

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 28 日現在

機関番号：34401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25870924

研究課題名(和文) プロテオーム解析による抗癌剤耐性獲得の新規診断マーカーの開発

研究課題名(英文) Proteomic analysis of chemotherapy resistance related proteins in human breast cancer cells

研究代表者

田中 覚 (Tanaka, Satoru)

大阪医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：50595741

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)：本研究では、新規プロテオーム解析法によって乳癌細胞におけるタキサンに対する耐性獲得に関する新規蛋白質を同定した。
乳癌細胞株(MCF-7)と、そのパクリタキセル耐性獲得細胞株(MCF-7/TAX)を用いて、改良型2次元電気泳動法で蛋白質を分離し、両者の発現を比較して耐性獲得に関連する蛋白質を同定した。その結果、多くの蛋白質に発現の差異を認めた。これらのうち、MCF-7/TAXに過剰発現していた蛋白質Aに注目した。MCF-7/TAXにおいて蛋白質Aの発現をノックアウトさせたところ、パクリタキセルに対する感受性が回復した。
蛋白質Aがパクリタキセルに対する耐性獲得に関連することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To identify the proteins involved in paclitaxel resistance, we compared the proteomes of MCF-7 human breast cancer cells and its paclitaxel-resistant subclone MCF-7/PTX. Using two-dimensional gel electrophoresis and matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry, many proteins were modulated between these cells. Among them, PROTEIN A were upregulated in MCF-7/PTX cells. Knockdown of PROTEIN A using small interfering RNA in MCF-7/PTX cells restored their sensitivity to paclitaxel.

研究分野：腫瘍学

キーワード：プロテオーム 乳癌 タキサン

1. 研究開始当初の背景

タキサン系抗癌剤は、乳癌患者に対して用いる代表的な薬剤であるが、長期・反復投与によって耐性を獲得する。耐性獲得に相関する因子としてP糖蛋白の過剰発現などが報告されているが、最近、術前化学療法において微小管関連蛋白のtauの発現量が低い乳癌では、パクリタキセルに対する組織学的完全奏効率が有意に高いことが報告された。そこで我々は、進行・再発乳癌患者の乳癌組織におけるtauの発現量と、パクリタキセルに対する治療効果との関連を検討したところ、tauが高発現する症例では、有意にパクリタキセルの治療効果が低く、奏効期間が短い傾向にあったことを報告した。

一方、これまで5-Fluorouracil(5-FU)に対する耐性獲得機序の解明と耐性マーカーの同定を目的としてプロテオーム解析を行っており、ヒト大腸癌由来の培養細胞DLD-1と5-FUに耐性を獲得した細胞株を用いて、両者で発現する蛋白質を、改良型等電点電気泳動(IPG)法(従来法の欠点を克服し再現性・試料添加量を増やした方法)で解析した結果、耐性獲得によって発現量が変化したスポットを確認し、質量分析(MS)で蛋白質を同定した。その内訳は、アポトーシス関連蛋白質、代謝系酵素、細胞骨格蛋白質、ストレス応答蛋白質などで、興味深いことに、耐性獲得株ではアポトーシスに關与する複数の蛋白質が全体としてアポトーシスが減弱する方向に発現変動しており、耐性獲得株では5-FUによるアポトーシスが起こりにくいことを確認した。さらに本研究の協力者(境)は、耐性獲得によって発現が変動した蛋白質のうち、低分子ストレス応答蛋白質HSPB1(HSP27)に着目し、耐性獲得株におけるHSP27の発現をsiRNA法で抑制すると5-FUへの感受性が回復したことより、この蛋白質が抗癌剤感受性に關与していることを確認した。また、活性型HSP27のリン酸化部位のアミノ酸残基をMSによって同定した(J Proteomics, 2012; 75: 806-818)。本研究に用いる耐性獲得のモデルとして用いるヒト乳癌由来の培養細胞株MCF-7は、パクリタキセルによって細胞死を起こすが、反復投与により薬剤耐性が獲得される。我々は、パクリタキセルに対して耐性獲得した細胞株を入手し、これまでに改良型IPG法を用いた予備実験にて、5-FUと作用機序の異なるパクリタキセルにおいてもHSP27の発現変化を確認し、他にも発現が変化する細胞骨格蛋白質をいくつか同定した。国内外において、抗癌剤に対する耐性獲得機序を解明するための蛋白質レベルでの研究は、遺伝子レベルの研究に比べて遅れている。

2. 研究の目的

乳癌治療における化学療法の重要性が高ま

っており、各種薬剤の選択において、その耐性発現の予測は重要な問題となっている。新規のプロテオーム解析を用いて、乳癌細胞におけるタキサン系抗癌剤の一つであるパクリタキセルに対する耐性獲得に關連する蛋白質を同定する。さらに、タキサン系抗癌剤の治療を受けた乳癌患者において、これらの実験の結果から得られた候補蛋白質が、耐性獲得の新規診断マーカーとして臨床応用できるかを、患者血清を用いて検討する。これらの研究により、抗癌剤耐性獲得機序の解明とその応用を目指す。不必要な抗癌剤治療を省略するための新たな選択基準ができ、乳癌患者に対する新たなテーラーメイド治療の展開に貢献できる可能性があるものと期待される。さらに、本研究により、抗癌剤耐性獲得におけるプロテオーム技術を用いた基礎的研究から、臨床応用への基盤が確立できる可能性があるものと考えられる。

3. 研究の方法

本研究では、乳癌細胞におけるタキサン系抗癌剤に対する耐性獲得機序を基礎的研究によって解明することと、耐性獲得マーカーとしての臨床応用を目指す。まず、平成25年度に「改良型IPG法で乳癌細胞とそのパクリタキセル耐性獲得株の蛋白質分離を行い、耐性獲得に關連する蛋白質の検索・同定」を行う。平成26年度以降は、「改良型IPG法の結果の妥当性の検証」、「耐性獲得の診断マーカーとしての有用性の確認」の研究を行う。「改良型IPG法の結果の妥当性の検証」では、改良型IPG法で同定された蛋白質をWB・ECL法にて確認し、さらにRT-PCR法にて当該蛋白質を遺伝子レベルで確認する。次に「耐性獲得マーカーとしての有用性の確認」では、タキサン系抗癌剤を使用する乳癌患者の血清を用いて、蛋白質の量をELISA法によって測定し、その結果と実際の化学療法の臨床治療効果を比較検討して、それら蛋白質の耐性獲得マーカーとしての有効性を検討する。

MCF-7ならびにそのPTX耐性獲得細胞株を、初期大量培養を行い蛋白質のサンプルをストックする。まず、改良型IPG法による蛋白質分離を行う。電気泳動したゲルをCBB染色し、デンシトメトリーで定量化し、両者に有意に発現の異なるスポットを検索する。これらのスポットをゲルより切り抜き、還元アルキル化、ゲル内トリプシン消化した後、酵素消化物を溶媒・抽出する。得られた断片化ペプチドをMSによって蛋白質を同定する。

改良型IPG法にて発現の変動が確認された蛋白質をPTX耐性獲得の關連候補蛋白質としてWB・ECL法にてその妥当性を確認する。つぎに親株および耐性株の当該遺伝子の発現レベルをRT-PCR法を用いて解析する。遺伝子導入、またはsiRNA法を用いて、候補蛋白質の発現変動による薬剤耐性の変化を確認

する。

パクリタキセル耐性獲得の関連候補蛋白質が、臨床においても耐性獲得の診断マーカーとなりうるかを検討する。パクリタキセルをはじめとしたタキサン系抗癌剤の投与を受ける進行再発乳癌患者の血清を用い、候補蛋白質の量をELISA法によって測定し、その結果と実際の化学療法の臨床治療効果を比較検討する耐性獲得を検討するため、タキサン系抗癌剤の投与前、投与中、そして病巣の増悪のため治療を変更する際を投与後として、経時的に採血を施行し血清を得る。投与中は3から4カ月毎に採血をおこない、同時期に一般的な乳癌腫瘍マーカー(CEA, CA15-3, NCC-ST-439)および画像検査を実施する。

4. 研究成果

本研究では、新規プロテオーム解析法によって乳癌細胞におけるタキサンに対する耐性獲得に関する新規蛋白質を同定した。

乳癌細胞株(MCF-7)と、そのパクリタキセル耐性獲得細胞株(MCF-7/TAX)を用いて、改良型2次元電気泳動法で蛋白質を分離し、両者の発現を比較して耐性獲得に関連する蛋白質を同定した。その結果、多くの蛋白質に発現の差異を認めた。これらのうち、MCF-7/TAXに過剰発現していた蛋白質Aに注目した。MCF-7/TAXにおいて蛋白質Aの発現をノックアウトさせたところ、パクリタキセルに対する感受性が回復した。以上より、この蛋白質Aがパクリタキセルに対する耐性獲得に重要な働きをしていることが示唆された。

研究代表者の日常臨床業務が多忙であったこと、2次元電気泳動法の結果の再現性を確認するために、当初の予想以上に時間を要したため、タキサン系抗癌剤の投与を受ける進行再発乳癌患者での耐性獲得の診断マーカーとしての有用性を検討するまではできなかった。

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 6件)

1. Comparative proteomic analysis of paclitaxel resistance-related proteins in human breast cancer cell lines. Fujioka H, Sakai A, Tanaka S, Kimura K, Miyamoto A, Iwamoto M, Uchiyama K. *Oncol Lett.* 2017 13:289-295. 査読有り

2. A Phase II Study of Adjuvant Chemotherapy of Tegafur-Uracil for Patients with Breast Cancer with HER2-negative Pathologic Residual Invasive Disease After Neoadjuvant Chemotherapy. Tanaka S, Iwamoto M,

Kimura K, Takahashi Y, Fujioka H, Sato N, Terasawa R, Kawaguchi K, Ikari A, Tominaga T, Maezawa S, Umezaki N, Matsuda J, Uchiyama K. *Anticancer Res.* 2016 36:6505-6509. 査読有り

3. Phase II Study of Neoadjuvant Anthracycline-Based Regimens Combined With Nanoparticle Albumin-Bound Paclitaxel and Trastuzumab for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Operable Breast Cancer. Tanaka S, Iwamoto M, Kimura K, Matsunami N, Morishima H, Yoshidome K, Nomura T, Morimoto T, Yamamoto D, Tsubota Y, Kobayashi T, Uchiyama K. *Clin Breast Cancer.* 2015 15:191-6. 査読有り

[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

田中 覚(Tanaka Satoru)
大阪医科大学・医学部・非常勤講師
研究者番号：50595741

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

境 晶子 (Sakai Akiko)

大阪医科大学・医学部・講師