

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390037

研究課題名(和文) 抗がん剤反応性のプロテオーム・メタボローム解析に基づく個別化投薬の新戦略

研究課題名(英文) Proteomic and metabolomic analysis on chemo-sensitivity and resistance of cancer towards personalized medicine

研究代表者

谷川原 祐介 (Tanigawara, Yusuke)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：30179832

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円、(間接経費) 4,290,000円

研究成果の概要(和文)：抗がん剤の効果にみられる個人差はがん治療における大きな課題のひとつである。本研究は、タンパク質を介する応答を分析するプロテオーム解析と細胞内代謝を介する応答を分析するメタボローム解析という最新手法を用いて、癌に対する化学療法薬の作用機序と耐性メカニズムの解明を目的とした。薬理作用と耐性に関する細胞内応答解析によって、抗がん剤反応性の個人差(有効または無効)を予測するバイオマーカー分子を複数見出し、個別化投薬へ展開するための基礎的知見を得た。

研究成果の概要(英文)：Inter-patient variability in the efficacy of cancer pharmacotherapy is one of the most difficult obstacles to improve cancer therapy. The present research investigated cellular mechanisms of pharmacological action of chemotherapeutic agents and resistant mechanisms of cancer against the drug action. The methods we used were the latest proteomic and metabolomic analyses which measured intracellular expression of abundant proteins and metabolites. Based on comprehensive metabolomic fingerprints and protein expression analysis, we have discovered several new proteins and metabolites that are related to the chemo-sensitivity or drug resistance of cancer. These findings are expected to lead to develop a new personalized cancer pharmacotherapy.

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：抗がん剤 薬剤反応性 プロテオーム メタボローム オーダーメイド医療

1. 研究開始当初の背景

(1) がん治療の有効率が向上しない要因のひとつは、がんの多様性にある。例えば、がん死亡数第3位を占める大腸癌の標準一次治療としてFOLFOX療法とFOLFIRI療法が共に生存期間20か月、奏効率50%を示すものの、個々のがん患者でどちらの治療法により良く反応するかを予測する手だてはなく、実際に治療を行ってみるまで結果は分からない。それ故、個々の患者にとって有効な薬剤を選択できるように、薬剤投与前に各個人の反応性(レスポンドー・ノンレスポンドー)を判別する手法が臨床現場で渴望されている。

(2) 抗がん剤反応性予測をめざした研究はゲノム、トランスクリプトームからの研究が数多くなされてきたが、癌細胞の抗がん剤に対する反応性(抗腫瘍効果)を遺伝子情報だけで予測することは難しく、薬効発現の実体といえるタンパク質あるいは代謝応答レベルでの作用機序解明が必要である。

(3) そこで本研究は、ゲノム、トランスクリプトームに加えて、タンパク質の発現および機能(プロテオーム)と細胞内代謝の動的変化(メタボローム)を網羅的に解析することにより、癌細胞の抗がん剤に対する応答反応をポストゲノム過程でダイナミックに捉え、抗腫瘍効果を予測しうるバイオマーカー候補物質を探索することをめざした。

2. 研究の目的

抗がん剤に対する癌細胞の応答反応について、タンパク質発現・機能を研究する“プロテオーム解析”と細胞内全代謝物質を一斉分析する“メタボローム解析”により、抗がん剤反応性の個体差(レスポンドーとノンレスポンドーの区別)を予測しうるバイオマーカー候補物質を見出し、個別化投薬へ展開する。具体的には下記の3点について研究する。

- (1) ヒト癌細胞における薬物応答のプロテオーム解析により、抗がん剤曝露に反応して発現変動するタンパク質を見い出す。
- (2) ヒト癌細胞における薬剤応答のメタボローム解析により、抗がん剤曝露に反応する代謝経路と主要代謝物を見い出す。
- (3) 上記の基礎研究で見出した知見を、臨床検体へ応用するための基盤技術となる解析手法を開発する。

3. 研究の方法

(1) 研究対象とした抗がん剤

大腸癌の標準治療法 FOLFOX で用いられるオキサリプラチン(L-OHP)と 5-フルオロウラシル(5-FU)

膵癌治療の標準治療薬ゲムシタピン(GEM)

白血病の治療薬シタラビン(Ara-C)

(2) 研究材料

ヒト大腸癌由来培養細胞：抗がん剤感受性の異なる 12 種類の培養細胞株とその薬剤耐性株 (COLO201、COLO205、COLO320、DLD-1、HCT-15、HT-29、WiDR、SW480、SW620、SW1116、LS174T、LOVO)

ヒト膵癌由来培養細胞：抗がん剤感受性の異なる培養細胞株 (MiaPaCa-2、AsPC-1) とその薬剤耐性株

ヒト白血病由来培養細胞：Jurkat、CCRF-CEM

(3) 癌細胞の薬剤応答と感受性試験

ヒト大腸癌細胞株に関してはオキサリプラチンあるいは 5-FU への感受性を調べ、ヒト膵癌細胞株と白血病細胞に関してはゲムシタピンとシタラビンの感受性を調べた。抗がん剤曝露濃度・曝露時間を変えた条件下で実験を行い、薬剤応答の濃度依存性と時間依存性を検討した。各癌細胞の抗がん剤感受性は MTS アッセイ法により評価した。

(4) プロテオーム解析

Surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (SELDI-TOF MS)法により癌細胞のタンパク質発現プロファイルを網羅的に解析した。IMAC30(金属イオンチップ)、CM10(カチオン交換チップ)、Q10(アニオン交換チップ)の3種類のプロテインチップを使用し、質量範囲 m/z 1,000~70,000 のタンパク質を測定した。抗がん剤に感受性と耐性の癌細胞間のタンパク質発現パターンを比較し、Expression Difference Mapping 法および 2次元電気泳動により特徴的なタンパク質ピークを絞り込んだ。

候補タンパク質ピークをカラム精製と 2次元電気泳動により単離して、質量分析法によりペプチド断片のアミノ酸配列を決定し、タンパク質を同定した。

(5) 新規に発見したタンパク質の機能解析

上記(4)によって見出したバイオマーカー候補タンパク質について、癌細胞内での発現変化と抗がん剤応答機能との関連解析を行った。まず、siRNA により標的タンパク質をノックダウンしたときの薬剤感受性の変化および関連するタンパク質の発現パターンを解析した。さらに、癌細胞にバイオマーカー候補タンパク質遺伝子を導入して強制発現させたときの抗がん剤感受性の変化を解析した。

(6) メタボローム解析

ヒト大腸癌細胞、ヒト膵癌細胞、ヒト白血病細胞に対する抗がん剤曝露前後における癌細胞内の代謝応答をメタボローム解析し、作用発現に関わる主たる代謝経路および関与分子群を解析した。次に、抗がん剤感受性と耐性の癌細胞間で約 500 成分のメタボローム

ム・プロファイルを比較し、薬剤応答と関連した挙動を示す代謝物質を探索した。

実験では、癌細胞に抗がん剤曝露後、メタノール添加により酵素を失活させ、低分子代謝物質を抽出して測定試料とした。CE-TOFMSにより得られた代謝物質の動的変化をバイオインフォマティクス技術により解析し、抗がん剤曝露に反応して変化する特徴的な代謝物群を探索した。

(7) ヒト血液検体の分析法の確立

抗がん剤治療を受けた患者の血液検体を試料として、代謝物を一斉分析するための分析手順を確立した。陽イオンモード、陰イオンモードそれぞれに関して、標準物質の選定、検量線濃度範囲の設定、検量線と Quality Control サンプルの頻度などを検討した。

4. 研究成果

本研究は、タンパク質発現を介する応答を研究するプロテオーム解析と細胞内代謝変動を介する応答を分析するメタボローム解析により、癌細胞内での抗がん薬作用と耐性メカニズムに關与するバイオマーカーを発見することを目的とした。国際的にも独創性の高いプロテオーム/メタボロームによるパスウェイ解析を通じて、抗腫瘍作用と薬剤耐性の個体差(レスポナー/ノンレスポナー)を予測しうるバイオマーカー分子を複数見出した。この成果は臨床における個別化投薬法へ展開するための基礎的知見と言える。新たに発見した薬剤バイオマーカーは世界的にも新しい発見であるため、国内のみならず米国および欧州における特許として産業財産権を取得し、今後の実用化に向けて準備は整いつつある。

(1) 抗がん剤応答タンパク質のプロテオーム解析

オキサリプラチンに対する感受性の異なる複数のヒト大腸癌細胞を用い、感受性株と耐性株とで発現の異なるタンパク質を探索した。二次元電気泳動、SELDI-TOF MS による発現パターンの比較から発現の異なる特徴的なタンパク質を複数見出し、質量分析装置で同定した。ウェスタンブロットングにより新規に発見したタンパク質の発現量と薬剤反応性との関係を確認した。

そのなかで、ヒト大腸癌細胞のオキサリプラチン感受性と強く相関する S100A10 タンパク質については発現量と機能との関係を解析した。S100A10 遺伝子導入による強制発現によって癌細胞の薬剤耐性は有意に上昇した。一方、S100A10 タンパク質および mRNA 発現量は結合パートナーである annexin A2 発現量と相関することを見出した。siRNA により annexin A2 をノックダウンすることにより S100A10 タンパク質の発現量は著しく減少したことから annexin A2 は S100A10 の細胞

内安定性に影響すると考えられた。S100A10 発現量は 5-FU 感受性とは相関せず、オキサリプラチンあるいはプラチナ系抗がん薬に特徴的なバイオマーカーと考えられた。

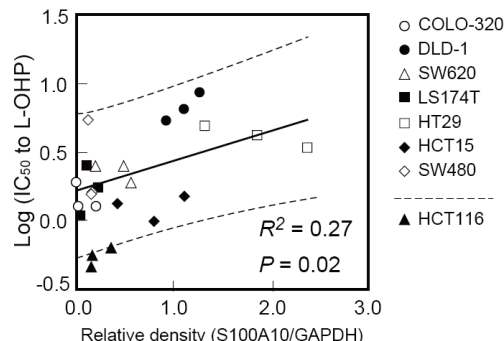


図1. ヒト大腸癌細胞株における S100A10 タンパク質の発現量とオキサリプラチン (L-OHP) に対する感受性の相関

(2) ヒト大腸癌細胞の薬剤応答に関するメタボローム解析

ヒト大腸癌細胞 DLD1 とその 5-FU 耐性株を用い、5-FU 曝露後に細胞内で生成する活性代謝物と内因性ピリミジン代謝動態をメタボローム解析した。その結果、耐性株は 5-FU のリン酸化活性が低く、活性代謝物 FdUMP と FUTP の生成が著しく低いいため、TS 障害や RNA 合成阻害能が不十分になることが薬剤耐性の一因であると解明した。加えて、耐性株では酸化型グルタチオンの上昇により酸化ストレスへの抵抗力が強いと推察された。

一方、ノンターゲット網羅的解析手法により、ヒト大腸癌細胞にオキサリプラチンを添加したときの細胞内代謝応答を検討した。その結果、薬剤感受性癌において代謝が大きく変動し、とくにポリアミン代謝、グルタチオン代謝、核酸代謝の亢進を見出した。これらは薬剤応答を反映するバイオマーカーとなる可能性が考えられた。

(3) ヒト膵癌細胞の薬剤応答に関するメタボローム解析

ヒト膵癌細胞 Miapacac-2 を用いてゲムシタピン曝露後の細胞内代謝応答を調べた。その結果、ゲムシタピンは速やかに三リン酸化体まで代謝が進み、CTP 合成酵素とリボヌクレオチド還元酵素を阻害することを解明した。さらに、核酸代謝阻害に対する細胞応答として解糖系および TCA サイクル活性の上昇を見出した。

次に、MiaPaCa-2 のゲムシタピン耐性株を用い、ゲムシタピン曝露後に細胞内で生成する活性代謝物と内因性ピリミジン代謝動態をメタボローム解析した。その結果、リン酸化体 (dFdCMP, dFdCDP, dFdCTP) への活性化反応は耐性株で著明に低下し、内因性核酸代謝に対する阻害作用も小さかった。これらの結果より、耐性株では CTP 合成酵素やリボヌク

レオチド還元酵素の阻害が効かないことが判明した。

(4) ヒト白血病細胞に対する核酸代謝拮抗薬の作用

ヒト白血病細胞 (Jurkat, CCRF-CEM) にゲムシタピンあるいはシタラピンを曝露後、ともに三リン酸化体が速やかに生成されたが、前者は内因性核酸代謝を著しく阻害したのに対し後者はほとんど影響を及ぼさなかった。同じく核酸代謝拮抗薬とされる両薬剤の作用機序の違いをメタボローム解析で明らかにした。

(5) ヒト血液検体の分析法の確立

CE-TOFMS 法により、ヒト血液中の代謝物を一斉分析する方法を開発した。陽イオンモード、陰イオンモードそれぞれに関して、測定条件の検討、内部標準物質の選定、定量下限、定量性を示す範囲、再現性、S/N比などを検討し、標準分析手順と Quality Control の手順を設定した。FOLFOX 治療を受けた大腸癌患者の血液検体を用いて、代謝物質の分析性能を確認した。

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 23 件)

Suzuki S, Tanigawara Y, Forced expression of S100A10 reduces sensitivity to oxaliplatin in colorectal cancer cells, *Proteome Science*, 査読あり, 2014, 12:26.

DOI: 10.1186/1477-5956-12-26

Hirasawa A, Zama T, Akahane T, Nomura H, Kataoka F, Saito K, Okubo K, Tominaga E, Makita K, Susumu N, Kosaki K, Tanigawara Y, Aoki D. Polymorphisms in the UGT1A1 gene predict adverse effects of irinotecan in the treatment of gynecologic cancer in Japanese patients. *J Hum Genet*. 査読あり, 2013 58(12): 794-8.

DOI: 10.1038/jhg.2013.105.

Kim HR, Park HS, Kwon WS, Lee JH, Tanigawara Y, Lim SM, Kim HS, Shin SJ, Ahn JB, Rha SY. Pharmacogenetic determinants associated with sunitinib-induced toxicity and ethnic difference in Korean metastatic renal cell carcinoma patients. *Cancer Chemother Pharmacol*. 査読あり, 2013 72(4): 825-35.

DOI: 10.1007/s00280-013-2258-y.

Kiyotani K, Mushiroda T, Tsunoda T, Morizono T, Hosono N, Kubo M, Tanigawara Y, Imamura CK, Flockhart DA, Aki F, Hirata K, Takatsuka Y, Okazaki

M, Ohsumi S, Yamakawa T, Sasa M, Nakamura Y, Zembutsu H. A genome-wide association study identifies locus at 10q22 associated with clinical outcomes of adjuvant tamoxifen therapy for breast cancer patients in Japanese. *Hum Mol Genet*. 査読あり, 2012 21(7): 1665-72.

DOI: 10.1093/hmg/ddr597.

Kiyotani K, Mushiroda T, Imamura CK, Tanigawara Y, Hosono N, Kubo M, Sasa M, Nakamura Y, Zembutsu H. Dose-adjustment study of tamoxifen based on CYP2D6 genotypes in Japanese breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*. 査読あり, 2012, 131(1): 137-45.

DOI: 10.1007/s10549-011-1777-7.

Hirasawa A, Akahane T, Tanigawara Y, Aoki D, Blood-direct InvaderPlus as a new method for genetic testing. *Personalized Medicine*, 査読あり, 2012, 9: 657-663.

DOI: 10.2217/pme.12.71

Suzuki S, Yamayoshi Y, Nishimuta A, Tanigawara Y, S100A10 protein expression is associated with oxaliplatin sensitivity in human colorectal cancer cells. *Proteome Science*, 査読あり, 2011. 9:76

DOI: 10.1186/1477-5956-9-76

[学会発表](計 20 件)

Tanigawara Y, Pharmacogenomics-based personalized dosing of tamoxifen: Solution for controversy, 第 72 回日本癌学会学術総会(招待講演) 2013 年 10 月 4 日, 横浜

藤原裕、西牟田章戸、川島知憲、谷川原祐介, ヒト大腸がん細胞における 5-FU 耐性のメタボローム解析, 第 72 回日本癌学会学術総会, 2013 年 10 月 3 日, 横浜

森本洋輔、西 弘二、川島知憲、谷川原祐介, ヒト膵臓細胞におけるゲムシタピン耐性のメタボローム解析, 第 72 回日本癌学会学術総会, 2013 年 10 月 3 日, 横浜

Tanigawara Y, Cancer biomarkers in diagnostics and pharmacotherapy, FIP (International Pharmaceutical Federation) (招待講演), 2013 年 9 月 3 日, Dublin, Ireland

谷川原祐介, がん薬物療法の個別化に向けた PK/PD と統合オミックス研究, 第 50 回薬剤学懇談会研究討論会 2013 年 6 月 26 日, 札幌

谷川原祐介, TDM のサイエンスとプラクティス, 第 30 回日本 TDM 学会・学術大会(特別講演), 2013 年 5 月 26 日, 熊本

津崎盾哉、西牟田章戸、谷川原祐介, メタボローム解析によるヒト大腸癌細胞の 5-FU+

オキサリプラチンに対する応答機構の解明，第 10 回日本臨床腫瘍学会学術集会，2012 年 7 月 27 日，大阪

Tanigawara Y , Pharmaco-metabolomics for anticancer drugs , 第 10 回日本臨床腫瘍学会学術集会，2012 年 7 月 26 日，大阪

Tanigawara Y , Pharmaco-metabolomics of anticancer drugs , 10th International Conference of the Asian Clinical Oncology Society , 2012 年 6 月 14 日，Seoul , Korea

Tanigawara Y , Pharmacogenomics , 第 49 回日本癌治療学会学術集会(招待講演) , 2011 年 11 月 28 日，名古屋

Tanigawara Y , Post-genome proteomic and metabolomic analyses for pharmacological responses to anticancer agents , 第 49 回日本癌治療学会学術集会(招待講演) , 2011 年 11 月 27 日，名古屋

Tanigawara Y , Cancer metabolomics by MS technology , 12th International Congress of Therapeutic Drug Monitoring & Clinical Toxicology (Plenary Lecture) , 2011 年 11 月 6 日，Stuttgart , Germany

大谷勇紀、西牟田章戸、谷川原祐介，メタボローム解析による大腸癌細胞のオキサリプラチン感受性因子の探索，第 9 回日本臨床腫瘍学会学術集会，2011 年 7 月 21 日，横浜

〔図書〕(計 8 件)

谷川原祐介，薬物動態・薬力学から見たがん個別化治療の現状と展望，日本臨床社，日本臨床 72 巻増刊号 2，2014，678-684.

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)

名称：抗がん剤感受性の判定マーカー
発明者：谷川原祐介、西牟田章戸、大谷勇紀、松尾光寿
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(PCT)
番号：PCT/JP2012/54633
出願年月日：2012 年 3 月 24 日
国内外の別：外国

名称：併用抗がん剤の感受性判定マーカー
発明者：谷川原祐介、西牟田章戸、津崎盾哉、高橋寛行
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(日本国)
番号：特願 2012-37448
出願年月日：2012 年 2 月 23 日
国内外の別：国内

取得状況(計 4 件)

名称：抗がん剤の感受性の判定方法

発明者：谷川原祐介、西牟田章戸、鈴木小夜、鈴木哲也、生駒祐介、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(米国)
番号：US patent 13/504985
取得年月日：2014 年 3 月 24 日
国内外の別：外国

名称：抗がん剤感受性判定マーカー
発明者：谷川原祐介、渡辺光博、有田恵理、西牟田章戸、山吉康子、松崎 健、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(欧州)
番号：European patent No. 2237042
取得年月日：2014 年 3 月 12 日
国内外の別：外国

名称：抗がん剤感受性判定マーカー
発明者：谷川原祐介、渡辺光博、有田恵理、西牟田章戸、山吉康子、松崎 健、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(日本国)
番号：特許第 5461200 号
取得年月日：2014 年 1 月 24 日
国内外の別：国内

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(日本国)
番号：特許第 5461201 号
取得年月日：2014 年 1 月 24 日
国内外の別：国内

〔その他〕
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷川原 祐介 (Yusuke Tanigawara)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号：30179832

(2) 研究分担者

西 弘二 (Koji Nishi)
慶應義塾大学・医学部・特任講師
研究者番号：00398249

西牟田 章戸 (Akito Nishimuta)
慶應義塾大学・医学部・特任助教
研究者番号：00424135