

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590208

研究課題名(和文) プロテオミクスにより見出した新規抗がん剤反応性予測タンパク質のバイオマーカー開発

研究課題名(英文) Development of new candidate, newly found out by proteomic approach, as a predictive biomarker for chemotherapy

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

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、研究代表者が大腸がん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った。その結果、ヒト大腸がん細胞株においてS100A10発現上昇はオキサリプラチン感受性を低下させ、大腸がん臨床組織検体においてはS100A10発現陰性の場合に比べてS100A10発現陽性である場合に腫瘍縮小効果が低い傾向が認められたことから、S100A10がオキサリプラチン感受性予測タンパク質となる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Predictive markers for chemotherapeutic response are urgently needed to improve the outcome of cancer treatment. Recently, our proteomics studies have demonstrated that intracellular S100A10 protein expression levels are significantly correlated with the sensitivity of CRC cells to L-OHP, but not 5-FU, providing a new candidate predictive marker for the response to L-OHP. In this study, we have demonstrated that alterations in S100A10 expression is involved in mediating chemosensitivity to L-OHP, by using forced expression of S100A10 in CRC cells, and pilot studies of immunohistochemistry of CRC tissue microarray for S100A10 have suggested that high expression of S100A10 is possibly associated with resistance to L-OHP. These results provide findings for S100A10 as a predictive marker of the response to chemotherapy including L-OHP.

研究分野：医歯薬学

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 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から、「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指標、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)の遺伝子多型(UGT1A1*6およびUGT1A1*28)、フルオロウラシルにおける 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、2009~2011年度基盤研究(C)の助成を受け、大腸がん治療の key drug であるオキサリプラチン(L-OHP)の薬剤感受性と相関して発現が変動する数種類の細胞内タンパク質を発見し、構造決定により、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 S100 calcium-binding protein A10(S100A10)であることを見出した。さらに、S100A10が抗がん剤の種類によって異なる挙動を示す特異的なマーカーになる可能性を

有すること、細胞外に分泌されることを明らかにし、ヒト血液中からも S100A10 と考えられる 11kDa タンパク質ピークを検出した。

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、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研究への展開、大腸がん以外のがん種でのバイオマーカーとしての可能性についての検討を行った。

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り見出した新規タンパク質マーカーの S100A10 抗がん剤反応性に関わる機能解析と臨床応用に向けた基礎的検討の展開、各種がん細胞を用いた大腸がん以外のがん種におけるバイオマーカーとしての可能性について検討する。

3. 研究の方法

(1) S100A10の抗がん剤反応性に関わる機能解析

ヒト大腸癌細胞株 COLO-320 を用いた S100A10 安定(過剰)発現株の作製と抗がん剤感受性の評価

S100A10 非発現ヒト大腸がん細胞 COLO-320 細胞について、HaloTag システムを用いて S100A10 安定(過剰)発現株を作製し、S100A10 発現量とオキサリプラチン(L-OHP)感受性および5-フルオロウラシル(5-FU)感受性の变化について検討した。

(2) S100A10のバイオマーカーとしての臨床応用に向けた検討

臨床保存血液検体での測定を目的とした S100A10 ELISA 測定系の作製

recombinant S100A10 を用いて免疫誘導を行い細胞融合候補マウスの選択を行なった後、細胞融合およびハイブリドーマ培養上清(候補抗体)のスクリーニングを行なった。native 抗原として8種類のヒト大腸がん細胞

胞株の cell lysate (COLO-320, HCT116, HT-29, LS174T, SW480, SW620)、negative control として Colo-320 cell lysate を用い、western blot 法、表面増強レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析 (SELDI-TOF MS) による分析結果との相関性にもとづき検証した。さらに、S100A10 以外の S100 ファミリータンパク質の recombinant タンパク質 (S100A1、S100A4、S100A6、S100A7、S100A8、S100A9、S100A11、S100A12、S100A14、S100A16、S100B、S100P) を用いて cross reactivity について検討し、サンドイッチ ELISA に用いる候補抗体を選択した。FDA ガイドライン Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation (2001) 等にもとづき、購入ヒト血清を用いて測定の特異性、測定感度、測定精度、再現性、確度、測定限界、検量線の定量限界 (定量下限、定量上限) など測定最適化条件の検討を行なった。

大腸がん臨床組織検体を用いた免疫組織染色による検討

性別、年齢、重症度や組織型、化学療法治療歴および予後等に関する情報を付帯している全 300 コア (= 300 症例) からなる大腸がん組織アレイ (Transgenic 社) について、S100A10 抗体および annexin A2 抗体を用いて免疫組織化学染色を行ない、S100A10 および annexin A2 のタンパク質発現量と予後 (腫瘍縮小効果) との関係について検討を行なった。染色結果の評価は病理医 2 名が行った。具体的には、がん細胞と判断したものについてスコアリングを行い、染色強度 Intensity Score (IS)、染色分布: Distribution Score (DS) の合計 (total score) を算出し、病理医 2 名の total score スコアの平均値で評価した。

(3) 大腸がん以外のがん種における S100A10 の挙動および薬剤感受性予測マーカーとしての可能性に関する検討

8 種類のヒトがん細胞株 (胆道がん細胞株 2 種類: HuH28、OCUG1、膵臓がん細胞株 2 種類: MIA Paca-2、SUIT-2、胃がん細胞株 2 種類: MKN45、MKN1、卵巣がん細胞株 2 種類 (親株およびそのシスプラチン耐性株): TYK-nu、TYK-nu.CPr) を用いて、L-OHP 感受性 (48 時間曝露後の IC₅₀ 値)、S100A10 および annexin A2 の遺伝子発現量を測定し、大腸がん以外のがん腫における S100A10 および annexin A2 発現と L-OHP 感受性との関係について検討した。

4. 研究成果

(1) S100A10 の抗がん剤反応性に関わる機能解析

ヒト大腸癌細胞株 COLO-320 を用いた S100A10 安定 (過剰) 発現株の作製と抗がん剤感受性の評価

S100A10 安定発現 COLO-320 細胞株における L-OHP 感受性 (IC₅₀ 値) は、親株及びコントロール (ベクターのみ導入) 株と比べて有意に低下した。一方、抗腫瘍メカニズムの異なる 5-FU 感受性に変化は認められなかった。この結果は、S100A10 発現量と L-OHP 感受性 (IC₅₀) は相関するものの、5-FU 感受性とは相関しないとする先行研究 (Suzuki et al., 2011) と一致するものであり、S100A10 は L-OHP 特異的にその感受性発揮に関わりを有する可能性が示された。

(2) S100A10 のバイオマーカーとしての臨床応用に向けた検討

臨床保存血液検体での測定を目的とした S100A10 ELISA 測定系の作製

S100A10 以外の S100 ファミリータンパク質との交差性を持たず、検出限界 50 pg/mL (希釈血清中)、定量下限 (LLoQ) 80 pg/mL (希釈血清中)、定量上限 (ULoQ) 10 ng/mL (希釈血清中) の、ビオチン標識抗体を用いた S100A10

測定のためのサンドイッチ ELISA 測定系を作製した。

大腸がん臨床組織検体を用いた免疫組織染色による検討

患者背景・予後情報および染色結果にもとづき最終的に評価可能なコア (S100A10 : 34 コア、annexin A2 : 33 コア) を用いて解析を行なった。その結果、S100A10 発現量および annexin A2 発現量と腫瘍縮小効果 (PR, SD, PD) との間に統計学的に有意な関連は認められなかったものの、S100A10 発現陰性の場合に比べて、S100A10 発現陽性である場合に腫瘍縮小効果が低い傾向が認められ、また腫瘍縮小効果が低いほど、S100A10 発現量が増強している傾向が認められた。

(3) 大腸がん以外のがん種における S100A10 の挙動および薬剤感受性予測マーカーとしての可能性に関する検討

胆道がん細胞株と卵巣がん細胞株では高感受性細胞よりも低感受性細胞における S100A10 遺伝子発現量が高い傾向が認められ、annexin A2 では、これらに加えて膵臓がん細胞株でも発現量が高い傾向が認められた。これにより、S100A10 および annexin A2 は胆道がん、卵巣がんにおいても L-OHP 感受性を反映する可能性が示唆された。

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, Tanigawara Y.

Forced expression of S100A10 reduces sensitivity to oxaliplatin in colorectal cancer cells.

Proteome Science 2014; 9: 76

DOI: 10.1186/1477-5956-9-76 (査読有り)

[図書](計 1 件)

鈴木小夜. “第 3 部 悪性腫瘍”.
Pharmacotherapy. 厚木、ネオメディカル、
(印刷中)

[産業財産権]

取得状況(計 3 件)

名称: 抗がん剤の感受性の判定方法
発明者: Yusuke Tanigawara, Sayo Suzuki,
Yusuke Ikoma, Akito Nishimuta, Tetsuya
Suzuki, Shinji Sugimoto
権利者: Keio University,
Kabushiki Kaisha Yakult Honsha
種類: 特許
番号: US8,765,713 B2
出願年月日: 2010 年 10 月 29 日
取得年月日: 2014 年 7 月 1 日
国内外の別: 国外

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: 5548693 号
出願年月日: 2010 年 10 月 29 日
取得年月日: 2014 年 5 月 23 日
国内外の別: 国内

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: 5548694 号
出願年月日: 2010 年 10 月 29 日
取得年月日: 2014 年 5 月 23 日
国内外の別: 国内

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

(3) 連携研究者

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