

平成 30 年 6 月 28 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26350963

研究課題名(和文) 抗癌剤耐性獲得における熱ショック蛋白質HSPB1の構造機能相関の解明とその応用

研究課題名(英文) Elucidation of structure-function relationship of HSPB1 in anticancer drug resistance mechanism

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：抗癌剤5-Fluorouracil と異なる作用機序をもつ抗癌剤paclitaxelの耐性獲得におけるHSPB1のオリゴマー構造とリン酸化，及び相互作用タンパク質の解析を行った。両耐性・感受性株において異なる分子量のオリゴマー構造をとること，そのリン酸化状態が異なっていることを明らかにした。また，HSPB1と相互作用するタンパク質としてCytokeratin 8, 18, 19及び他のタンパク質2種を同定した。

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 in anticancer agent 5-fluorouracil and paclitaxel-resistant cells, demonstrated that the oligomeric structures and phosphorylation of HSPB1 in both resistant cells are different. In addition, cytokeatin subtypes and other two proteins were identified as proteins that interact with HSPB1.

研究分野：生物学

キーワード：HSPB1 抗癌剤耐性

1. 研究開始当初の背景

癌の治療においては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。抗癌剤 5-フルオロウラシル(5-FU)は大腸癌・乳癌など多くの癌で用いられ、核酸代謝酵素を阻害することで作用する。しかし、長期・反復投薬によって耐性を獲得し、その機序として 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。研究代表者は、抗癌剤の耐性獲得機序の解明を目的として種々の手法を用い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 5-FU による細胞死を起こしにくい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、改良型の等電点電気泳動法(従来法の欠点を克服し再現性など改良した方法)を用いた二次元電気泳動で解析し、耐性獲得によって発現量が変化したスポットを質量分析でタンパク質同定した。注目すべきことに、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、アポトーシスに關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ることが分かった。

研究代表者は、耐性獲得により発現が変動したタンパク質の中で低分子熱ショックタンパク質(sHSP)の一つである HSPB1(HSP27)に以下の理由で注目した。すなわち、sHSP は様々なストレスに応答して発現が変動し、生理的・病的な状況で多くの細胞機能を調節する。更に近年、活性型であるリン酸化型 HSPB1 が複数のアポトーシス経路で抑制的に働くこと、27 kDa の単量体から 500 kDa 以上の種々の分子量の多量体(オリゴマー)として存在し、他のタンパク質と相互作用することで様々な細胞機能を発揮すること、オリゴマー化の調節には種々のリン酸化酵素による HSPB1 の複数のリン酸化部位が關与することが報告されている。よって、5-FU 耐性獲得で発現が増加した HSPB1 の構造・機能の変化と相関を調べることは、耐性獲得機序の解明に大きく貢献すると考えた。更にこの研究の応用として、HSPB1 が耐性獲得マーカーとして有用かを探ることを目的とした。

2. 研究の目的

研究代表者は、抗癌剤 5-FU 耐性のプロテオーム解析によって、抗癌剤感受性の低下と關連するタンパク質の一つとして HSPB1 を見出した。この研究では、抗癌剤耐性獲得における HSPB1 の役割を、リン酸化修飾・オリゴマー構造・他のタンパク質との相互作用を解析することで明らかにする。さらに、耐

性獲得マーカーとして応用できるか、患者血清を用いてその有用性を検討する。これにより、抗癌剤耐性獲得機序の解明とその臨床応用を目指す。

具体的には以下の通りである。

(1) HSPB1 のリン酸化とオリゴマー構造
耐性獲得における HSPB1 の構造と機能の關係を、リン酸化を含む翻訳後修飾に注目し 5-FU 感受性株と耐性株を用いて明らかにする。また、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検討する。すなわち、微小管脱重合を阻害し細胞死を起こすという、5-FU とは異なる作用機序の抗癌剤パクリタキセル(PTX)に対する感受性・耐性株の解析結果を 5-FU 感受性・耐性株の結果と比較検討する。さらに、HSPB1 におけるリン酸化以外の翻訳後修飾を明らかにする。

(2) HSPB1 と相互作用するタンパク質の同定

HSPB1 のオリゴマーは様々なタンパク質と相互作用してその機能を発揮すると考えられることから、耐性株において相互作用するタンパク質を明らかにする。同定したタンパク質がどの分子量のオリゴマーと相互作用するのか、また感受性株と耐性株でどう変化するのかを明らかにする。これらの結果を異なる作用機序をもつ PTX 耐性株と比較検討を行う。

(3) 耐性獲得マーカーとしての有用性の確認

疾病などで生体内での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報告されている。大腸癌・乳癌の患者血清を用いて、HSPB1 レベルの変化に加え、相互作用するタンパク質からマーカー候補を選び定量し、実際の化学療法の治療効果と比較検討する。複数のマーカーを組み合わせることで、より有効な耐性獲得マーカーとなりうるかどうかを検討する。

3. 研究の方法

(1) HSPB1 のリン酸化とオリゴマー構造の解析

細胞内に近い状態を維持するよう温和な条件で抽出したタンパク質を、タンパク質のオリゴマー構造を維持したまま泳動できる Blue Native 電気泳動を用いて分画した。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 電気泳動を行ったゲルを SDS などで可溶化処理し、二次元目に SDS 電気泳動を行い Western blot を行うことで、各オリゴマーの解離しやすさや構成するタンパク質を調べた。

HSPB1 のリン酸化状態を更に詳細に検討

するために、リン酸化タンパク質と相互作用し、SDS 電気泳動や二次元電気泳動では分離できないリン酸化タンパク質を分離することのできる Phos-tag アクリルアミドゲルを用いたゲルシフト電気泳動法で解析した。

(2) HSPB1 と相互作用するタンパク質の同定

共免疫沈降法を用いて HSPB1 と相互作用するタンパク質を同定した。すなわち、抗 HSPB1 抗体を用いて、温和な条件の細胞抽出液から HSPB1 に結合しているタンパク質を免疫沈降し、SDS 電気泳動もしくは改良型二次元電気泳動で分離し質量分析で同定した。同定したタンパク質と HSPB1 の相互作用は、Blue Native 電気泳動法で HSPB1 オリゴマーを分離したのち、同定タンパク質の抗体で western blot を行うことで確認した。

(3) 耐性獲得マーカーとしての有用性の確認

5-FU 及び PTX 系抗癌剤治療予定の乳癌患者を対象に、治療開始前から病変増悪のため治療変更するまでの血清を経時的に集めた。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。

4. 研究成果

(1) HSPB1 のリン酸化とオリゴマー構造

5-FU 耐性獲得によって HSPB1 のタンパク質量が増加することを改良型二次元電気泳動及び western blot によって確認した。耐性株における HSPB1 のリン酸化部位が Ser15、Ser78、Ser82 であることを質量分析によって決定した。HSPB1 の発現増加やオリゴマー構造が 5-FU 耐性に特有の現象であるかを調べるために、5-FU とは作用機序の異なる抗癌剤 PTX の感受性・耐性株のプロテオーム解析をしたところ、23 のタンパク質が発現変動すること、PTX 感受性株における HSPB1 発現レベルは 5-FU 耐性株よりも既に高く、PTX 耐性株ではそれが減少していることなどを確認した(発表論文)。

Phos-tag アクリルアミドゲルを用いたゲルシフト電気泳動法により HSPB1 のリン酸化状態を詳細に検討したところ、等電点二次元電気泳動や SDS 電気泳動では分離できなかったリン酸化 HSPB1 のバンドが検出され、さらに複数のリン酸化状態の HSPB1 が存在することが示された。

Blue Native 電気泳動で解析した 5-FU 感受性株と耐性株における HSPB1 オリゴマー構造を比較すると、150 kDa 以下と 500 kDa 以上の異なる分子量のオリゴマーが複数存在すること、それぞれの分子量のオリゴマーにおいて、HSPB1 のリン酸化レベルやリン酸化部位が感受性株と耐性株で異なってい

ること、リン酸化部位の違いでオリゴマーの解離しやすさが違うことが分かった。これら Blue Native 電気泳動で分離した各分子量のオリゴマーに HSPB1 が含まれていることは、Blue Native 電気泳動したゲルを SDS 電気泳動で二次元に展開し各種 HSPB1 抗体で western blot することで確認した。

また、PTX 感受性株と耐性株における HSPB1 のリン酸化やオリゴマー構造を比較すると、HSPB1 全体としてのリン酸化レベルは 5-FU 耐性では亢進していたが、PTX 耐性では減弱していること、HSPB1 単量体の発現は PTX 耐性株では感受性株に較べ減少しているが、逆に特定分子量のオリゴマーが増加していることが分かった。よって、アポトーシスに關与する HSPB1 の構造変化が耐性獲得に何らかの寄与をしていることが示唆された。

(2) HSPB1 と相互作用するタンパク質

5-FU 耐性株と抗 HSPB1 抗体を用いた共免疫沈降実験によって、HSPB1 と相互作用するタンパク質として細胞骨格タンパク質である cytokeratin 8、18、19 を同定した。オリゴマー構造を保ったまま泳動できる Blue Native 電気泳動を用いた実験で、これら cytokeratin サブタイプが HSPB1 オリゴマーに含まれているかを確認した結果、5-FU、PTX の両感受性・耐性株で同じ分子量のオリゴマー画分に cytokeratin 8、18、19 が存在していること、

そのオリゴマー画分に存在する cytokeratin 8、18、19 は、それぞれの感受性株と較べ、5-FU 耐性では減少し PTX 耐性では逆に増加したことが分かった。

さらに、前回とは異なる実験系で共免疫沈降実験を行ったところ、3 種の Cytokeratin 以外の相互作用タンパク質の候補として、細胞骨格タンパク質である actin と、HSPB1 とは別のストレス応答タンパク質である HSPB6 が同定された。Blue Native 電気泳動による解析によって、HSPB6 はある分子量の HSPB1 オリゴマーに存在しそのレベル変動が両耐性株で逆のパターンを示したが、これについては更に検討を進める予定である。

(3) 耐性獲得マーカーとしての有用性の確認

病変の増悪と血清中 HSPB1 レベルに正の相関傾向が見られたが、一部の症例では病変増悪にもかかわらず一定の値をとるものも見られた。CK18 は PTX 感受性の血清で高値を示した。しかし、まだ明確な結果は出さず他のマーカー候補などさらなる検討が必要である。

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 5 件)

Kimura K, Iwamoto M, Tanaka S, Yamamoto D, Yoshidome K, Ogura H, Terasawa R, Matsunami N, Takahashi Y, Nitta T, Morimoto T, Fujioka H, Kawaguchi K, Uchiyama K. A phase II, multicenter, single-arm trial of eribulin as first- or second-line chemotherapy for HER2-negative advanced or metastatic breast cancer: evaluation of efficacy, safety, and patient-reported outcomes. *Cancer Chemother Pharmacol.* 81(5), 923–933, 2018 査読有
DOI: 10.1007/s00280-018-3567-y.

Fujioka H, Sakai A, Tanaka S, Kimura K, Miyamoto A, Iwamoto M, Uchiyama K. Comparative proteomic analysis of paclitaxel resistance-related proteins in human breast cancer cell lines. *Oncology Letters* 13(1), 289–295, 2017 査読有
DOI:10.3892/ol.2016.5455

Tanaka S, Iwamoto M, Kimura K, Takahashi Y, Fujioka H, Sato N, Terasawa R, Kawaguchi K, Ikari A, Tominaga T, Maezawa S, Umezaki N, Matsuda J, Uchiyama K. A Phase II Study of Adjuvant Chemotherapy of Tegafur-Uracil for Patients with Breast Cancer with HER2-negative Pathologic Residual Invasive Disease After Neoadjuvant Chemotherapy. *Anticancer Res.* 36(12), 6505–6509, 2016 査読有
DOI:10.21873/anticancerres.11250

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, 191–196, 2015 査読有
DOI: 10.1016/j.clbc.2014.12.003.

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, 35–46, 2014 査読有
DOI: 10.1016/j.jprot.2014.03.022.

〔学会発表〕(計2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)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

特記すべきことなし

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・非常勤講師

研究者番号：50595741