

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：24402

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650647

研究課題名(和文) Hsp72 結合分子の包括的相互作用解析による新規抗癌剤耐性解除分子の探索

研究課題名(英文) Search for new target molecules to overcome drug resistance using the Hsp72 binding protein interactome

研究代表者

高橋 克之 (TAKAHASHI, KATSUYUKI)

大阪市立大学・医学(系)研究科(研究院)・薬剤部職員

研究者番号：10597751

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000 円、(間接経費) 870,000 円

研究成果の概要(和文)：熱ショック蛋白質72(Hsp72)は蛋白質の立体構造の維持や癌遺伝子の安定化、ストレス回避反応を担っている。また胃癌においてHsp72過剰発現が抗癌剤耐性に関与しているとの報告がある。我々はHsp72の結合蛋白質が抗癌剤耐性に重要な役割を果たしていると考えた。

ヒト胃癌細胞株2Mおよびoxaliplatin(OXA)耐性株2M/OXAを用いた。LC/MS/MSにより2M/OXA特異的なHsp72結合蛋白質を同定した。その中の1つ、stromal cell derived factor2を機能阻害することでOXAによる細胞死が増強された。Hsp72結合蛋白質は抗癌剤耐性を克服する標的となりうる。

研究成果の概要(英文)：Heat shock protein 72 (Hsp72) has functions such as promotion of protein folding, stabilizing oncogenic proteins, and avoiding stress. It has reported that Hsp72 overexpressed in gastric cancer was associated with resistance to chemotherapy. We think that Hsp72 client proteins would play an important role in drug resistance.

All experiments used human gastric cancer cell line, 2M and oxaliplatin (OXA) resistant 2M (2M/OXA). We identified 22 specific Hsp72-client proteins in 2M/OXA by LC/MS/MS. One of the client proteins, stromal cell derived factor 2 siRNA enhanced OXA inducing cell death in 2M/OXA. Hsp72-client proteins in drug-resistant cells may target molecules to overcome drug resistance.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・臨床腫瘍学

キーワード：抗癌剤耐性 分子シャペロン 熱ショックタンパク質

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍の抗癌剤に対する耐性の獲得は、治療の中心的役割を果たしている化学療法にとって重要な問題である。この耐性機序を解明し、克服することが、癌患者生存期間の延長に求められる。

Heat shock protein70 (Hsp70)のアイソフォームの1つである Hsp72 は新生蛋白質や変性蛋白質に対しシャペロン機能を有し、細胞保護の働きを示す。またアポトーシスを様々なシグナル伝達ポイントで抑制することが知られている [Garrido et al. (2006), Cell Cycle]。癌細胞は正常細胞と比較して Hsp72 が高発現していること、悪性度の高い低分化癌ではさらに高発現していることが報告されている [Calderwood SK et al. (2006), Trends Biochem Sci.]。さらに我々はスキルス胃癌より樹立された oxaliplatin 耐性株では感受性株と比較して Hsp72 が発現亢進していることを見出している。このような背景から、Hsp72 は抗癌剤や低酸素などのストレス回避反応に大きく寄与している可能性が高いと考えられる。そこで我々は抗癌剤耐性細胞株と感受性細胞株の Hsp72 と相互作用する蛋白質を網羅的に比較・解析することにより、抗癌剤耐性に関わる分子を同定し、耐性解除薬を開発することができると考えた。

2. 研究の目的

抗癌剤耐性は臨床上、非常に重大な問題である。耐性を解除する薬剤の開発は切望されているが、その開発には至っていない。本研究は癌細胞で高発現し、癌細胞のストレス回避や生存に関わっていると考えられるストレス応答・回避蛋白質 Hsp72 に着目し、Hsp72 が作用する蛋白質の網羅的解析システムを用いて抗癌剤耐性に関与する分子の同定、耐性解除薬標的分子の探索を目的とした。具体的な研究項目は 耐性細胞株と感受性細胞株の Hsp72 と相互作用する蛋白質の同定比較、耐性解除薬標的分子としての可能性の検討、の2つである。

3. 研究の方法

(1) スキルス胃癌細胞株を用いた抗癌剤耐性分子の探索

本学医学研究科老年腫瘍病態学講座にて樹立されたスキルス胃癌細胞株(2M)とそれより樹立した oxaliplatin 耐性株(2M/OXA)を用いた。耐性株の細胞抽出液より Hsp72 結合分子を同定、感受性株と比較した。具体的には以下の ~ の方法で行った。

Hsp72 アフィニティービーズを用いた精製

細胞抽出液中に含まれる Hsp72 複合体の精製には申請者がこれまでに作製した抗

Hsp72 モノクローナル抗体を共有結合させた NHS-activated Sepharose を使用し、バッチ法にてアフィニティー精製する。

抗癌剤耐性関連蛋白質の同定

で精製したサンプルに含まれる全蛋白質を質量分析計にてショットガン分析法を用いて同定する。

同定蛋白質の確認

質量分析計によって同定された蛋白質が実験操作の過程で検出される擬陽性蛋白質である可能性を排除するために、同定蛋白質に対する共免疫沈降を行い、同定蛋白質と Hsp72 の結合を確認する。

(2) 耐性解除薬標的分子としての検討

質量分析計によって同定された蛋白質で上記(1)で確認が取れた蛋白質が耐性解除薬の標的分子と成りえるのかを in vitro で評価する。具体的な方法としては感受性株および耐性株に同定分子の siRNA を導入することにより標的候補分子の機能阻害を行い、抗癌剤による細胞死誘導について評価を行う。

4. 研究成果

(1) oxaliplatin 耐性における Hsp72 の関与の検証

oxaliplatin (OXA)耐性における Hsp72 の関与を検証するため、2M 株および 2M/OXA 株の Hsp72 発現量を real time PCR 法および Western bolts 法にて検討した。その結果、mRNA レベル、蛋白レベルいずれにおいても耐性株で発現が有意に亢進していた(図 1-a,b)。

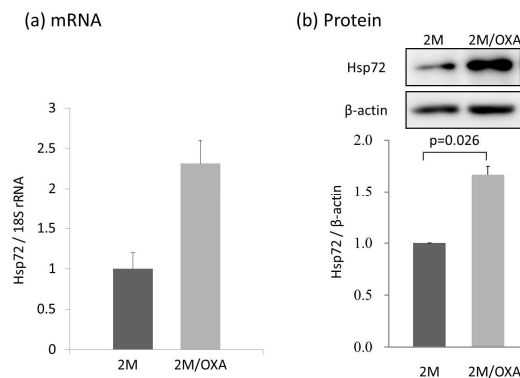


図 1 胃癌耐性株における Hsp72 発現上昇

さらに、発現亢進が認められた Hsp72 を siRNA を用いて機能阻害することで、OXA 添加時の細胞生存が有意に低下した(図 2)。

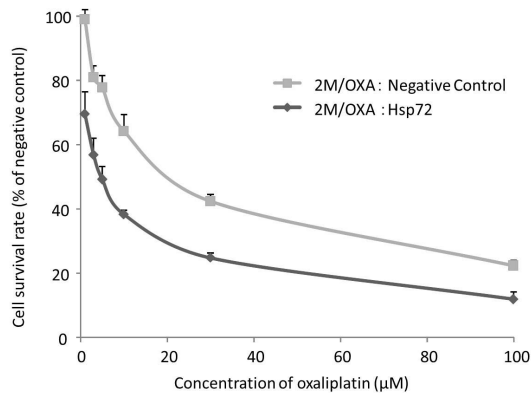


図2 Hsp72 発現抑制による耐性解除

以上の結果より、Hsp72 が OXA 耐性に関与している可能性が示唆された。

(2) oxaliplatin 耐性株特異的 Hsp72 結合分子の同定

2M および 2M/OXA の細胞抽出液中の Hsp72 複合体を精製し、ゲルシヨットガン法にて全蛋白質を Orbitrap LC-MS system にて測定した。その後、Mascot にてデータベースと照合し、95%以上の confidence をカットオフ値とし、Hsp72 結合蛋白質を同定した。その結果、2M のみで同定された蛋白質が 26 個、2M/OXA のみで同定された蛋白質が 22 個、両者に共通の蛋白質が 96 個同定された。

(3) 耐性解除標的分子としての検討

耐性株のみで同定された 22 個の蛋白質の中から 98%の信頼度で同定された Stromal cell derived factor 2 (SDF2) について耐性解除標的分子としての検討を行った。

2M/OXA 株に対して SDF2 の機能阻害を行い、OXA 添加後、72 時間後の細胞死を評価した。その結果、SDF2 の機能阻害のみでは有意な細胞死は誘導されなかったが、OXA 20 μM を作用させることで、死細胞はネガティブコントロールと比較し、約 3.3 倍に増加し、有意に細胞死が誘導された(図 3)。

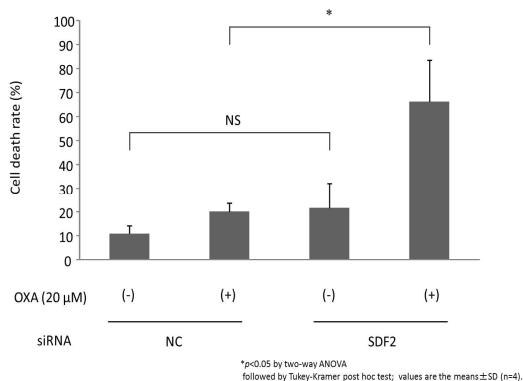


図3 SDF2 機能阻害による細胞死誘導

さらにこの効果は 2M 株では認められず、耐性株特異的なものであった。以上の結果より、SDF2 は OXA 耐性解除の標的分子となる可能性が示唆された。今後は in vivo による評価および OXA 耐性における SDF2 の役割を明らかにすることで耐性標的分子としての可能性を検討していく予定である。

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 3 件)

Hsc70 contributes to cancer cell survival by preventing Rab1A degradation under stress conditions.

Tanaka M, Mun S, Harada A, Ohkawa Y, Inagaki A, Sano S, Takahashi K, Izumi Y, Osada-Oka M, Wanibuchi H, Yamagata M, Yukimura T, Miura K, Shiota M, Iwao H. *PLOS ONE*, in press(2014)(査読有)

Fibroblast growth factor-2 anchoring on plasma membrane is critical for endothelial cell survival.

Tanaka M, Yamaguchi M, Kawamoto Y, Takahashi K, Inagaki A, Osada-Oka M, Harada A, Wanibuchi H, Izumi Y, Miura K, Shiota M, Iwao H, Ohkawa Y. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother. in press*(2014)(査読有)

Establishment of a 5-fluorouracil-resistant triple-negative breast cancer cell line.

Takahashi K, Tanaka M, Inagaki A, Wanibuchi H, Izumi Y, Miura K, Nagayama K, Shiota M, H Iwao. *Int J Oncol.* 43:1985-91 (2013) (査読有)
doi: 10.3892/ijo.2013.2135.

〔学会発表〕(計 9 件)

高橋克之, 胃癌細胞株において Hsp72 はオキサリプラチン耐性の獲得に寄与する. 第 87 回日本薬理学会年会, 2014 年 3 月 21 日, 宮城

Tanaka M, The search for diagnostic biomarkers of multiple myeloma by analysis of HSP72 interactome. 第 72 回日本癌学会学術総会, 2013 年 10 月 4 日, 神奈川

Shiota M, Isolation of HSP72-binding protein in the serum. 第 72 回日本癌学会学術総会, 2013 年 10 月 3 日, 神奈川

Takahashi K, Identification of drug resistance-related protein in Triple-negative breast cancer using a

proteomic approach. 第72回日本癌学会学術総会,2013年10月3日,神奈川

Tanaka M, HSC70-targeted proteomics revealed the association of RAB1A with stress response in cancer cells. 第86回日本薬理学会年会, 2013年3月21日,福岡

Shiota M, A novel neutralizing antibodies against FGF-2 induced endothelial cell death. 第71回日本癌学会学術総会,2012年9月11日,北海道

Takahashi K, Proteomic analysis of heat shock protein 72 client proteins in drug-resistant gastric cancer cell. 第71回日本癌学会学術総会,2012年9月9日,北海道

Tanaka M, Proteomic analysis of Hsc70 client proteins targeting stress response in cancer cells.第71回日本癌学会学術総会,2012年9月9日,北海道

田中昌子,分子シャペロン Hsc70 を標的とした癌のストレス応答分子同定法の確立. 第121回日本薬理学会近畿部会,2012年6月29日,徳島

〔図書〕(計 0件)
該当なし

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)
該当なし

取得状況(計 0件)
該当なし

〔その他〕
ホームページ等
該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

高橋 克之 (TAKAHASHI, Katsuyuki)
大阪市立大学・大学院医学研究科・薬剤部
職員
研究者番号 : 10597751

(2)研究分担者
該当なし

(3)連携研究者
該当なし