

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 4 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25830104

研究課題名(和文) 肺癌の薬剤耐性に関わるパクリタキセル標的分子のプロテオーム解析法による同定

研究課題名(英文) Paclitaxel resistance-associated proteins in lung cancer cell lines are detected by proteome analyses

研究代表者

下村 雅律 (Shimomura, Masanori)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90433268

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：肺癌細胞株におけるパクリタキセル耐性関連タンパク質の同定とその機能解明を目標とした

パクリタキセル固定化ビーズを用いてタンパク質回収を行ったところ、パクリタキセル耐性細胞株において特異的に発現するタンパク質を回収することが可能であった。これらのうちFIGNL1タンパクが特に耐性細胞株で強発現していた。FIGNL1をsiRNAでノックダウンすると、耐性細胞株において低濃度パクリタキセル曝露でも細胞生存率が60-70%まで低下することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the function of paclitaxel resistance-associated proteins detected by proteome analyses in human lung cancer cell lines. Affinity purification by paclitaxel immobilized beads revealed several specific bands in paclitaxel resistant cell line; these bands were not revealed in the other cell lines. We can especially identify a protein, FIGNL1, of these specific proteins. As a result of knockdown of FIGNL1 expression using siRNA, the resistant cell line had survival rate of only 60% on the low concentration paclitaxel.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：パクリタキセル耐性 プロテオーム解析

1. 研究開始当初の背景

(1)パクリタキセルは α -tubulin に結合して微小管の重合化及び安定化を促進することで抗腫瘍効果をきたすとされている。プラチナ系抗癌剤と組み合わせたレジメンが肺癌化学療法で広く用いられているが、パクリタキセルの感受性を規定する因子は未だ十分に解明されていない。

(2)われわれは、肺癌細胞株 3 種類 (1118, A549, RERF-LC-KJ)におけるパクリタキセルに対する感受性を検討し、50%抑制濃度 (50% inhibitory concentration: IC_{50})に大きな差異があることを見いだした。また、もっとも耐性の高い細胞株である RERF-LC-KJ において、細胞内にパクリタキセルが液胞状に集積し、感受性株よりも顕著であったことを確認し、パクリタキセルに対する耐性機序に関与すると報告した。(Shimomura et al, International Journal of oncology 40: 995-1004, 2012)

(3)FG ビーズ (多摩川精機) にパクリタキセルをリガンドとして固定化し、これを用いて、細胞溶解液からパクリタキセルの結合タンパクを回収した。パクリタキセル耐性細胞株 RERF-LC-KJ (IC_{50} : 100 μ M)と control である HeLa (IC_{50} : 2.6 nM)の細胞溶解液をパクリタキセルの固定化濃度を変化させたパクリタキセル固定化ビーズで回収し、その回収タンパクの発現パターンを銀染色にて比較すると、明らかに固定化の濃度依存的に明瞭化し、両者の間で異なる分子量のバンドがいくつか確認され、パクリタキセルに対して直接的、あるいは間接的に相互作用を持つタンパク質の存在が示唆された。

2. 研究の目的

パクリタキセルへの耐性を示す肺癌細胞株において、耐性に関与するパクリタキセル関連タンパク質を同定し、肺癌臨床検体における薬剤感受性を規定する因子を見出すこと

を目標とする。

3. 研究の方法

(1)パクリタキセル結合タンパク質の選出・構造分析

パクリタキセルに対する感受性が異なる肺癌細胞株 3 種類 RERF-LC-KJ (IC_{50} : 100 μ M), A549 (IC_{50} : 100 nM), 1118 (IC_{50} : 4.7 nM)を培養し、パクリタキセル固定化ビーズを用いてパクリタキセル結合タンパク質を回収する。タンパク質を高濃度パクリタキセルでリガンド溶出させた後にポリアクリルアミド電気泳動(PAGE)を行う。銀染色でゲルを染色し、可視化されたタンパク質のうち、耐性株と感受性株との間で発現量に差があるものを切り出し、LC-MS/MS 解析に供する。

(2)パクリタキセル結合タンパク質の機能的な評価

siRNA を用いたノックダウンおよびプラスミドを用いた標的遺伝子の強制発現

パクリタキセル耐性株における siRNA による遺伝子のノックダウン、およびパクリタキセル感受性株におけるプラスミドによる遺伝子の強制発現を行った細胞株においてパクリタキセルに対する薬剤耐性を測定し、耐性の変化を検討する。

4. 研究成果

(1)パクリタキセル結合タンパク質の回収

3 種類のパクリタキセルに対する感受性の異なる肺癌細胞株の細胞溶解液とパクリタキセル固定化磁気ビーズ (FG ビーズ)を反応させてパクリタキセル結合タンパクを回収してから電気泳動、銀染色にてバンドのパターンを確認した。図 1 に示すように差次的なバンドの存在が明瞭であった。

この中で、RERF-LC-KJ において発現の認められるバンドについて LC-MS/MS 解析を行った結果、FIGL1 (fidgetin like-1)タンパクが

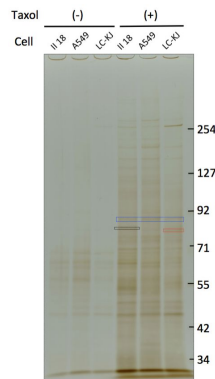


図1 パクリタキセル固定化ビーズを用いたパクリタキセル結合タンパク質の分離

同定された。

(2)FIGNL1 ノックダウンによるパクリタキセル耐性細胞株の生存率の変化

FIGNL1 を siRNA によりノックダウンし、IN Cell Analyzer によって耐性細胞株 RERF-LC-KJ の生存率を評価した。3 段階の異なるパクリタキセルに 24 時間曝露した後の細胞の生存率を図に示した。2.7 nM および 9 nM の低濃度のパクリタキセル曝露を行うと図2のように生存率は60-70%まで低下したことが明らかとなった。現時点では更なる機能解明として FIGNL1 強制発現による感受性株

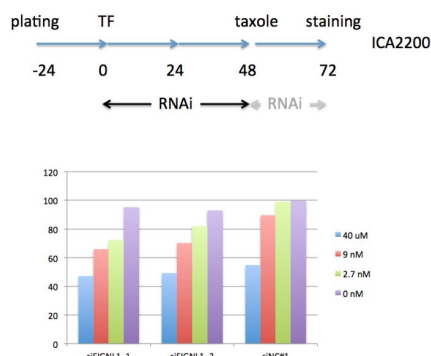


図2 siRNA を用いた FIGNL1 抑制による耐性細胞株の生存率の変化

の耐性獲得や、臨床検体での FIGNL1 発現量

検討を行い、更なる機能解明を行うべきであるが、固定化ビーズによるタンパク回収の再現性実験や条件検討に想定以上の時間を要したため、未達である。

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 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[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 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

下村 雅律 (Masanori Shimomura)

京都府立医科大学大学院医学研究科・助教

研究者番号：904332

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：