

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：24402

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15518

研究課題名（和文）Hsp72結合分子に着目したトリプルネガティブ乳癌の抗がん剤耐性克服への挑戦

研究課題名（英文）Focusing on the Hsp72-binding molecule to overcome anticancer drug resistance 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） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：熱ショック蛋白質72(Hsp72)は新生蛋白質の折り畳みや変性蛋白質の立体構造の維持に関わる分子シャペロンである。多くの癌では、Hsp72は癌遺伝子の安定化やストレス耐性を増強する。そこで我々は、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。

ヒト乳がん細胞株MDA-MB-231および5-FU耐性株MDA-MB-231/5-FUを用いた。抗Hsp72抗体を用いて、Hsp72結合蛋白質を精製し、LC/MS/MSにより同定した。同定した蛋白質は、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。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗がん剤治療は完治を目的とするもの、生活の質を向上させる、すなわちCareを目的とするものがあり、特に後者では長期間、奏功する抗がん剤を使用する。長期投与となることから副作用の少ない5-FUのような薬剤が望ましい。耐性の獲得、副作用の出現は生存期間を短縮するだけでなく、生活の質を著しく損なう。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がん剤のみであり、本研究の目的である奏功していた薬剤を再び使用できる耐性を解除する標的分子の探索は意義深く、癌研究・医療に多大な貢献をもたらすことが期待できる。

研究成果の概要（英文）：Heat shock protein 72 (Hsp72) is a molecular chaperone that assists in the folding of nascent polypeptides and in the refolding of denatured proteins. In many cancers, Hsp72 is enhanced stabilizing oncogenic genes and stress tolerance.

We hypothesized that Hsp72 client proteins may play a crucial role in drug resistance. Human breast cancer cell lines MDA-MB-231 and 5-FU-resistant MDA-MB-231/5-FU was used. Anti-Hsp72 antibody was used to purify Hsp72-binding proteins and identified by LC/MS/MS. The identified proteins are molecules that affect the sensitivity of 5-FU and may be potential drug targets.

研究分野：腫瘍薬学

キーワード：抗がん剤耐性 トリプルネガティブ乳がん 分子シャペロン

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

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。また、奏功する抗癌剤の長期投与により耐性の獲得という問題が生じる。これらの耐性機序として、ABC トランスポーターの発現上昇が報告されているが、その阻害薬と既存の抗癌剤の併用による生存期間の延長は認められない。耐性を解除する薬剤の開発が進まない中、新規の殺細胞性抗癌剤が創薬されているが、特徴的かつ重篤な副作用も多い。そのため、既存の副作用が軽微である薬剤を再度使用できる耐性を解除する薬剤の開発が望まれる。

(2) トリプルネガティブ乳癌の抗癌剤耐性を克服するために

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。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られる。

(3) Heat shock protein 72 と抗癌剤耐性

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 は抗癌剤の耐性機構に大きく寄与しており、耐性解除の標的分子の 1 つと考えられる。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 [Takahashi K et al. *Cancer Letters*, 2016]。

2. 研究の目的

以上の背景より、本研究では临床上、薬剤耐性がより問題となる TNBC 株を用い、副作用が軽微で長期投与が現実的に可能である 5-FU に対する耐性を解除する標的分子の探索を目的に、癌細胞のストレス回避・生存に関わるストレス応答蛋白質「Hsp72」に対する結合分子の解析を行った。

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)。

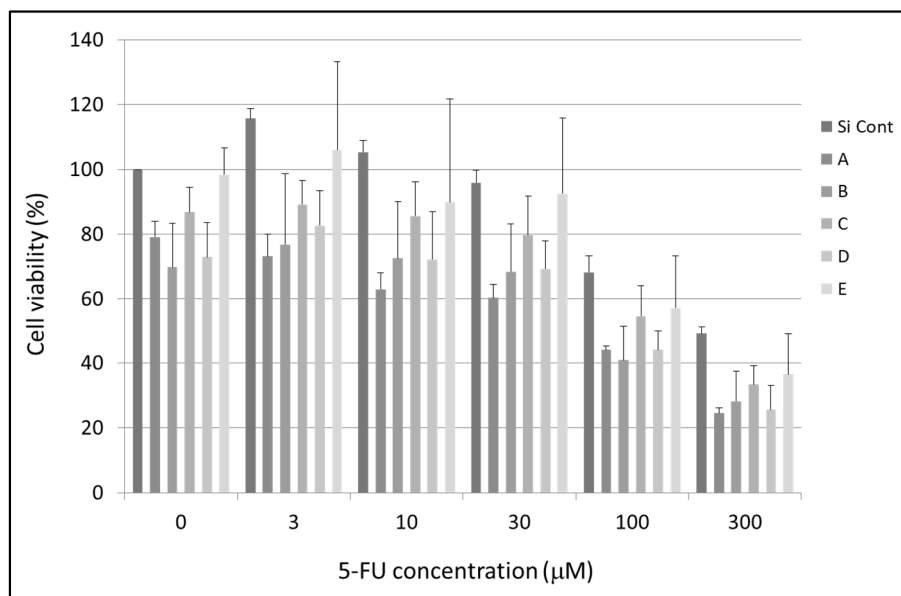


図 1 MDA-MB-231/5-FU 株に対する Hsp72 結合分子阻害による 5-FU 感受性の変化

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)。

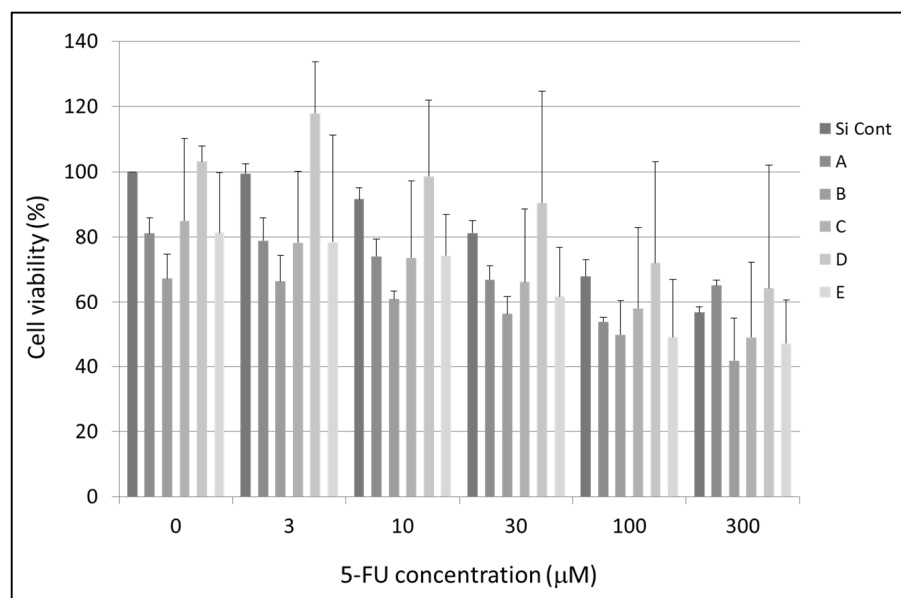


図 2 BT549/5-FU 株に対する Hsp72 結合分子阻害による 5-FU 感受性の変化

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る。そのため、今後は Hsp72 結合蛋白質 B の 5-FU 耐性に関わる機序および治療標的としての可能性をさらに検証していく予定である。

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