

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591970

研究課題名(和文) HSP27を標的とした新しい大腸癌治療法の開発

研究課題名(英文) Development of new therapy targeting HSP27 in colorectal cancer

研究代表者

石井 良幸 (ISHII, YOSHIYUKI)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：30255468

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：HSP27発現が高い大腸癌細胞株では5-FU感受性は低く、またHSP27発現抑制により5-FU感受性は増強した。さらに、リン酸化阻害によるHSP27機能抑制によっても5-FU感受性は増強した。同様にCPT-11/I-OHPの感受性はHSP27発現レベルと逆相関した。また、抗EGF-R抗体薬はHSP27発現またリン酸化を抑制し、CPT-11の感受性を増強した。治癒切除大腸癌症例の術後補助化学療法群では、HSP27低発現群では高発現群に比較し無再発生存率は有意に良好であった。

以上より、HSP27は大腸癌における抗癌剤の感受性バイオマーカーであるとともに、新たな治療標的になり得ると考えられる。

研究成果の概要(英文)：High levels of heat shock protein 27 (HSP27) expression in colon cancer cell lines were associated with low 5-fluorouracil (5-FU) sensitivity. The suppression of HSP27 expression promoted 5-FU sensitivity in colon cancer cell lines in vitro and in vivo. Furthermore, the inhibition of HSP27 phosphorylation by a selective inhibitor promotes 5-FU sensitivity in colorectal cancer cell lines. Similarly, CPT-11 and I-OHP sensitivities were also associated with the expression levels of HSP27. Anti-EGF-R antibody drugs promoted CPT-11 sensitivity by suppressing the expression and the phosphorylation of HSP27. In an adjuvant chemotherapy group who underwent curative resection of colorectal cancer, the cases with low expression of HSP27 had better rate of relapse free survival than those with high expression of HSP27. In conclusion, HSP27 may be a biomarker for sensitivity of anti-cancer drugs and new treatment in colorectal cancer.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：Heat shock protein 27 Colorectal cancer Biomarker Drug sensitivity

1. 研究開始当初の背景

大腸癌に対する集学的治療法は新たな抗癌剤の開発とともに近年飛躍的進歩を見せてきた。国内では2003年12月にそれまでは適応のなかった TS-1 が大腸癌で認可され、2005年4月には新たに I-OHP が認可された。さらに、2007年には VEGF に対する分子標的治療薬 bevacizumab が、2008年および2010年には EGF-R に対する分子標的治療薬 cetuximab, panitumumab が相次いで認可され、抗癌剤と分子標的治療薬を併用した多剤併用療法が行われるようになり、治療成績は飛躍的に向上した。抗癌剤および分子標的治療薬の組み合わせ、また投与方法は多岐にわたるが、依然としてその中心に位置する薬剤は 5-FU である。実際、bevacizumab や cetuximab, panitumumab などの分子標的治療薬の単剤での効果はこれまでの抗癌剤のそれと大差はなかったが、5-FU を含めた抗癌剤との併用により極めて良好な成績が報告された。しかし、すべての癌が 5-FU に対して高い感受性を示すわけではなく、抵抗性を示すものや治療の中で耐性を獲得する場合もある。一方で治療法の多様化は、個々にあった治療法を選択するテーラーメイド治療という社会の流れに則している。そのような中で抗癌剤の感受性を予測し、また耐性に寄与する因子を抑制することでその感受性を上げることが重要なテーマといえる。実際、これまでに 5-FU 耐性ヒト腫瘍細胞株の遺伝子発現解析から、5-FU 感受性と相関の認められた分子がいくつか報告されており、その中のひとつが HSP27 であった (文献 1)。HSP27 は低分子のシャペロン蛋白であり、種々のストレスに対応して産生され細胞を防御する作用する機能を持つ。さらに、その発現レベルがストレスに対する抵抗性と関連性があると考えられている。そこでわれわれはこの HSP27 に着目し、5-FU 感受性予測因子としての臨床応用の可能性について検討した。6 種類のヒト大腸癌細胞株 (LoVo、HCT15、WiDr、HCT116、HT-29、SW480) において HSP27 蛋白の発現を検討し、MTT 法を用いて薬剤 (5-FU) 48 時間連続暴露により細胞増殖抑制率が 50% となる 5-FU の濃度 (IC₅₀) を求め、それらの相関を検討したところ有意な逆相関を認めた。さらに、HSP27 低発現株である LoVo に HSP27 を導入し、HSP27 タンパクの産生を上げると 5-FU の耐性も増強されることが明らかとなり、HSP27 発現と 5-FU の耐性とに強い関連性が示唆された。つぎに、HSP27 を標的分子とする遺伝子治療の基礎的実験として特異的に HSP27 の発現を抑制する siRNA を設計し、これを HSP27 高発現株である HCT15 に導入して 5-FU 耐性の変化を検討した。結果、予想通り 5-FU 耐性は HSP27 発現量と相関し、HSP27 タンパクの産生を抑制すると 5-FU の耐性を改善することが明らかとなった (文献 2)。すなわち、HSP27siRNA による HSP27 発現の抑制が 5-FU 耐性を克服できるというこれまでにない画

期的な遺伝子治療への道が開かれた。

また、われわれは Drug Delivery System (DDS) として、リン脂質極性基を有し優れた血液適合性を有する MPC と MBA との水溶性共重合体 (PMB30W) であり水溶性と疎水性物質を安定的に内包することが出来る MPC ポリマーに着目し、これまでに MPC ポリマーを用いた DDS の有用性を数多く報告してきた。その 1 つとして、EGF を結合させた MPC ポリマーを作製し PTX を封入し、EGF 受容体が過剰発現しているヒト癌細胞に添加すると低濃度でも濃度依存的な殺細胞効果が認められたことを報告した (文献 3)。それ以外にも、MPC ポリマーと遺伝子に結合可能な Cation unit である N,N-dimethylaminoethyl methacrylate (DMAEMA) と、蛋白質の NH₂ 基とエステル結合し特異性を持たせることを可能にさせる p-nitrophenylcarbonyloxyethyl methacrylate (NPMA) とが polymer 結合した化合物 (poly MPC-co-DMAEMA-co-NPMA (PMDN)) を Vector の骨格として用いることで組織に特異的に遺伝子の導入が可能なることを明らかにした。今回、上記 PMDN に組織特異性を保持させる抗 EGFR 抗体を結合させ、さらに遺伝子として HSP27siRNA を組み込んだ plasmid を設計し組み込み、これを大腸癌に対する新たな治療法として確立することを目指した。

また、HSP27 は ser15 と ser78、ser82 がリン酸化されることによりその機能が活性化されることが知られており、それら Ser 残基のリン酸化酵素に対する特異的リン酸化酵素阻害剤を用いてリン酸化を阻害し、HSP27 を機能的に阻害することで抗癌剤 (5-FU) に対する耐性が減じる可能性がある。本手法は、特異的リン酸化酵素である基質と抗癌剤の投与というより簡便な手法により治療効果を上げることが出来る可能性があり、実験的にその効果が証明され、副作用の問題のみ解決できれば新しい大腸癌治療法として速やかな臨床応用が可能と考える。また、大腸癌の 5-FU 耐性に関与すると考えられる HSP27 発現と機能が、他の大腸癌の主要抗癌剤 (CPT-11: イリノテカンおよび I-OHP: オキサリプラチン) の耐性に関与する可能性についても同様の検討を行い、HSP27 と多剤耐性との関連を明らかにし、HSP27 を標的とした大腸癌に対する新たな治療法の確立を目指した。

文献:

- (1) Screening of differentially expressed genes in 5-fluorouracil-resistant human gastrointestinal tumor cells. Takechi T, Koizumi K, Tujimoto H, Fukushima M. Jpn J Cancer Res 2001;92:696-703.
- (2) Heat shock protein 27, a novel regulator of 5-fluorouracil resistance in colon cancer. Tsuruta M, Nishibori H, Hasegawa H, Ishii Y, Endo T, Kubota T,

Kitajima M, Kitagawa Y. Oncol Rep 2008;20:1165-1172.

(3) Development of targeted therapy with paclitaxel incorporated into EGF - conjugated nanoparticles. Shimada T, Ueda M, Jinno H, Chiba N, Wada M, Watanabe J, Ishihara K, Kitagawa Y. Anticancer Res 2009;29:1009-1014.

2. 研究の目的

われわれは、これまでの基礎的実験において大腸癌における 5-FU の薬剤耐性と Heat Shock Protein 27 (HSP27) の発現との間に強い相関があることを明らかにした。さらに RNA 干渉により HSP27 蛋白発現を抑制すると 5-FU 耐性を減じることができることも *in vitro* および *in vivo* で確認した(文献 1)。これを踏まえて、5-FU 以外の抗癌剤耐性と HSP27 発現との関連について明らかにすること、さらに HSP27 の発現および機能抑制と抗癌剤 (5-FU) の併用による新たな大腸癌治療法を開発することを目的とした。すなわち、(1) HSP27 の蛋白発現阻害として抗 EGFR 抗体を結合させた PMDN というポリマーに HSP27 siRNA を内包させて Drug Delivery System により標的大腸癌に集積させ(文献 2)、HSP27 の発現を抑制し抗癌剤 (5-FU) の耐性を阻害、(2) HSP27 の機能活性型であるリン酸化 HSP27 を特異的リン酸化酵素阻害剤の投与によりリン酸化阻害し、機能的に抑制して抗癌剤 (5-FU) の耐性を阻害、(3) 大腸癌に対する他抗癌剤 (イリノテカン、エルプラット) 耐性における HSP27 発現と機能的解析を行い、新たな分子標的治療法を確立することを目的とした。

文献：

(1) Heat shock protein 27, a novel regulator of 5-fluorouracil resistance in colon cancer. Tsuruta M, Nishibori H, Hasegawa H, Ishii Y, Endo T, Kubota T, Kitajima M, Kitagawa Y. Oncol Rep 2008;20:1165-1172.

(2) Development of targeted therapy with paclitaxel incorporated into EGF - conjugated nanoparticles. Shimada T, Ueda M, Jinno H, Chiba N, Wada M, Watanabe J, Ishihara K, Kitagawa Y. Anticancer Res 2009;29:1009-1014.

3. 研究の方法

(1) HSP27 発現抑制による 5-FU の抗腫瘍効果の検討

HSP27 高発現で 5-FU 低感受性のヒト大腸癌細胞株 HCT116 に HSP27 shRNA を導入し、stable knock down transfectants を作成する。*In vitro*において、stable clones の HSP27 蛋白発現 (western blotting 法により解析) の抑制程度と 5-FU 感受性 (MTT 法による IC50 の算定) との相関を確認し、*in vivo* におい

て HSP27 shRNA 導入 stable clones を用いたヌードマウス皮下移植モデルを作成し、5-FU 感受性と HSP27 蛋白発現との相関を検証する。*In vivo*における HSP27 蛋白発現は、Western blotting 法および免疫組織化学染色法により確認し、5-FU 感受性は腫瘍縮小率より算定する。

(2) HSP27 発現亢進による 5-FU 耐性獲得の検討

HSP27 低発現であり、5-FU 高感受性であるヒト大腸癌細胞株 HT29 に HSP27 plasmid を導入し、stable expression transfectants を作成する。上記と同様に *in vitro* および *in vivo*において、HSP27 蛋白発現と 5-FU 感受性との関連を検討する。

(3) GFP 組み込み HSP27 siRNA plasmid 封入抗 EGFR 抗体結合の PMDN complex の作成と特異性の検討

PMDN に抗 EGFR 抗体を混合し攪拌する。その後、遊離パラニトロフェノールを透析膜により濾過し、重量比 1:2 で HSP27 siRNA plasmid と抗 EGFR 抗体結合 PMDN を混合し攪拌する。化合物生成の確認は SDS-page、EtBr 染色による電気泳動や光散乱分析にて行う。上記 PMDN complex を各種ヒト大腸癌細胞株 (EGFR 高発現) に *in vitro*で添加し、それぞれの細胞を蛍光顕微鏡にて観察し組織移行性を確認する。Negative control として scramble siRNA plasmid 封入抗 EGFR 抗体結合 PMDN complex を作製し、これと比較して上記 PMDN complex の大腸癌細胞株 (HCT116) における HSP27 蛋白の発現レベルと 5-FU 耐性に対する抑制効果を *in vitro*で検証する。

(4) 他抗癌剤 (CPT-11 および I-OHP) 感受性と HSP27 発現との関連の検討

各種ヒト大腸癌細胞株 (HT29, SW480, SW620, RKO, SW1116, T84, WiDr, HCT-116, HCT-15, LoVo, DLD-1, Colo201, Colo205) における CPT-11 と I-OHP の感受性を MTT 法により IC50 で評価し、HSP27 蛋白発現 (western blotting 法により解析) と比較検討する。また、(1)および(2)で作成した HSP27 stable knock down transfectant および stable expression transfectant モデルを用いて CPT-11 と I-OHP の感受性を同様に評価し、HSP27 蛋白発現との関連について検証する。

(5) 5-FU 感受性と phosphorylated HSP27 (p-HSP27) 発現との関連

各種ヒト大腸癌細胞株 (HT29, SW480, SW620, RKO, SW1116, T84, WiDr, HCT-116, HCT-15, LoVo, DLD-1, Colo201, Colo205) における 5-FU 暴露時および非暴露時における HSP27 蛋白発現変化および p-HSP27 (ser15, ser78, ser82) 発現変化 (抗リン酸化 HSP27 抗体を用いて western blotting 法で解析) と 5-FU 感受性 (IC50) との関連を検討する。また、同様に HSP27 stable knock down transfectant および stable expression transfectant モデルを用いて検討する。

(6) HSP27 リン酸化阻害による 5-FU 抗癌剤感受性変化の検討

5-FU 低感受性・HSP27 蛋白高発現大腸癌細胞株 (HCT116) とその HSP27 stable knock down transfectant モデルおよび HSP27 stable expression transfectant モデルを対象に、各種 HSP27 リン酸化酵素阻害剤 (SB203580, Go6983, GF109203, Rapamycin) を用いて HSP27 ser15, ser78, ser82 のリン酸化を阻害し、リン酸化抑制程度 (抗リン酸化 HSP27 抗体を用いて western blotting 法で解析) と 5-FU 感受性変化との関連を in vitro で検討する。In vitro で HSP27 のリン酸化程度と 5-FU 感受性が相関した場合、in vivo ノードマウス皮下移植モデルにおいて、HSP27 リン酸化酵素阻害剤を投与し 5-FU の抗腫瘍効果 (腫瘍縮小率) および腫瘍内 HSP27/p-HSP27 発現、最終腫瘍重量、推定腫瘍重量、生存期間、体重、各種臓器重量、病理組織像を control 群と比較検討する。

(7) 臨床検体における HSP27/p-HSP27 発現と抗癌剤感受性および予後の検討

抗癌剤治療を施行した大腸癌症例における HSP27/p-HSP27 発現をパラフィン包埋組織を用いて免疫組織化学染色により評価し、抗癌剤治療の奏効率および予後との関連について検討する。また、手術検体で抗癌剤感受性試験 (MTT 法) を行った症例において (当院では大腸癌の抗癌剤感受性試験が先進医療として承認されている)、新鮮凍結組織片における HSP27/p-HSP27 発現を western blotting 法または quantitative RT-PCR 法により評価し、感受性試験による感受性との関連について検討する。

4. 研究成果

HSP27 の発現および機能抑制による抗癌剤 (5-FU) 感受性亢進による新たな大腸癌治療法を開発すること、抗癌剤 (5-FU および CPT-11、I-OHP) 耐性と HSP27 との関連について明らかにすることを目的とし上述の研究方法に沿って実験を行い下記の成果を得た。

- (1) ヒト大腸癌細胞株を用いた基礎実験では、in vitro において HSP27 発現レベルと 5-FU 感受性は逆相関 (HSP27 高発現では 5-FU 低感受性) した。また、shRNA を用いた HSP27 発現抑制により in vitro および動物モデルにおいて 5-FU 感受性は増強した。
- (2) ヒト大腸癌細胞株を用いた特異的リン酸化酵素阻害剤 (SB203580) の暴露により HSP27 のリン酸化は阻害され、この HSP27 機能抑制によっても 5-FU 感受性は増強した。
- (3) 同様にヒト大腸癌細胞株を用いた基礎実験において、HSP27 発現レベルと CPT-11 および I-OHP 感受性は逆相関した (HSP27 高発現では CPT-11 / I-OHP 低感受性)。
- (4) また、大腸癌に対する抗 EGF-R 抗体薬 (cetuximab) は、JAK/STAT 系シグナル

伝達を抑制することで HSP27 の発現またリン酸化を抑制し、CPT-11 の感受性を相乗的に増強した。

- (5) 治癒切除大腸癌症例 (Stage II/III) において HSP27 発現と予後との解析を行った。手術単独群では、HSP27 発現に関わらず術後の無再発生存率に差を認めなかったが、術後補助化学療法群では、HSP27 低発現群では高発現群に比較し無再発生存率は有意に良好であった。

当初の研究方法に示す (2), (3) の項目については、標的大腸癌細胞株 (HSP27 低発現細胞株) への HSP27 遺伝子導入株の確立ができなかったこと、また HSP27 siRNA plasmid 封入抗 EGFR 抗体結合 PMDN の確立ができなかったことより成果が得られていない。代わりに大腸癌に対する抗 EGF-R 抗体薬 (cetuximab) の作用機序に、HSP27 が関与する可能性が示された。

以上より、大腸癌における HSP27 発現は、抗癌剤感受性のバイオマーカーであるとともに、その抑制により抗癌剤耐性が緩和される可能性があり、新たな治療標的になり得ると考えられる。今後は、他化学療法薬における HSP27 の機能的解析を進めるとともに、新たな大腸癌治療として、HSP27 を標的とした遺伝子治療 (発現抑制)、drug delivery system による腫瘍特異的治療、HSP27 機能抑制 (リン酸化阻害) による治療の開発を目指すことは有意義であると考えている。

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 2 件)

- (1) Matsunaga A, Ishii Y, Tsuruta M, Okabayashi K, Hasegawa H, Kitagawa Y: Inhibition of heat shock protein 27 phosphorylation promotes sensitivity to 5-fluorouracil in colorectal cancer cells. *Oncology Letters*, 査読有り, 2014 in press.
- (2) Hayashi R, Ishii Y, Ochiai H, Matsunaga A, Endo T, Hasegawa H, and Kitagawa Y: Suppression of heat shock protein 27 expression promotes 5-fluorouracil sensitivity in colon cancer cells in a xenograft model. *Oncology Reports*, 査読有り, 2012 Oct;28(4): 1269-1274. DOI: 10.3892 / or.2012.1935

[学会発表](計 3 件)

- (1) 石田隆, 石井良幸, 長谷川博俊, 遠藤高志, 岡林剛史, 瀬尾雄樹, 菊池弘人, 清島亮, 北川雄光. 大腸癌に対する分子標的治療薬 (抗 EGFR 抗体薬) の効果における Heat Shock Protein 27 の役割. 第 68 回の本消化器外科学会総会, 2013 年 7 月 17 日, 宮崎

(2) 石井良幸, 落合大樹, 松永篤志, 石田隆, 遠藤高志, 長谷川博俊, 北川雄光. 大腸癌におけるバイオマーカーおよび治療標的としての Heat Shock Protein 27. 第 67 回日本消化器外科学会総会, 2012 年 7 月 20 日, 富山.
(3) 松永篤志, 石井良幸, 長谷川博俊, 遠藤高志, 落合大樹, 星野大樹, 星野好則, 茂田浩平, 瀬尾雄樹, 星野剛, 北川雄光. 大腸癌における 5-fluorouracil 感受性の規定因子としての Heat shock protein 27 について, Heat shock protein 27 as a regulator of 5-fluorouracil sensitivity in colorectal cancer cells. 第 70 回日本癌学会学術総会, 2011 年 10 月 5 日, 名古屋.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石井 良幸 (ISHII YOSHIYUKI)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号: 30255468

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし