

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：34401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790565

研究課題名(和文) プロテオーム解析による乳癌の5-FU耐性機構の解明とその応用

研究課題名(英文) Elucidation and application of the 5FU resistant mechanism of breast cancer using proteomic analysis

研究代表者

木村 光誠 (Kimura, Kosei)

大阪医科大学・医学部・助教

研究者番号：20623846

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：5FU耐性大腸癌細胞株に対するプロテオーム解析にて5FU耐性に関与する候補タンパク質(HP27、Prohibitin、TFAM)を同定した。乳癌患者血清を用いてHP27と病変の増悪との関連を検討し、正の相関を認めた。Prohibitin、TFAMに関しては、再現性が得られず検討を中止した。タキサン耐性乳癌細胞株に対してもプロテオーム解析をおこない、数種の候補タンパク質を同定した。

研究成果の概要(英文)：We performed proteomic analysis to 5FU resistant colon cancer cell line and identified some proteins (HP27, Prohibitin, TFAM) as candidate associated 5FU resistance. We showed a positive association between HP27 and disease progression by an evaluation using breast cancer serum sample. We abandoned an analysis for Prohibitin and TFAM due to loss of their reproducibility. We also identified some candidate proteins for Taxane resistance by proteomic analysis using Taxane resistant breast cancer cell line.

研究分野：化学療法耐性

キーワード：化学療法 薬物耐性 乳癌

1. 研究開始当初の背景

乳癌は癌種の中では比較的予後の良いものと考えられているが、その要因のひとつに適切な補助療法の施行が挙げられる。乳癌補助療法において、手術可能乳癌に対しては、癌の女性ホルモン受容体の有無や Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) によって分類されるサブタイプ、悪性度、進行度から予想される再発リスクに応じ、anthracyclin 系薬剤や taxane 系薬剤を用いた術後もしくは術前補助化学療法が施行され、近年治療成績の改善が得られている。

一方、進行再発乳癌に対しては、上記薬剤に加え、5-FU 系薬剤 (capecitabine と TS-1)、vinorelbine、gemcitabine、エリブリン等が用いられ、種々のトライアルにて無増悪生存期間、全生存期間の改善が示されており、これらの化学療法剤の有効性が報告されている。

しかし、各種薬剤において、奏効率は 30-60%程度であり、また例えば治療効果が得られた場合も、最終的に、薬剤耐性を獲得することも事実であり、依然として再発乳癌は予後不良の疾患である。

このため、有効な治療の実施のみならず、無用な治療に伴う医療経済的な面からも、治療効果予測もしくは耐性獲得予測のためのサロゲートマーカーの確立が急務と思われる。

これまで我々は、5-FU を低濃度より投与しながら培養し、耐性が獲得された 5-FU 耐性大腸癌細胞株を用い、Radical-free and highly reducing (RFHR) 二次元電気泳動法により、主に塩基性蛋白の発現の違いを解析し、5-FU 耐性に関連すると考えられる候補蛋白質の同定を行い論文発表した。

2. 研究の目的

本研究においては、これら 5-FU 耐性に関連する候補蛋白質について、ウエスタンブロットでの確認、遺伝子レベルでの確認をおこない、さらに、5-FU 系薬剤治療予定の乳癌患者を対象に、治療開始から病変増悪のため治療を変更するまで、経時的に採血を施行し、患者血清中の候補タンパク質に対する自己抗体の量的検討をおこなう。この値と、既存の腫瘍マーカーや画像検査所見と比較し、薬剤耐性マーカーとしての有用性を検討する。今後の展望としては、これまでの研究成果をベースとして、5-FU 系薬剤を使用する他の癌腫(大腸癌、胃癌、食道癌など)を用いた 5-FU 耐性関連候補蛋白質の検討を行い、ELISA 法を構築、多検体による validation study を行い、新規薬剤耐性診断マーカーの開発を目標に検討を行っていく予定である。さらに、同定された候補蛋白質の腫瘍特異性や機能解析等を蛋白および遺伝子レベルで

検討することにより従来のプロテオーム手法と比し、詳細でより臨床に即した研究が可能となり、新規抗体療法への応用などオーダーメイド癌治療の道が開ける可能性があると考えている。

3. 研究の方法

(1) 大腸癌細胞株 (DLD-1) の 5-FU 感受性株 (親株)、耐性株に対して、RFHR 二次元電気泳動法にて同定した 5-FU 耐性関連候補蛋白質について、ウエスタンブロット (WB) / 化学発光 (ECL) 法を用いて解析し、二次元電気泳動法で得られた結果の妥当性を確認する。

(2) (1) で得られた結果を基に、親株および耐性株の当該遺伝子レベルの発現を RT-PCR を用いて解析し、二次元電気泳動法で得られた結果の妥当性を確認する。

(3) 5-FU 耐性関連候補蛋白質に対して、siRNA の手法を用いてその発現を変化させ、薬剤耐性の変化を確認する。

(4) 5-FU 耐性関連候補蛋白質について、5-FU 系薬剤治療予定の乳癌患者を対象に、治療開始から病変増悪のため治療を変更するまで、経時的に採血を施行し、この患者血清を用いて、候補蛋白質に対する ELISA 法を構築して定量化し、抗腫瘍効果と関連させて、薬剤耐性診断マーカーとしての有用性を検討する。

4. 研究成果

(1) 候補タンパク質の一つである HP27 に関しては siRNA の手法にて薬剤感受性が変化することを確認した。また HP27 に関して、耐性獲得マーカーとして応用できるかを患者血清を用いて検討するため、5-FU 系経口抗癌剤投与中の再発乳癌患者を対象に、定期的に血清を採取し、ELISA 法を用いて、血清中濃度と治療効果とを比較検討した。結果としては、病変の増悪と HP27 とに正の相関傾向がみられたものの、一部の症例では病変の増悪にも関わらず、HP27 が一定の値をとる傾向を示す症例も見られた。他の治療効果との影響も検討したが、少数例での検討でもあり、現在のところその意義は見いだせていない (図 1)。

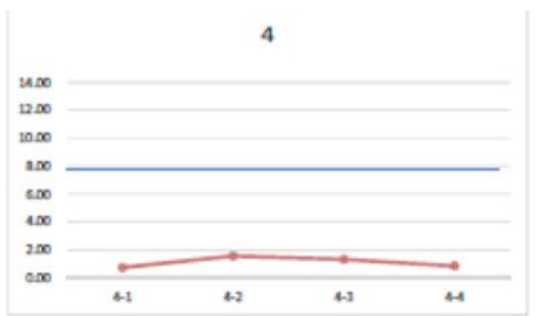
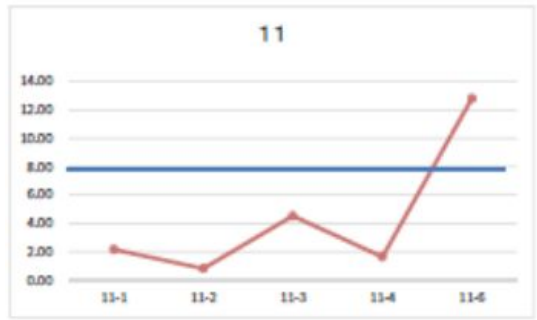
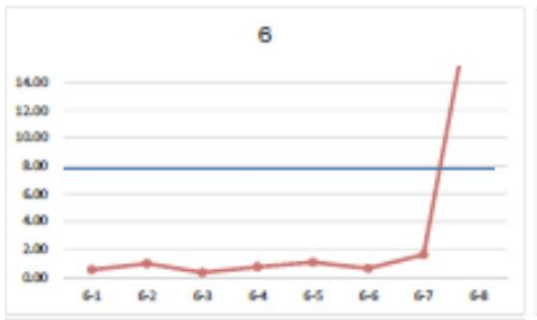


図1 HP27 と治療経過

(2) プロテオーム解析にて別の候補タンパク質として Prohibitin と TFAM を見出した。これらに関しても、上記 HP27 と同様に検討を進めていく予定であったが、電気泳動法の再現性に問題が生じた。様々に条件を調整し再現性向上に努めるも、一定の結果を得ることができず、これに関するその後の検討を中止した(図2)。

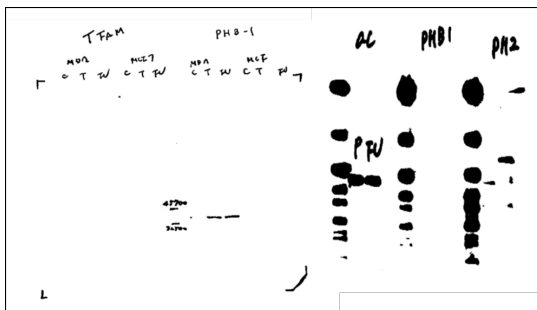


図2 Prohibitin、TFAM ウェスタンブロット

(3) タキサン系抗癌剤であるパクリタキセル耐性乳癌細胞株を入手し、プロテオーム解析をおこなった。結果、peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A、heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3 といったアポトーシスに関する蛋白質や、そのほか細胞周期、ストレス反応等に関連する蛋白質の変動がみられた。現在これらについて引き続き検討している。

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 0 件)
なし

〔学会発表〕(計 1 件)
発表者(代表者)名
藤岡 大也

発表標題

乳癌細胞株における抗癌剤耐性獲得の新規関連蛋白質の検索と機能解析

学会名

第 22 回日本乳癌学会学術総会

発表年月日

2014 年 7 月 10 日

発表場所

大阪国際会議場

〔図書〕(計 0 件)
なし

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等
特記すべきことなし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 光誠 (KIMURA Kosei)
大阪医科大学 医学部・助教
研究者番号: 20623846

(4) 研究協力者

境 晶子 (SAKAI Akiko)
大阪医科大学・医学部・講師

田中 覚 (TANAKA Satoru)

大阪医科大学・医学部・助教

藤岡 大也 (FUJIOKA Hiroya)

大阪医科大学・医療総合研修センター臨床研
修室・臨床研修専任指導医