

令和 5 年 6 月 10 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2022

課題番号：17K01955

研究課題名（和文）抗癌剤耐性関連タンパク質HSPB1の構造機能相関の解明とその臨床応用

研究課題名（英文）Elucidation of structure-function relationship of multidrug resistance-associated protein HSPB1 and its clinical application

研究代表者

境 晶子（SAKAI, Akiko）

大阪医科薬科大学・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） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：抗癌剤5-フルオロウラシル(5-FU)、および異なる作用機序をもつ抗癌剤パクリタキセルの耐性獲得における熱ショックタンパク質であるHSPB1の機能を明らかにするために、HSPB1のリン酸化とオリゴマー（多量体）構造、及びHSPB1と相互作用するタンパク質の解析を行った。その結果、感受性株と耐性株ではHSPB1のオリゴマー構造とリン酸化状態が異なること、抗癌剤の違いによってもオリゴマー構造や相互作用するタンパク質との相互作用も異なることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

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-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。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。本研究の研究成果は耐性獲得機序の解明に貢献すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We investigated the function of the heat shock protein HSPB1 in the acquisition of resistance to the anticancer drugs 5-fluorouracil and paclitaxel, which have different mechanisms of action. Specifically, we analyzed the phosphorylation and oligomeric structure of HSPB1, as well as the proteins that interact with HSPB1. The results showed that the oligomeric structure and phosphorylation status of HSPB1 were different between sensitive and resistant cells, and that the oligomeric structure and interactions with interacting proteins also differed depending on the anticancer drug.

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

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-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。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、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(引用文献1-3)。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(従来法の欠点を克服し再現性など改良した方法)でプロテオーム解析し、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によって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(引用文献1)、アポトーシスに關与する複数のタンパク質の発現がアポトーシスを抑制する方向に変動していることが判明した(引用文献2)。よって、耐性株では5-FUによるストレス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考えた。

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の一つであるHSPB1(HSP27)に以下の理由で注目した。すなわち、低分子熱ショックタンパク質は様々なストレスにตอบสนอง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。さらに、活性化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が報告された。我々も5-FU耐性獲得によりHSPB1の発現量が増加していること、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、HSPB1が抗癌剤耐性に關与していることを確認している(引用文献2)。また、HSPB1は27kDaの単量体から500kDa以上のオリゴマー(多量体)まで種々の分子量の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。アポトーシスの機序に關与するHSPB1の耐性獲得における構造変化と機能の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られる。さらに、プロテオーム解析で見出したHSPB1を始めとする複数の抗癌剤耐性関連タンパク質が耐性獲得マーカーとして有用かを探る。

## 2. 研究の目的

本研究の最終目的は、抗癌剤耐性獲得におけるHSPB1の機能を、リン酸化等の翻訳後修飾・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こと、及び耐性獲得マーカーとしての有用性の確認である。具体的には以下の通りである。

### (1) 抗癌剤耐性獲得におけるHSPB1の翻訳後修飾とオリゴマー構造

耐性獲得におけるHSPB1の構造機能相関を、種々の抗癌剤耐性株におけるHSPB1のオリゴマー構造とリン酸化状態を調べ比較する。また、HSPB1におけるリン酸化以外の翻訳後修飾を明らかにし比較検討する。さらに、同定したリン酸化部位の変異体やリン酸化酵素阻害剤を用い、オリゴマー構造や抗癌剤感受性に対するHSPB1リン酸化の影響を確認する。以上より、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明らかにする。

### (2) HSPB1と相互作用するタンパク質の同定

5-FU耐性においてHSPB1と相互作用するタンパク質としてサイトケラチン(CK)のCK8、CK18、CK19を同定したが、種々の抗癌剤耐性株においてHSPB1と相互作用するタンパク質を共免疫沈降法で同定する。また、同定したサイトケラチンやそれ以外のタンパク質がどの分子量のHSPB1オリゴマーと相互作用するのか、またその相互作用が種々の抗癌剤感受性株と耐性株でどう変化したのかを明らかにする。さらに、CK8等の限定分解について分解部位など詳細に解析する。以上より、抗癌剤の作用機序の違いがHSPB1と他のタンパク質との相互作用にどう影響するのかを明らかにする。

### (3) 耐性獲得マーカーとしての有用性の確認

病的な状態で発現が変動したタンパク質とその翻訳を調節するマイクロRNA(miRNA)は、細胞外に放出され血清中に比較的安定に存在するため、これらはマーカーとなりうる。癌患者血清中のHSPB1レベルを測定するとその変動傾向はいくつかのパターンに分類できたが、耐性との明らかな相関は見つからなかった。そこで、HSPB1に加え複数の耐性関連タンパク質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を検討する。さらに近年、癌細胞におけるHSPB1やCKの発現にmiRNAの關与が報告されているので、そのmiRNAがマーカーとなりうるかについても検討する。

### 3. 研究の方法

#### (1) HSPB1 の翻訳後修飾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。分画後、ゲル上のタンパク質を PVDF 膜に転写し、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。これを 5-FU とパクリタキセル (PTX) 感受性株・耐性株で比較検討した。

#### (2) HSPB1 と相互作用するタンパク質の同定と解析

HSPB1 の抗体を用いた共免疫沈降法と質量分析により、HSPB1 と相互作用するタンパク質をさらに同定した。同定したタンパク質と HSPB1 の相互作用は、Blue Native 電気泳動と同定タンパク質の抗体による Western blot を行うことで解析した。

#### (3) 耐性獲得マーカーとしての有用性の確認

今まで検討したのは患者血清中の HSPB1 と CK18 のタンパク質レベルであったが明確な結果は得られなかった。プロテオーム解析で見いだした耐性関連タンパク質の翻訳を調節する可能性のある miRNA をデータベースで検索し、それらが耐性マーカーになるかを検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) HSPB1 の翻訳後修飾とオリゴマー構造の解析

5-FU と PTX の抗癌剤としての作用機序は異なる。すなわち、5-FU は核酸代謝酵素を阻害することで癌細胞をアポトーシスへ導くが、PTX は微小管の脱重合を阻害し細胞分裂を抑制する。プロテオーム解析の比較によって、5-FU 耐性株では感受性株に比べ HSPB1 の発現量及びリン酸化型 HSPB1 が増えこれがアポトーシス阻害、すなわち耐性獲得に関連していること、一方、PTX は耐性獲得により逆に HSPB1 の発現量が減少していることを見出している。よってこれら耐性株の比較検討を行った。

5-FU 耐性獲得での HSPB1 オリゴマーとリン酸化の関係は、オリゴマー形成にはリン酸化が関与していること、異なる分子量のオリゴマー (150 kDa 以下と 500 kDa 以上) が複数存在し、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、耐性株の 150 kDa オリゴマーでは非リン酸化型 HSPB1 が顕著に増加していることがわかった。さらに、PTX 感受性株と耐性株での HSPB1 オリゴマーとリン酸化の関係を 5-FU 耐性と比較すると、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 耐性では減弱しており、また、HSPB1 単量体の発現は PTX 耐性株では感受性株に比べ減少しているが、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寄与をしていることが示唆された。

計画していた 5-FU、PTX 以外の抗癌剤耐性株についての検討やリン酸化以外の翻訳後修飾についての検討は、研究に使える時間が足りず達成できなかったが、これから引き続き解析したいと考える。

#### (2) HSPB1 と相互作用するタンパク質の同定と解析

HSPB1 はホモオリゴマーだけでなく、他のタンパク質とヘテロオリゴマーを形成し機能発現することが知られている。今までの研究で HSPB1 と相互作用するタンパク質として CK8、CK18、CK19 を同定していたが、前回とは異なる実験系で再検討したところさらにアクチンと低分子熱ショックタンパク質の 1 つである HSPB6 を同定した。CK8、CK18、HSPB6 は、HSPB1 と相互作用するタンパク質として他の研究でも同定されていた。

Blue Native 電気泳動及び Western blot 法を用いて HSPB1 オリゴマーとの相互作用を検討したところ、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 CK8、CK18、CK19 が存在し、その量はそれぞれの感受性株と比べ、5-FU 耐性では減少し PTX 耐性では逆に増加した。また、HSPB6 は 150 kDa オリゴマーに存在し、5-FU 耐性では増加し PRX 耐性では減少した。HSPB1 と他のタンパク質との相互作用が耐性獲得に及ぼす影響については、さらに検討を続けたい。

#### (3) 耐性獲得マーカーとしての有用性の確認

今までに、抗癌剤治療を行った乳癌患者血清を用いて ELISA 法にて HSPB1 と CK18 の量を測定した。アポトーシスにより増加する限定分解を受けた CK18 のレベルは、PTX に耐性がない患者血清では高値を示し、一方 HSPB1 は病変の増悪と血清中レベルに正の相関傾向が見られたが明確な結果は得られていなかった。本研究では、プロテオーム解析で見いだした耐性関連タンパク質の翻訳を調節する可能性のある miRNA を耐性獲得マーカーとして使えるのではと考えデータベース検索したところ、プロテオーム解析で発現変動の見られたタンパク質や HSPB1 と相互作用するタンパク質のいくつか、共通の miRNA で翻訳制御されていることがわかった。これら miRNA が耐性獲得マーカーとして有用であるかを検討したい。

また、共免疫沈降法で相互作用するタンパク質として同定したタンパク質の中に、限定分解を受けた分子量の CK8 も同定した。CK8 と CK18 はアポトーシスが起これると限定分解を受けることが報告されているので、HSPB1 と相互作用している CK8 分解産物がマーカー候補となりうるかと考

える。

<引用文献>

1 .Kimura K, Wada A, Ueta M, Ogata A, Tanaka S, Sakai A, Yoshida H, Fushitani H, Miyamoto A, Fukushima M, Uchiumi T, Tanigawa N. Comparative proteomic analysis of the ribosomes in 5-fluorouracil resistance of a human colon cancer cell line using the radical-free and highly reducing method of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Int J Oncol.* 37(5), 1271-1278, 2010

2 .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(3), 806-818, 2012

3 .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

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Shima Takafumi, Taniguchi Kohei, Tokumaru Yoshihisa, Inomata Yosuke, Arima Jun, Lee Sang-Woong, Takabe Kazuaki, Yoshida Kazuhiro, Uchiyama Kazuhisa	4. 巻 47
2. 論文標題 Glucose transporter-1 inhibition overcomes imatinib resistance in gastrointestinal stromal tumor cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Oncology Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/or.2021.8218	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Machida Yasuhiro, Murakawa Takeshi, Sakai Akiko, Shoji Mitsuo, Shigeta Yasuteru, Hayashi Hideyuki	4. 巻 167
2. 論文標題 Reaction of threonine synthase with the substrate analogue 2-amino-5-phosphonopentanoate: implications into the proton transfer at the active site	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 357 ~ 364
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvz100	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kimura Kosei, Iwamoto Mitsuhiko, Tanaka Satoru, Yamamoto Daigo, Yoshidome Katsuhide, Ogura Hiroyuki, Terasawa Risa, Matsunami Nobuki, Takahashi Yuko, Nitta Toshikatsu, Morimoto Takashi, Fujioka Hiroya, Kawaguchi Kanako, Uchiyama Kazuhisa	4. 巻 81
2. 論文標題 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	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Chemotherapy and Pharmacology	6. 最初と最後の頁 923 ~ 933
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00280-018-3567-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 町田康博、村川武志、境 晶子、林 秀行
2. 発表標題 トレオニン合成酵素の反応機構 予期せぬアルジミン中間体の出現とその意義
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

〔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
研究分担者	田中 覚  (TANAKA Satoru)  (50595741)	大阪医科薬科大学・医学部・非常勤講師    (34401)	

	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
連携研究者	谷口 高平  (TANIGUCHI Kohei)  (70779686)	大阪医科薬科大学・医学部・助教    (34401)	

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
---------	---------