

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591917

研究課題名(和文)薬剤反応性タンパク質定量に基づく抗癌剤感受性試験

研究課題名(英文)Chemosensitivity test based on protein dynamics in response to anticancer drugs

## 研究代表者

肥田 圭介(Koeda, Keisuke)

岩手医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10285596

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、逆相タンパクアレイ(RPPA)を用いた微量検体からのタンパク質定量により、細胞生物学的判定に先立つタンパク質の量的変化から抗癌剤の感受性を推定しようと試みたものである。癌性腹膜炎細胞を使用予定であったが、十分量の検体を集積できず、研究全体としては培養細胞を用いた研究に重点を置く形となった。RPPAを使用した抗癌剤に対するタンパク質の量的変化に関する研究では、タンパク質の機能に関わらずタンパク質が群として分解・合成のタイミングを制御されていた。また、抗癌剤耐性として採取された細胞集団は、相互排他的に幹細胞性または上皮性のタンパクを発現していたが、抗癌剤とタンパク発現の関連は薄かった。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we used "reverse-phase" protein array (RPPA) for profiling extremely small cell populations. This RPPA technology provides information on protein dynamics that occur prior to changing the phenotype in response to anticancer drugs. In practice, we were unable to collect enough samples from patients with peritonitis carcinomatosa; thus our study had more focused on establishment of the technology using cell lines. With respect to protein dynamics, the cellular proteins formed clusters that were regulated to degrade in synchronous manner in response to anticancer drugs regardless of the protein function. Moreover, drug-resistant populations expressed either stem- or epithelial-markers in mutually-exclusive manner, which exhibited very weak relationships to the stress induced by drugs.

研究分野：消化器外科

キーワード：抗癌剤感受性

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 進行がんの効果的治療により予後が改善しえた例として、進行・再発胃癌に対しては1990年代後半よりirinotecan(CPT-11)、S-1、taxane系などの新規抗癌剤の開発により、腫瘍縮小効果の向上や生存期間の延長が報告されてきた。2007年のASCOにおいてSPIRITS trial (文献1)の結果が発表され、S-1+CDDP療法が本邦における標準治療と位置づけられた。一方、これらの標準治療を行っても依然として再発は認められることから、十分な治療方針の決定法を確立することは必須の課題であった。すべての癌患者に理論に基づく治療方針を提供することが求められている。

(2) 抗癌剤感受性試験は再発癌、高度進行癌、および原発不明癌など標準的治療が確立されていない病態に対して細胞アッセイに基づいた客観的データを基に治療方針の提案を行うことが多い。その中でも、癌性腹膜炎は癌の進展・再発形式としてしばしば見られる形態である。しかし癌性腹膜炎に対する画一的な治療法は確立されておらず、全身または腹腔内投与による姑息的化学療法が用いられることが多いが、その奏効率は依然として低いのが現状である。その理由の一つとして何等かの機序で薬剤耐性を獲得した癌細胞が治療の対象となっていることが推定された。

(3) 抗癌剤感受性試験は本来前述のごとく再発癌、高度進行癌、および原発不明癌などを対象に行うべきものである。しかしながら、体内と試験管内では感受性、薬剤運搬、増殖速度などが異なり、アッセイデータと臨床効果に乖離がみられることも稀ではなく、抗癌剤感受性試験そのものは治療方針にある種の提案をするという位置づけである。

(4) 本研究の提案は、先行研究から得られた「細胞内タンパク質の量的変動が表現型変化に先立って起こっている」という現象を利用できないかという考えから立案された。そのためには限られた臨床検体から多くのデータを得る必要がある。我々は独自に開発した逆相タンパクライセートアレイ(RPPA)を応用することでこのような制癌剤感受性試験における問題点の克服を目指して、本研究を立案した。

## 2. 研究の目的

抗癌剤感受性試験は、試験管内での抗癌剤による殺細胞効果を基にした細胞生物学的な判定により行われてきた。しかしながら、切除検体からの初代培養系による判定では培養可能な細胞数が少ない、判定時間までに十分な生細胞数が得られないなど無視しえない不確定要素が存在することが問題点として指摘されてきた。本研究では感受性判定基準を細胞増殖抑制の割合ではなく、それに先立つ細胞内タンパク質群の時間内変動を測定することにより感受性判定を行う方法を

確立するものであり、これまで指摘されてきた問題点を解決できる可能性を秘めていると考えた。方法論としては、独自に開発したRPPAを用いるほか、培養細胞を用いた基礎実験の充実にも重点を置いた。

## 3. 研究の方法

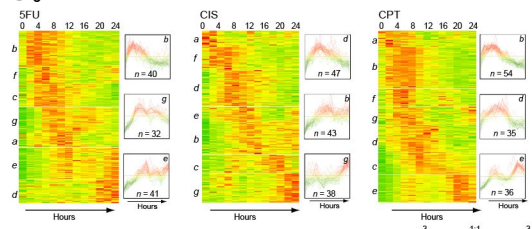
(1) 本研究の軸のひとつとなるのは、初代培養細胞から獲得する時系列サンプルと汎用細胞株からの薬剤耐性細胞集団のタンパク質レベルでの定量的プロファイリングである。腹水から得られた癌細胞が、抗癌剤の添加によりタンパク質レベルでどのような挙動を示すかを観察し、細胞シグナルのネットワーク推定から、抗癌剤感受性予測が可能か検証した。

(2) 抗癌剤添加に対応して癌細胞の表現型の変化にタンパク質量がどのように対応しているかは、多くのパラメータを必要とする。時系列データに関してはモデルケースとして大腸癌細胞株HCT116の24時間の時系列データを回収した。また、抗癌剤耐性細胞集団のプロファイルに関しては、HeLa、HCT116、MKN45、MCF7、およびHT29の各種細胞を用い比較検討を行った。

(3) 初代培養細胞はすでに確立されているフィコールを用いた細胞密度による方法で、腹水中の上皮細胞成分を単離する。上皮細胞は無血清培地で37度24時間培養し生存状態を確認しながら、細胞増殖アッセイを行い余剰細胞によりRPPAのライセートとして調製した。

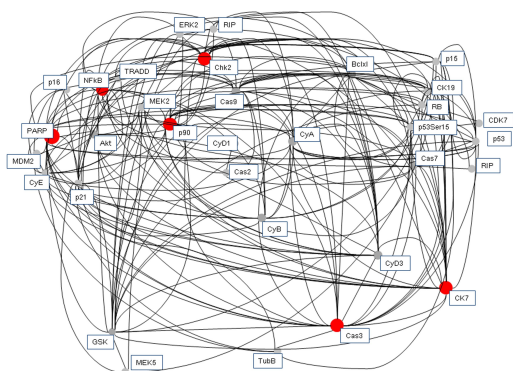
## 4. 研究成果

(1) HCT116を用いた抗癌剤反応では、conventionalな抗癌剤3種(5-FU、CDDP、CPT-11)を用い、2時間のインターバルで薬剤添加後24時間における37種類のタンパク質量挙動を追跡した。薬剤濃度や投与方法など各種条件下で総計666種類の時系列データを解析したところ、38%はタンパク質量上昇、32%は同漸減、および32%は同揺らぎを示した(下図)。また、時系列データの幾何学的類似をcorrelation distance(dCor)で定義される係数で定量化し比較したところ、タンパク質の機能とは関係なく、比較的ランダムに選定されていると思われるタンパク質群ごとに類似したタンパク質量挙動を示していることが分かった。現在この仕組みについてプロテアソーム阻害剤等を用いた実験系を構築している。

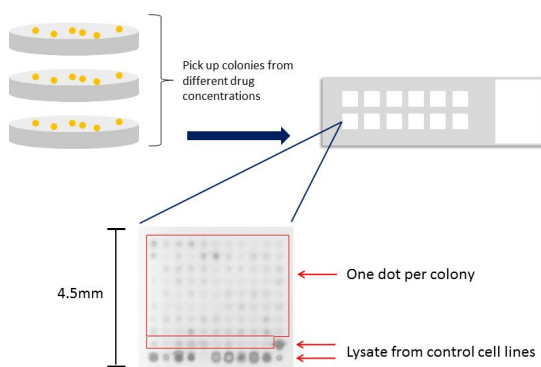


さらにこれらの結果から得られた想定されるネットワークについても検証を進めている

るが、解析対象となるデータ量が膨大であり、今後の研究計画を含めた再検討が必要と思われた。ネットワーク解析の一部を示す。



(2) 抗癌剤耐性細胞集団のプロファイリングについても微小細胞集団を用いて行うことが可能となるよう技術開発を行った。抗癌剤存在下で生存しうる細胞集団を解析対象とし、プロファイリングを行ったところ、抗癌剤の種類、濃度、および細胞の種類のいずれとも関連性のあるタンパク発現は見られなかった。一方で、薬剤抵抗性の細胞集団は幹細胞性マーカーまたは上皮性マーカーのいずれかを発現している傾向があった。これらの所見から基礎研究を展開させ、癌性腹膜炎の予防および 5-FU 抵抗性細胞に対する化合物を同定し、現在解析を進めている。



(3) 癌性腹膜炎臨床検体を用いた抗癌剤感受性試験に関しては、本研究期間開始(平成24年6月~)から期間終了(平成27年3月)までの抗癌剤感受性試験の申込は9件あったが、そのうち viable な余剰細胞を確保できたものはなかった。本研究に使用可能な細胞は癌性腹膜炎による腹水中細胞が理想的であるが、研究期間中のほとんどの症例が固形癌からの初代培養であり細胞数が確保できずアッセイの完遂が困難であった。また、本申請採択通知直前(平成24年4月)に先進医療が取り消された(同試験に保険導入されたことによる)ことも関連があるかもしれない。いずれにせよ、当院における癌性腹膜炎患者の抗癌剤感受性試験は減少しており

研究デザインそのものも見直す必要がある。

#### 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 4 件)

1. Umemura A, Koeda K, Sasaki A, Fujiwara H, Kimura Y, Iwaya T, Akiyama Y, Wakabayashi G. Totally laparoscopic total gastrectomy for gastric cancer: literature review and comparison of the procedure of esophagojejunostomy. Asian J Surg. (査読有) 2015 Apr;38(2):102-12
2. Akbani R, Becker KF, Carragher N, Goldstein T, de Koning L, Korf U, Liotta L, Mills GB, Nishizuka SS, Pawlak M, Petricoin EF 3rd, Pollard HB, Serrels B, Zhu J. Mol Cell Proteomics. (査読有) 2014 Jul;13(7):1625-43
3. Ito N, Iwaya T, Ikeda K, Kimura Y, Akiyama Y, Konosu M, Ishida K, Fujiwara H, Otsuka K, Nitta H, Kashiwaba M, Koeda K, Nishizuka S, Mizuno M, Sasaki A, Wakabayashi G. Hyperglycemia 3 days after esophageal cancer surgery is associated with an increased risk of postoperative infection. J Gastrointest Surg.(査読有) 2014 Sep;18(9):1547-56
4. Endo F, Nishizuka SS, Kume K, Ishida K, Katagiri H, Ishida K, Sato K, Iwaya T, Koeda K, Wakabayashi G. PLoS One.(査読有) 2014 Feb 27;9(2):e90155. doi: 10.1371

[学会発表](計 4 件)

1. 肥田圭介、肥満胃がん症例における完全腹腔鏡下胃切除の効果に関する検討、第12回日本消化器外科大会、2014年10月23日、神戸
2. 西塚 哲、5-FU 不応性の腫瘍に対する治療戦略、第18回日本がん分子標的治療学会、2014年6月25日、仙台
3. Koeda K、Gastrointestinal endoscopy, education and accreditation in Japan、The 66th annual congress of the Korean Surgical Society、2014年11月27日、Seoul
4. Koeda K、Daikenchuto (DKT) helps improve postoperative functional disorder after total gastrectomy in patients with gastric cancer: A multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial (JFMC42-1002)、DDW2014、Chicago

[図書](計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 1 件）

名称：タンパク質サンプルの大規模収集方法  
発明者：西塚 哲  
権利者：学校法人 岩手医科大学  
種類：  
番号：第 5301234 号  
出願年月日：平成 20 年 9 月 30 日  
取得年月日：平成 25 年 6 月 28 日  
国内外の別： 国内

〔その他〕

ホームページ等  
[www.nishizukalab.org](http://www.nishizukalab.org)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

肥田 圭介 (KOEDA, Keisuke)  
岩手医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：10285596

### (2) 研究分担者

若林 剛 (WAKABAYASHI, Go)  
岩手医科大学・医学部・教授  
研究者番号：50175064

### (3) 研究分担者

西塚 哲 (NISHIZUKA, Satoshi)  
岩手医科大学・医学部・講師  
研究者番号：50453311