機序の違いがHSPB1の構造機能相関にどう影響するのかを比較検討する。

(3) 耐性獲得マーカーとしての有用性の確認

応用として抗癌剤耐性獲得のマーカーと成りうるかを患者血清を用いて確認する。抗癌剤耐性マーカーによる診断法が確立し血清での診断が可能となれば抗癌剤の有効性の予知が可能となり、耐性を示した時点で他の抗癌剤に切り替えが可能となるという治療上有利な情報を与える。5-FUを第一選択薬として用いる大腸癌・乳癌の患者血清を用いて、血清中に含まれるHSPB1やCK8などの候補タンパク質をELISA法で定量する。病的な状態により発現が増えたタンパク質は、細胞外に放出され血清中に安定に存在することが多く報告されている。CK8限定分解物及びHSPB1は耐性獲得の血清マーカーとなり得る可能性があると考えた。

3. 研究の方法

(1) 改良型IPG法

現在汎用されるIPG法は、翻訳後修飾以外の人為的な理由で偽陽性スポットがでること、再現性の低さ、添加できる蛋白量が少ない(通常ミニゲルで50 µg)ため定量性の悪い銀染色が必要など様々な問題点がある。代表者境は試料の調整法・添加方法及び泳動条件を検討し、上記問題点を解決し10倍以上のタンパク質を泳動できる改良型IPG法を用

い、二次元目に SDS-PAGE を行う二次元電気泳動法で解析を行っている。これによりリン酸化などの翻訳後修飾も再現性よくとらえることができる。

(2) PTX 耐性株のプロテオーム解析

PTX 耐性株と感受性株から総タンパク質を抽出し、改良型 IPG 法を用いた二次元電気泳動を行った。ゲルを CBB 染色した後 Prodigy でスポットの発現量を比較解析し、発現が変動したスポットについて、MALDI-TOF による質量分析でタンパク質を同定した。また、siRNA 法によるノックダウン実験を行い、PTX 感受性に及ぼす影響をみた。

(3) 細胞内 HSPB1 のオリゴマー構造の解析

細胞内での native な状態を維持するマイルドな条件で両株のタンパク質を抽出し、Blue Native PAGE を用いてオリゴマー化複体を分画した。PVDF 膜に転写したのち種々の抗リン酸化 HSPB1 抗体で Western blot を行うことで、細胞内でのオリゴマー状態を解析した。さらに、Blue Native-PAGE を行ったゲルを SDS など可溶化処理し、二次元目に SDS-PAGE を行い Western blot を行うことで、各オリゴマーの解離しやすさを観察した。

(4) CK8 の翻訳後修飾と限定分解の解析

CK8 の各スポットがどのような翻訳後修飾を受けているのかを、改良型 IPG 二次元電気泳動を行ったゲルについて、ProQ 染色でリン酸化を、抗 GlcNAc 化抗体の Western blot で O-GlcNAc 化を検出した。

(5) HSPB1 と相互作用するタンパク質の同定

細胞抽出液から抗 HSPB1 抗体を用いて共免疫沈降し、HSPB1 に結合している分子を SDS-PAGE で分離し質量分析で同定した。

(6) 耐性獲得マーカーとしての有用性の確認

本学倫理委員会の承諾を得た上で、5-FU 及び PTX 系抗癌剤がよく用いられる乳癌患者の血清を集めた。血清中に含まれる HSPB1 と CK18 の量を ELISA 法によって測定し、その結果と実際の化学療法の治療効果を比較検討した。ELISA 法は、特異性の高い抗原・抗体反応を利用しているので血清のような夾雑物を多く含む試料中に含まれる特定の物質を特異的に感度良く検出できる。

4. 研究成果

(1) PTX 耐性のプロテオミクス

5-FU とは異なる作用機序をもつ抗癌剤である PTX の耐性株プロテオーム解析を行った。PTX 感受性株と耐性株を比較すると 23 個のタンパク質の発現が変動しており、その内訳はストレス応答タンパク質、代謝酵素、細胞骨格系タンパク質であった。5-FU 耐性で

発現が増加した HSPB1 は、PTX 感受性株での発現が 5-FU 耐性株よりも顕著に亢進しており、逆に PTX 耐性株では減少した。siRNA によるノックダウン実験でも耐性能に影響なかった。一方、別のストレス応答タンパク質である peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase A は耐性株での発現が顕著に増加しており、siRNA によって発現を減少させると PTX 感受性が回復したことより、耐性に関与していることが示唆された。面白いことに、発現が変動した細胞骨格系タンパク質に CK8 及び CK18 が同定された。CK8 は 5-FU 耐性株でも耐性獲得によって発現が変動したタンパク質である。また、これらの分子はアポトーシスと深く関連し、アポトーシスが起るとカスパーゼにより限定分解を受けることが分かっている。さらに、PTX のターゲットであるチューブリンに結合するタンパク質として報告されているタンパク質のうち 3 つが、本研究での PTX 耐性獲得によって発現増加したタンパク質として同定された。これは、PTX による細胞ストレスが直接的もしくは間接的に引き起こした影響かもしれない(論文投稿中)。

(2) HSPB1 の構造と抗癌剤耐性能の相関

HSPB1 は 5-FU 耐性獲得によってそのタンパク質量とリン酸化が顕著に増加した。耐性獲得細胞における HSPB1 のリン酸化部位は質量分析によって決定していたので、リン酸化部位認識抗体を用いた IPG 法の一次元及び二次元電気泳動後 Western blot を行った結果、Ser-15 と Ser-82 が major 型でさらに Ser-78 もリン酸化されたものが minor 型として検出できた。

次に耐性獲得とオリゴマー構造の関連を探るため、Blue Native-PAGE を用いて 5-FU 耐性株における HSPB1 のオリゴマー化とリン酸化の関連を解析したところ、150 kDa 以下の小さなオリゴマーと 500 kDa 以上の大きなオリゴマーとして存在しそれぞれのオリゴマーのリン酸化部位が異なっていること、150 kDa 以下のオリゴマーの発現が 5-FU 耐性株で増加していること、リン酸化部位の違いによってオリゴマーの解離しやすさが異なること、PTX 耐性株では 5-FU 耐性株の結果と異なることなどがわかり、HSPB1 のリン酸化とオリゴマー形成の関連性が示唆された。

(3) CK8 の限定分解と翻訳後修飾の関係

CK8 がリン酸化やそれと拮抗する GlcNAc 化などの翻訳後修飾を受け、段階的に限定分解を受けることがわかった。これは改良型等電点二次元電気泳動という手法を用いることで検出できた。さらに 5-FU 耐性株と同様に、PTX 耐性株でも全長 CK8 に加えて限定分解を受けた CK8 も同様に検出され、その発現が変動していた。

(4) HSPB1 と相互作用するタンパク質の同定

オリゴマー構造をとる HSPB1 は他のタンパク質と会合していることが報告されている。細胞内で HSPB1 と相互作用するタンパク質を調べるために、5-FU 耐性株と抗 HSPB1 抗体を用いた共免疫沈降実験を行った。共免疫沈降は、酸による溶出時に結合させた抗体が溶出されない Dynabeads の系を用いた。さらに溶出液 100 μ L を一度に添加できる濃縮用 SDS-PAGE を用いることで、溶出させたタンパク質を CBB 染色し同定することが可能となった。その結果、SDS-PAGE で 5 本のバンドを検出し In-gel 消化後 MALDI-TOF による質量分析の結果、一つは HSPB1、そして CK8、CK18、及び CK19 が同定された。CK8 と CK19 は 5-FU 耐性プロテオミクスで発現が変動したタンパク質、CK8 と CK18 は PTX 耐性プロテオミクスで発現が変動したタンパク質として同定した分子である。そして CK8 と CK18 はアポトーシスが起こればカスパーゼで限定分解を受けることがわかっているアポトーシス関連分子であることから、抗癌剤共通の耐性マーカーとして有用と考えられる。

(4) 耐性獲得マーカーとしての有用性の確認
抗癌剤治療を行った乳癌患者血清を用いて HSPB1 と CK18 の量を測定した。アポトーシスが起これば限定分解を受けた CK18 が増えるが、これが高値の群と正常群に近い値を示す群とに分かれ、PTX 耐性なしの患者血清は高値を示した。しかし、検体数が少なく明確な結果はでなかったため、検体数を増やし確認したいと考えている。

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)

〔雑誌論文〕(計 8 件)

Tanaka S, Iwamoto M, Kimura K, Matsunami N, Morishima H, Yoshidome K, Nomura T, Morimoto T, Yamamoto D, Tsubota Y, Kobayashi T, Uchiyama K. Phase II Study of neoadjuvant anthracycline-based regimens combined with nanoparticle albumin-bound paclitaxel and trastuzumab for human epidermal growth factor receptor 2-positive operable breast cancer. *Clin. Breast Cancer*. 15, 2015, 191-196
DOI: 10.1016/j.clbc.2014.12.003. 査読有

Edogawa S, Sakai A, Inoue T, Harada S, Takeuchi T, Umegaki E, Hayashi H, Higuchi K. Down-regulation of collagen I biosynthesis in intestinal epithelial cells exposed to indomethacin: a comparative proteome analysis. *J. Proteomics* 103, 2014, 35-46

DOI: 10.1016/j.jprot.2014.03.022. 査読有

Sakai A, Otani M, Miyamoto A, Yoshida H, Furuya E, Tanigawa N. Identification of phosphorylated serine-15 and -82 residues of HSPB1 in 5-fluorouracil-resistant colorectal cancer cells by proteomics. *J. Proteomics* 75, 2012, 806-818
DOI: 10.1016/j.jprot.2011.09.023. 査読有

Matsunaga F, Sakai A, Mochizuki S, Minami K, Inatsu S. Identification of DNA mismatch recognition proteins in the thermophilic bacterium *Geobacillus stearothermophilus*. *Bulletin of Toyo College of Food Technology* 1, 2012, 9-15
https://www.toshoku.ac.jp/outline/pdf/2012_kiyou.pdf 査読無

Otani M, Taniguchi T, Sakai A, Seta J, Kadoyama K, Nakamura-Hirota T, Matsuyama S, Sano K, Takano M. Phosphoproteome profiling using a fluorescent phosphosensor dye in two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 164, 2011, 804-818
DOI: 10.1007/s12010-011-9175-5 査読有

Tanaka S, Nohara T, Nakatani S, Iwamoto M, Sumiyoshi K, Kimura K, Takahashi Y, Sato N, Tanigawa N. Esthetic result of rhomboid flap repair after breast-conserving surgery for lower quadrant breast cancer lesion with skin invasion: report of two cases. *Surg. Today* 41, 2011, 832-836
DOI: 10.1007/s00595-010-4355-4 査読有

Fushitani H, Wada A, Tanaka S, Kimura K, Ogata A, Miyamoto A, Sakai A, Tanigawa N. Differential display of the basic protein in 5-fluorouracil resistance of human colon cancer cell line using the radical-free and highly reducing method of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis *Bull. Osaka Med. Coll.* 57, 2011, 39-48
<http://www.osaka-med.ac.jp/deps/b-omc/articles/bullarticles.htm> 査読無

Ogata A, Wada A, Ueta M, Fushitani S, Tanaka S, Kimura K, Sakai A, Yoshida H, Miyamoto A, Fujita Y, Tanigawa N. Proteomic analysis regarding resistance to anticancer drugs using a 5-fluorouracil-resistant human gastric cancer cell line and the radical-free and highly reducing method of two-dimensional electrophoresis *Bull. Osaka Med. Coll.* 57, 2011, 31-38
<http://www.osaka-med.ac.jp/deps/b-omc/arti>

〔学会発表〕(計5件)

境晶子, 林秀行, 抗癌剤耐性株における熱ショック蛋白質 HSPB1 の翻訳後修飾とオリゴマー構造. 第 37 回日本分子生物学会年会 2014 年 11 月 25-27 日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

藤岡大也, 寺沢理沙, 佐藤七夕子, 高橋優子, 木村光誠, 田中覚, 内山和久, 乳癌細胞株における抗癌剤耐性獲得の新規関連蛋白質の検索と機能解析. 第 22 回日本乳癌学会学術総会, 2014 年 7 月 10 日, 大阪国際会議場 (大阪府大阪市)

江戸川祥子, 境晶子, 井上拓也, 原田智, 竹内利寿, 梅垣英次, 林秀行, 樋口和秀, Comparative proteome analysis of indomethacin-treated intestinal cells reveals down-regulation of collagen I in NSAIDs-induced intestinal injury. 第 10 回日本消化管学会総会学術集会, 2014 年 2 月 14-15 日, 福島ビューホテル (福島県福島市)

藤岡大也, 田中覚, 高橋優子, 木村光誠, 岩本充彦, 乳癌細胞株における抗癌剤耐性獲得の新規関連蛋白質の検索. 第 20 回日本乳癌学会学術総会, 2012 年 6 月 28 日, 熊本市民会館 (熊本県熊本市)

境晶子, 抗癌剤 5-FU 耐性株における HSPB1 のリン酸化とオリゴマー構造. 第 34 回日本分子生物学会年会, 2011 年 12 月 13-16 日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

境 晶子 (Akiko Sakai)
大阪医科大学・医学部・講師
研究者番号: 30225750

(2)研究分担者

田中 覚 (Satoru Tanaka)
大阪医科大学・医学部・助教
研究者番号: 50595741