

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月15日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590176

研究課題名（和文） プロテオーム解析による抗がん剤反応性関連タンパク質の解明と
バイオマーカーへの応用研究課題名（英文） Proteomic analysis to find predictive markers for chemotherapeutic
response, and basic study for biomarker development

研究代表者

鈴木 小夜（SUZUKI SAYO）

慶應義塾大学・薬学部・講師

研究者番号：90424134

研究成果の概要（和文）：

抗がん剤治療の個別化には個々の患者の薬剤反応性を治療開始前に見極めるバイオマーカーの確立が必須である。本研究では、研究代表者が大腸癌におけるオキサリプラチン感受性予測候補タンパク質として見出した細胞内タンパク質 S100A10 の機能解析と臨床応用に向けた基礎的検討を行なった。その結果、S100A10 が抗腫瘍メカニズムの異なる抗がん剤に対して異なる挙動を示しその発現変化はオキサリプラチン特異的であること、薬剤感受性への影響に結合パートナーである annexin A2 との相互作用が関与している可能性を見出した。

研究成果の概要（英文）：

Predictive markers for chemotherapeutic response are urgently needed to improve the outcomes of cancer treatment. We have previously found that intracellular S100A10 is expected to be one of the candidate predictive markers for response to oxaliplatin, a key drug for the treatment of colorectal cancer (CRC). In this study, we have demonstrated, by using CRC cells, that S100A10 is more specific to L-OHP than 5-fluorouracil and suggested the possibility that the interaction of S100A10 and annexin A2, the binding partner of S100A10, is potentially involved in the chemoresistance.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：個別化医療、抗がん剤、薬剤反応性、バイオマーカー、プロテオーム、
オキサリプラチン

1. 研究開始当初の背景

がんの早期発見方法や標準的治療法の確立など、診断・治療技術の進歩はがん治療成績の向上をもたらしつつあるが、がんに対する薬物治療の“非”有効率（薬剤応答性が低い/無し）は70～100%とも報告されている [BM Silber in “Pharmacogenomics” (2001)]。個々の患者の薬剤反応性を治療開始前に見極めて「適切な薬剤を適切な量で必要な患者に」投与できるようにするための信頼できるバイオマーカーの確立が抗がん剤治療の個別化には必須である。

抗がん剤反応性に関する研究は、塩酸イリノテカンの活性代謝物 SN-38 の不活化酵素である UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT) の遺伝多型 (*UGT1A1*6* および *UGT1A1*28*) が重篤な有害反応の予測因子として確立している他、フルオロウラシルによる dihydropyrimidine dehydrogenase の mRNA 発現量、近年では *KRAS* 遺伝子変異とセツキシマブの治療反応性について明らかにされているが、いずれも DNA (ゲノム) や mRNA (トランスクリプトーム) にもとづく報告が多い。しかし、薬効発現本体はタンパク質である。現段階では、細胞内で動的に変化するタンパク質の機能をゲノムやトランスクリプトームから完全に予測することはできないため、プロテオーム解析にもとづく薬剤反応性予測タンパク質バイオマーカーは、直接的で信頼性の高いマーカーになり得ると考える。

研究代表者は2007～2008年度「萌芽研究」の助成を受け、大腸癌治療における key drug の一つである oxaliplatin (L-OHP) に対する感受性が異なる複数のヒト大腸がん細胞株を用いたプロテオーム解析を行い、L-OHP 感受性と相関して異なる発現量を示す数種類のタンパク質を見出した。さらに、それらの

うち最も薬剤反応性と強い相関を示したタンパク質は、構造決定により S100 calcium-binding protein A10 (S100A10) であることを見出した。S100A10 は、結合パートナーである annexin A2 や膜タンパク質、受容体等に結合してその機能発現に関与するとともに、さまざまな要因により発現誘導されることが報告されているが、L-OHP 感受性の異なる複数の大腸がん細胞においては S100A10 発現量が異なり、かつ L-OHP 感受性と相関することを初めて見出した。

そこで本研究では、S100A10 の抗がん剤反応性に関わる機能解析と、治療反応性予測バイオマーカーとしての臨床応用に向けた基礎的研究に着手した。

2. 研究の目的

薬効発現本体であるタンパク質をターゲットとしたプロテオーム解析による抗がん剤反応性予測タンパク質の解明とバイオマーカーへの応用に向けた研究を目的とする。具体的には、研究代表者が L-OHP 感受性予測候補タンパク質として見出した S100A10 についての機能解析と、臨床応用に向けた基礎的検討を行なう。

3. 研究の方法

(1) S100A10 の機能解析

L-OHP 感受性および 5-フルオロウラシル (5-FU) 感受性と S100A10 発現量に関する検討

8種類のヒト大腸癌細胞 (COLO-320, DLD-1, HCT-15, HCT116, HT-29, LS174T, SW480, SW620) を用いて、S100A10 の細胞内タンパク質発現量をウエスタンブロット法 (WB) により評価し、それらの発現プロファイルと

L-OHP、および L-OHP と異なる作用機序を有する 5-FU 感受性との関連につき検討した。

薬剤曝露後の S100A10 の挙動に関する検討
L-OHP 感受性の異なるヒト大腸がん細胞株（高感受性株：HCT116、低感受性株：DLD-1）を用いて、各細胞株における L-OHP 単独、5-FU 単独、および L-OHP/5-FU 併用曝露時の S100A10 の挙動を surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry（SELDI-TOF MS）により分析した。

RNA 干渉を用いたノックダウン実験

S100A10 高発現ヒト大腸癌細胞株（HT29）を用い、S100A10 および annexin A2 について、各 siRNA による単独、および両者の同時ノックダウン（ダブルノックダウン）を実施し、L-OHP 感受性の変化について検討した。

(2) S100A10 および annexin A2 の細胞内発現量に関する検討

8 種類のヒト大腸癌細胞株（COLO-320, DLD-1, HCT-15, HCT116, HT-29, LS174T, SW480, SW620）を用い、WB により S100A10 および annexin A2 の細胞内タンパク質発現量を評価した。また、mRNA 発現量については、13 種類のヒト大腸癌細胞株（COLO201, COLO2205, COLO-320, DLD-1, HCT-15, HCT116, HT-29, LOVO, LS174T, SW480, SW620, WiDR, SW1116）を用い、定量的リアルタイム PCR により S100A10 および annexin A2 の mRNA 発現量を評価した。

(3) 臨床応用に向けた基礎的検討

ヒト大腸癌細胞培養上清における S100A10 の検出

S100A10 高発現ヒト大腸癌細胞株（HT29、DLD-1）の培養上清を濃縮し WB により評価した。

ヒト血清を用いた S100A10 検出の検討
慶應義塾大学医学部倫理委員会にて承認を得たヒト血液検体を SELDI-TOF MS により分析した。

臨床組織検体を用いた検証に向けた免疫組織染色の基礎的検討

ヒト大腸癌細胞株（S100A10 高発現株：HT29、S100A10 低発現株：COLO-320）を利用して作製したブロックのパラフィン薄切切片を用いて、S100A10、annexin A2 の各単染色および S100A10-annexin A2 二重染色の条件につき検討した。

4. 研究成果

(1) S100A10 の機能解析

L-OHP 感受性および 5-FU 感受性と S100A10 発現量に関する検討

S100A10 タンパク質発現量は、L-OHP 感受性と有意な相関を示したが、抗腫瘍メカニズムの異なる 5-FU 感受性との間には有意な相関を認めなかった。これにより、S100A10 は L-OHP 感受性に関して特異的なマーカー候補タンパク質であることが示された。

薬剤曝露後の S100A10 の挙動に関する検討
L-OHP 高感受性株、低感受性株のいずれにおいても、5-FU 曝露時の S100A10 の挙動はコントロール（薬剤非曝露時）と著変なかったのに対し、L-OHP、および L-OHP/5-FU 併用曝露時には、とくに低感受性株において一過性の発現上昇を認めた。これにより、S100A10 が L-OHP 曝露時の細胞内変化に關与する可能性が示唆された。

RNA 干渉を用いたノックダウン実験

annexin A2 単独、および S100A10 と annexin A2 のダブルノックダウンにより L-OHP 感受性が上昇する傾向が認められた。また、annexin A2 siRNA により、annexin A2 のみならず

S100A10の発現も著しく減少した。S100A10とannexin A2はそれぞれの二量体が結合したヘテロテトラマーを形成していることが知られており、L-OHP感受性に対しては両者の相互作用が関与する可能性が推察された。

(2) S100A10 および annexin A2 の細胞内発現に関する検討

L-OHP 感受性の異なる複数のヒト大腸癌細胞株において、S100A10 と annexin A2 は、タンパク質発現量および mRNA 発現量いずれにおいても有意な正の相関を示した。さらに、S100A10、annexin A2 いずれにおいても、各々の mRNA 発現量とタンパク質発現量は正の相関を示した。annexin A2 の発現抑制が S100A10 の発現量低下をもたらすことは過去にも報告されており、細胞内 S100A10 の安定性に annexin A2 寄与していると考えられているが、今回の結果より、intact な細胞内 S100A10 タンパク質発現量は必ずしも annexin A2 に依存したものではないことが示された。

(3) 臨床応用に向けた基礎的検討

ヒト大腸癌細胞培養上清における S100A10 の検出

S100A10 高発現細胞株の培養上清より S100A10 を検出した。

ヒト血清を用いた S100A10 検出の検討

ヒト血液検体を SELDI-TOF MS により分析した結果、S100A10 とほぼ一致する 11kDa 付近にピークを検出した。

、より、S100A10 は細胞外に分泌され、血液などの細胞外液を用いて検出できる可能性が示唆された。

臨床組織検体を用いた検証に向けた免疫組織染色の基礎的検討

ヒト大腸癌細胞を用いた検討により、S100A10、annexin A2 の各単染色および S100A10-annexin A2 二重染色の条件を決定した。ヒト臨床組織検体、もしくは組織アレイを用いた検証実験可能な段階にまで検討を進めた。

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 1 件)

Suzuki S, Yamayoshi Y, Nishimuta A, Tanigawara Y.

S100A10 protein expression is associated with oxaliplatin sensitivity in human colorectal cancer cells.

Proteome Science 2011; 9: 76

DOI: 10.1186/1477-5956-9-76 (査読有り)

[学会発表](計 10 件)

Yusuke Tanigawara. Metabolomic and proteomic analyses for pharmacotherapy. Annual Congress of International Pharmaceutical Federation (FIP 2010), Aug.30, 2010, Lisbon (Portugal).

Yusuke Tanigawara. Cancer Pharmacogenomics in Asia: Post-genome proteomic and metabolomic analysis for pharmacological responses to anticancer agents, 9th International Conference of the Asian Clinical Oncology Society, Aug.25, 2010, Gifu (Japan).

Sayo Suzuki, Akito Nishimuta, Yusuke Tanigawara. Protein S100A10: Expression and correlation with sensitivity to oxaliplatin in colorectal cancer cells. American Association for Cancer Research Annual Meeting 2010, Apr.20, 2010, Washington, DC (USA).

鈴木小夜, 西牟田章戸, 谷川原祐介. 大腸癌細胞における S100A10 のオキサリプラチン

感受性予測タンパク質としての特異性．日本薬学会第 130 年会，2010.3.28，岡山．

入江秀大，鈴木哲也，西牟田章戸，鈴木小夜，谷川原祐介．SN 38/5-FU 併用に対する大腸癌細胞応答のプロテオーム・メタボローム解析．第 8 回日本臨床腫瘍学会学術集会，2010.3.18，東京．

生駒祐介，鈴木哲也，西牟田章戸，鈴木小夜，谷川原祐介．オキサリプラチン/5-FU 併用に対する大腸がん細胞応答のプロテオーム・メタボローム解析．第 8 回日本臨床腫瘍学会学術集会，2010.3.18，東京．

鈴木小夜，山吉康子，西牟田章戸，谷川原祐介．プロテオーム解析によるオキサリプラチン感受性予測バイオマーカーの同定．第 68 回日本癌学会学術総会，2009.10.3，横浜．

Yusuke Tanigawara. Pharmaco-proteomics and metabolomics for personalized medicine, Approach of individualized medicine in near-future, FIP and JSPHCS International Conference on Individualized Medicine: Bridging between Scientific and Clinical Studies, Oct.25, 2009, Nagasaki (Japan).

谷川原祐介，西牟田章戸，鈴木小夜．プロテオーム/メタボロームによる抗がん剤反応性バイオマーカー．第 47 回日本癌治療学会学術集会，2009.10.24，横浜．

Sayo Suzuki, Yasuko Yamayoshi, Akito Nishimuta, Mitsuhiro Watanabe, Yusuke Tanigawara. S100A10 as a potential protein biomarker for oxaliplatin sensitivity in colorectal cancer cells, American Association for Cancer Research Annual Meeting 2009, Apr.20, 2009, Denver (USA).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)

名称：抗がん剤の感受性判定方法
発明者：谷川原祐介、鈴木小夜、入江秀大
西牟田章戸、鈴木哲也、杉本伸二
権利者：学校法人慶應義塾、
株式会社ヤクルト本社

種類：特許
番号：PCT/JP2010/69362
(基礎出願：特願2010 - 020456
特願2009 - 250257)

出願年月日：2010年10月29日
国内外の別：国内、外国

名称：抗がん剤の感受性の判定方法
発明者：谷川原祐介、鈴木小夜、生駒祐介
西牟田章戸、鈴木哲也、杉本伸二
権利者：学校法人慶應義塾、
株式会社ヤクルト本社

種類：特許
番号：PCT/JP2010/69363
(基礎出願：特願2010 - 020457
特願2009 - 250259)

出願年月日：2010年10月29日
国内外の別：国内、外国

取得状況(計 1 件)

名称：抗がん剤感受性の判定方法
発明者：谷川原祐介、鈴木小夜、杉本伸二
権利者：学校法人慶應義塾、
株式会社ヤクルト本社

種類：特許
番号：2010/05157
取得年月日：2011年9月28日
国内外の別：外国

〔その他〕

無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 小夜 (SUZUKI SAYO)
慶應義塾大学・薬学部・講師
研究者番号：90424134

(2)研究分担者

谷川原 祐介 (TANIGAWARA YUSUKE)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：30179832

(H21 22 : 連携研究者)