

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：34504

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16506

研究課題名（和文）分子シャペロンの結合解析に基づいた多剤耐性機構の解明

研究課題名（英文）Identification of multidrug resistance factors by analysis of Hsp70-interacting proteins

研究代表者

田中 昌子（Tanaka, Masako）

関西学院大学・生命環境学部・講師

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）：がん細胞は1つの細胞障害性抗がん剤に対して耐性を獲得すると、作用機序の異なる他の種類の抗がん剤に対しても耐性を示すようになる。本研究ではストレス応答分子であるHsp70と結合するタンパク質を解析し、抗がん剤の多剤耐性に寄与する分子を同定した。4種の細胞障害性抗がん剤それぞれに耐性となった胃癌細胞株を解析した結果、4種に共通するHsp70結合タンパク質として6分子同定した。そのうち4分子の機能阻害が抗がん剤の感受性を回復させたことから、これらの分子が多剤耐性を生じさせていることが示唆された。

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。前者は薬剤排出ポンプであるABCトランスポーターの亢進などが多剤耐性を生じさせる分子機構としてよく知られているが、後者の原因となる多剤耐性機構はよく分かっていない。本研究は抗がん剤の分子構造や作用機序が異なる場合であっても、共通して生じる細胞内ストレスに着目し、複数の多剤耐性候補因子を同定した。この成果は抗がん剤ストレスにさらされたがん細胞が細胞死に対する抵抗性をどのように獲得するのかを知るうえで重要な知見であり、抗がん剤多剤耐性の克服へ向けた研究基盤を構築する。

研究成果の概要（英文）：Multiple drug resistance, a phenomenon whereby cancer cells that acquire resistance to one type of anticancer drugs also become resistant to several other drugs that are often quite different in both structure and mechanisms of action, has been studied. This study analyzed proteins that interact with Hsp70, a stress response molecule, and then identified novel molecules that contribute to multiple drug resistance. We identified six Hsp70 interacting proteins common to all gastric cancer cell lines resistant to each of the four cytotoxic anticancer drugs. Functional inhibition of these four molecules leads to restored sensitivity to the anticancer drugs, suggesting that these molecules cause multiple drug resistance.

研究分野：応用薬理学

キーワード：抗がん剤耐性 多剤耐性 分子シャペロン プロテオスタシス インタラクトーム 胃癌

1. 研究開始当初の背景

がん細胞は 1 つの細胞障害性抗がん剤に対して耐性を獲得すると、分子構造や作用機序の異なる他の抗がん剤に対しても耐性を示すようになる。多剤耐性の獲得は二次治療以降の治療成績を下げるため、多剤耐性の分子機構の解明と克服は重要な課題である。多剤耐性を生じさせる機構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。前者は薬剤排出ポンプである ABC トランスポーターなどが知られているが、後者についてはよく分かっていない。

我々はタンパク質の立体構造を安定化する分子シャペロンと結合するタンパク質の解析手法を開発し、抗がん剤の耐性因子を同定してきた。同定した因子は遺伝子レベルの発現変動を示さず、遺伝子発現に基づいた従来の定量的解析では発見できないため、本手法は新たな耐性因子を発見する画期的なツールとなる。本研究では、この手法を用い、細胞障害性抗がん剤に耐性となった 4 種類の胃がん細胞株を解析することで、多剤耐性を生じさせる因子を同定する。本研究は分子シャペロンの結合解析による多剤耐性因子スクリーニング系の確立と、多剤耐性を生じさせる分子機構を解明する研究の基盤を構築する課題である。

2. 研究の目的

前項の学術的背景を踏まえ、本研究は異なる作用機序をもつ細胞障害性抗がん剤 (oxaliplatin、paclitaxel、irinotecan、5-fluorouracil) それぞれに耐性を獲得した 4 種類の胃がん細胞株 OCUM-2M を用い、分子シャペロン Heat shock protein 70 (Hsp70) に結合するタンパク質を比較解析する。4 種の抗がん剤耐性株に共通する結合タンパク質が多剤耐性に寄与するか検証し、がんの普遍的なストレス応答機構を明らかにすることで、多剤耐性が生じる分子機構の解明に繋げる。

3. 研究の方法

スキルス胃がん細胞株 OCUM-2M より樹立した、oxaliplatin 耐性株 OCUM-2M/OXA、paclitaxel 耐性株 OCUM-2M/PTX、irinotecan 耐性株 OCUM-2M/SN38、5-fluorouracil 耐性株 OCUM-2M/5FU (Zhang X et al. *Anticancer Res.* 2010) の Hsp70 結合タンパク質を質量分析で同定し、4 種の細胞株に共通する Hsp70 結合タンパク質を多剤耐性候補因子とした。OCUM-2M/OXA および OCUM-2M/PTX は他の 3 剤に交差耐性を示すことが分かっているため、両株を用い、候補因子が耐性因子となり得るか siRNA 法により検証した。ノックダウン効率の評価はリアルタイム PCR またはウェスタンブロットにより、それぞれ mRNA とタンパク質発現を定量した。細胞の増殖および生存率はトリパンブルー染色によって評価した。また、oxaliplatin および paclitaxel に対する感受性は WST アッセイにより生存率を求め、得られた用量反応曲線より 50% 阻害率 (IC50 値) を算出することで評価した。抗がん剤添加時の候補因子のタンパク質発現はウェスタンブロットにより評価した。

4. 研究成果

抗がん剤耐性株特異的な Hsp70 結合タンパク質の同定

作用機序の異なる 4 種の細胞障害性抗がん剤 (oxaliplatin、paclitaxel、irinotecan、5-fluorouracil) にそれぞれ耐性となった胃がん細胞株 OCUM-2M の Hsp70 結合タンパク質を

質量分析にて測定し、同定したタンパク質を多剤耐性候補因子とした。すべての抗がん剤に感受性を持つ OCUM-2M 細胞をバックグラウンドコントロールとし、信頼度が 95% 以上のユニークペプチドを 2 つ以上同定したタンパク質を解析対象とした結果、4 種類の抗がん剤すべてに共通する Hsp70 結合分子として、6 分子を同定した。また、4 種類の抗がん剤すべてに交差耐性を示す OCUM-2M/OXA と OCUM-2M/PTX に特異的な Hsp70 結合分子を合計 31 分子同定した。これらの結果は同一クローンの細胞株であっても、暴露する抗がん剤の種類が異なれば、Hsp70 が結合するタンパク質が変化することを示唆している。

RNAi スクリーニングによる耐性因子の同定

前項で同定した候補因子を RNAi を介した遺伝子サイレンシングにより機能阻害し、耐性の解除能を評価することで、多剤耐性因子をスクリーニングした。OCUM-2M/OXA および OCUM-2M/PTX に候補因子の siRNA を導入し、48 時間後に 1×10^4 細胞に再播種したうえで、oxaliplatin または paclitaxel を添加し、さらに 72 時間培養した。細胞生存アッセイにより求めた用量反応曲線から IC_{50} 値を算出した結果、6 候補因子中 4 候補因子のノックダウンが control (siCTRL) に比べて IC_{50} 値を有意に減少させた。以上より、Hsp70 結合タンパク質の解析が多剤耐性因子のスクリーニングに有用であることが示唆された。

多剤耐性因子 HIP の解析

同定した 4 因子のうち、PDI ファミリー酵素の 1 つである HIP は oxaliplatin と同じ白金製剤である cisplatin の耐性因子として報告されている。そこで HIP についてさらなる解析を進めた。OCUM-2M/OXA 細胞に HIP の siRNA を導入し、48 時間後に mRNA およびタンパク質発現を定量した結果、siCTRL に比べて siHIP の mRNA 発現は 98.7%、タンパク質発現は 78.1% 抑制された。HIP の十分なノックダウンが確認できたため、HIP のノックダウンが細胞の増殖や生存に影響を与えるか検証した結果、siCTRL と比べて有意な差はなかった。したがって、HIP は細胞の生存や増殖には関与しないことが分かった。HIP が細胞の生存因子ではなかったため、次に、HIP のノックダウンが oxaliplatin に対する感受性を回復させるか検証した結果、予想に反して oxaliplatin に対する感受性は回復しなかった。OCUM-2M/OXA 細胞は paclitaxel に交差耐性を示すため、paclitaxel に対する感受性を評価したところ、siHIP は IC_{50} 値を有意に低下させた。HIP が paclitaxel の感受性に寄与したため、OCUM-2M/PTX 細胞を用いて同様の実験を行った結果、HIP のノックダウンは paclitaxel のみならず oxaliplatin の IC_{50} 値も有意に低下させた。作用機序が異なる複数の抗がん剤の耐性に寄与することから、HIP は多剤耐性の因子であると考えられる。最後に、oxaliplatin および paclitaxel 添加時の HIP のタンパク質発現を評価した結果、どちらの耐性株においても、HIP のタンパク質発現が抗がん剤添加により増加したことから、HIP は分子シャペロン機能を介して細胞死に対する抵抗性を生じさせている可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 塩田正之、田中昌子、鰐淵英機、徳永文穂
2. 発表標題 Hsp72によるがん細胞遊走制御
3. 学会等名 第14回日本臨床ストレス応答学会大会
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

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