

令和 2 年 6 月 25 日現在

機関番号：32689

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15757

研究課題名(和文)小胞体ストレス応答におけるSDF-2機能解析によるオキサリプラチン耐性機序の解明

研究課題名(英文)SDF-2 is involved in oxaliplatin resistance by maintaining ER homeostasis

研究代表者

田中 昌子(橋昌子)(Tanaka, Masako)

早稲田大学・高等研究所・講師(任期付)

研究者番号：00733651

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)：新たなオキサリプラチン性因子としSDF-2を同定したが、分子機能が未知であることから耐性が生じる分子機構を明らかにできずにいた。本研究では胃がん細胞株におけるSDF-2の主な局在が小胞体であったことから、SDF-2欠損細胞を作製し、主要な小胞体機能である小胞体ストレス応答、糖鎖修飾、Ca²⁺貯蔵に与える影響を調べた。その結果、SDF-2はCa²⁺貯蔵の恒常性を維持させることで、細胞の増殖やオキサリプラチン耐性に寄与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗がん剤の耐性は薬剤そのものに対する抵抗性と細胞死に対する抵抗性に大別される。小胞体機能としては、小胞体ストレス応答の亢進が細胞死を抑制し、抗がん剤耐性を生じさせることが知られていたが、Ca²⁺の恒常性維持も細胞死の抑制に寄与する可能性を見出した。オキサリプラチンを含め抗がん剤の耐性を解除する治療薬はなく、奏効する既存薬を再び使用できるようになる耐性解除薬の開発に繋がる重要な知見を得た。

研究成果の概要(英文)：We identified SDF-2 as a novel factor in oxaliplatin resistance; however, the molecular mechanisms of SDF-2-mediated resistance have remained unknown. This study aimed to investigate the molecular function of SDF-2 in the ER of cancer cells. We used SDF-2 knockout cells to analyze how they affect ER functions, including unfolded protein response, protein glycosylation, and Ca²⁺ homeostasis. As a result, we found that SDF-2 is involved in cell growth and oxaliplatin resistance by maintaining ER Ca²⁺ homeostasis.

研究分野：応用薬理学

キーワード：抗がん剤耐性 オキサリプラチン カルシウム恒常性 胃がん細胞株

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

スキルス胃がんは進行が早く、腹膜やリンパ節に転移しやすい難治性がんの1つである。発見時には外科的治療が困難な場合も多く化学療法に頼らざるを得ず、5年生存率は10-20%にとどまっている。近年、本邦においてもオキサリプラチンはスキルス胃がんの使用可能となったが、早期に耐性が生じるため、奏効期間が短いという問題を抱えている。私たちはこれまでにスキルス胃癌細胞株 OCUM-2M を解析し、オキサリプラチンの耐性因子として Stomach cell-derived factor 2 (SDF-2) を同定した。SDF-2 が分子シャペロンによって安定化されることが耐性の獲得に繋がるが、SDF-2 が耐性を生じさせる分子機構については不明であった。そこで、SDF-2 の分子機能を調べ、オキサリプラチンの新しい耐性機構を明らかにしようとした。

2. 研究の目的

オキサリプラチンを含む白金製剤が小胞体ストレス応答 (unfolded protein response: UPR) を活性化すること、SDF-2 が小胞体に局在すること、さらにさらに分子構造の似た SDF2L1 が Bip タンパク質修復サイクルに寄与することが報告されている。そこで、本研究では SDF-2 が UPR 活性の調節を介して、オキサリプラチン誘導性のアポトーシスを抑制することを明らかにする。

3. 研究の方法

オキサリプラチンに耐性となったヒトスキルス胃がん細胞株 OCUM-2M/OXA およびヒト子宮頸がん細胞株 HeLa より、SDF-2 ノックアウト細胞を作製し、主な小胞体機能である小胞体ストレス応答、糖鎖修飾、および Ca²⁺恒常性に与える影響を調べた。

がん細胞における SDF-2 の局在

SDF-2 の同定に用いた OCUM-2M/OXA 細胞においても、SDF-2 が小胞体に局在しているか密度勾配超遠心法による細胞小器官の分画、および免疫蛍光染色により確認した。

SDF-2 ノックアウト細胞の作製

OCUM-2M/OXA および HeLa 細胞は、Crispr Cas9 システムを用いて SDF-2 をノックアウトした。ターゲット配列を導入後、ピューロマイシンにより陽性細胞を選抜した。限界希釈法によりシングルクローン化した陽性細胞は、ウェスタンブロットによる発現確認および変異部位配列のシーケンス解析を行い、ノックアウト細胞の作製を確認した。

SDF-2 ノックアウトが小胞体機能へ与える影響

SDF-2 ノックアウト細胞を用い、小胞体ストレス誘導剤に対する感受性試験を行った。また、その時の UPR signaling や O-glycosylation への影響をウェスタンブロットまたはリアルタイム PCR にて評価した。さらに、細胞内 Ca²⁺イオンを測定し Ca²⁺貯蔵に与える影響を調べた。

4. 研究成果

SDF-2 は小胞体に局在する

密度勾配超遠心法により、オキサリプラチン耐性株 OCUM-2M/OXA の細胞小器官を分画した結果、内因性 SDF-2 は小胞体マーカーである calreticulin と同じ分画に検出された。また、小胞体の顆粒成分であるマイクロソームを単離したところ、SDF-2 がマイクロソーム内

に存在することが分かった。さらに HeLa 細胞を用いた免疫蛍光染色によっても、SDF-2 が小胞体に局在することが明らかとなった。

SDF-2 欠損は細胞増殖を抑制する

SDF-2 ノックアウト細胞を作製し、その表現型を解析した結果、オキサリプラチンに対する感受性だけでなく、細胞の増殖を抑制することが分かった。SDF-2 と同じ分子機能を持つと推定されている *SDF2L1* の遺伝子発現は変化がなかったことから、SDF-2 は細胞増殖を正に制御することが示唆された。

SDF-2 欠損は UPR signaling に影響しない

小胞体ストレスの誘導剤を添加し、WT と KO 群の薬剤感受性を評価した結果、タブシガルギンにのみ耐性を示した。しかし、薬剤の添加とは無関係に SDF-2 KO は Bip の発現を減少させるものの、UPR signaling に影響しなかった。また、オキサリプラチン添加時においても、両群の UPR signaling に差はなかった。

SDF-2 欠損は O-glycosylation に影響しない

包括的な糖鎖量を評価するために、O-GlcNAc ウェスタンブロットで検出した結果、WT と KO 群間で有意な差はなかった。

SDF-2 は細胞内 Ca²⁺貯蔵を減少させる

WT と KO 群における細胞内 Ca²⁺量を細胞内カルシウム指示薬を用いて測定した結果、KO 群で有意に減少した。さらに Ca²⁺不含培地で ATP を添加し、細胞内 Ca²⁺量を経時的に測定した結果、WT で見られる Ca²⁺の顕著な上昇が KO 群ではほとんど見られず、その後も WT と比較して低い Ca²⁺レベルで推移した。これは SDF-2 欠損が小胞体内の Ca²⁺を枯渇させたか、または小胞体からの Ca²⁺の放出を抑制することを示唆している。以上より、SDF-2 は細胞内 Ca²⁺貯蔵に関与することが明らかとなった。

本研究では SDF-2 欠損が小胞体の Ca²⁺枯渇または小胞体からの Ca²⁺放出を阻害することで、Ca²⁺依存的な細胞増殖や BiP の発現を抑制することを明らかにした。SDF-2 が小胞体 Ca²⁺恒常性維持することによりオキサリプラチン耐性を生じさせている可能性を示唆した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Tanaka Masako, Shiota Masayuki, Koyama Masaru, Nakayama Jun, Yashiro Masakazu, Semba Kentaro, Goda Nobuhito	4. 巻 39
2. 論文標題 Generation of Rat Monoclonal Antibodies Specific for Human Stromal Cell-Derived Factor-2	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy	6. 最初と最後の頁 23～26
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/mab.2019.0043	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8件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Masako Tanaka, Katsuyuki Takahashi, Katsuyuki Miura, Shuhei Tomita, Nobuhito Goda, Masayuki Shiota
2. 発表標題 Stabilization of SDF-2 by Hsp72 contributes to oxaliplatin resistance in human gastric cancer cells
3. 学会等名 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中 昌子、八代 正和
2. 発表標題 胃がん細胞株における新規オキサリプラチン耐性因子SDF-2の同定
3. 学会等名 第22回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 塩田正之、高橋克之、八代正和、田中昌子
2. 発表標題 Hsp72によるSDF-2の分解抑制はオキサリプラチン耐性の一因である
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 田中昌子、高橋克之、八代正和、合田巨人、塩田正之
2. 発表標題 Hsp72によるSDF-2の安定化はオキサリプラチン耐性の維持に重要である
3. 学会等名 第12回臨床ストレス応答学会大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

早稲田大学高等研究所 https://www.waseda.jp/inst/wias/other/2018/04/02/5056/

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
研究協力者	塩田 正之 (Shiota Masayuki)		
研究協力者	合田 巨人 (Goda Nobuhito)		