

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：24402

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26890021

研究課題名(和文) シャペロン結合解析による膵癌の薬剤自然耐性解除薬の標的分子同定

研究課題名(英文) HSP72 interactome identifies key molecules for intrinsic resistance to gemcitabine in pancreatic cancer

研究代表者

田中 昌子(橘昌子)(Tanaka, Masako)

大阪市立大学・大学院医学研究科・特任助教

研究者番号：00733651

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではヒト膵癌細胞株PANC-1より低血清耐性株PANC-1/Stvおよび低酸素耐性株PANC-1/Hypを樹立し、HSP72と結合するタンパク質を解析することでゲムシタビンの自然耐性に関する分子を探索した。ゲムシタビン獲得耐性株であるPANC-1/GEMはゲムシタビンの不活化により耐性を獲得したが、PANC-1/StvおよびPANC-1/Hyp細胞は既知の耐性因子の発現は変化せず、PANC-1/GEM細胞とは異なる機構で耐性を獲得していると考えられた。そこで、PANC-1/GEM細胞のHSP72結合タンパク質群と比較し、ゲムシタビン自然耐性株にのみ共通する37のタンパク質を同定した。

研究成果の概要(英文)：We established cell lines tolerant to serum starvation (PANC-1/Stv) and hypoxia (PANC-1/Hyp) from the parental cell line PANC-1. The IC50 values of gemcitabine for PANC-1/Stv and PANC-1/Hyp cells (under non-stressful conditions) was 142- and 37-fold higher, respectively, than that for the parental cells. These cell lines developed this resistance to gemcitabine via suppression of apoptosis, which is a mechanism of resistance that is common to that of the cell line (PANC-1/GEM) with acquired gemcitabine resistance. However, drug resistance in PANC-1/GEM cells was primarily caused by gemcitabine inactivation. We then compared HSP72 interactome of PANC-1/GEM cells to PANC-1/Stv and PANC-1/Hyp cells, resulting in identification of 37 molecules unique to intrinsic resistance to gemcitabine.

研究分野：分子薬理学

キーワード：薬剤耐性 熱ショックタンパク質 インタラクトーム 膵癌

## 1. 研究開始当初の背景

膵がんは外科的治療の困難な進行がんで発見されるケースが多く、化学療法に頼らざるを得ない。しかし、中心的薬剤は2剤に限定されており、初回治療から奏効率が低く、奏効期間も非常に短い(文献1)。がんの化学療法においては初回治療から薬剤が効かない薬剤自然耐性(薬剤非感受性)と、治療を続けていくうちに最初は有効であった薬剤が効かなくなる薬剤獲得耐性が問題となる。しかし、現在までに抗がん剤耐性を解除する薬剤の開発には至っていない。

乏血性の腫瘍である膵がんは極端な虚血状態にあり、常に低酸素や低栄養といった慢性的な環境ストレスに曝されている(文献2)。この環境ストレスに対する耐性亢進が薬剤への抵抗性を高めるとされ(文献3)、薬剤自然耐性の一因であると考えられる。微小環境に適応した膵癌細胞が抗がん剤(自然)耐性となる分子機構を明らかにできれば、初回治療において既存薬の奏効率を高める新たな抗がん剤の開発に繋がると考えられる。

## 2. 研究の目的

- (1) ヒト膵癌細胞株より低血清および低酸素耐性株を樹立し、ゲムシタピン感受性を評価する。また、樹立株の細胞表現型を評価し、ゲムシタピン耐性への影響を調べる。
- (2) 申請者はこれまでに、膵癌細胞は生育環境由来の慢性的なストレスに曝される中で、その生存がストレス応答分子であるHSP72に強く依存することを明らかにした。そこで、樹立株のHSP72結合タンパク質のプロファイルを親株やゲムシタピン獲得耐性株と比較し、薬剤自然耐性に関与する分子をスクリーニングする。
- (3) スクリーニングした分子がゲムシタピンの治療効果を高める薬剤(エンハンサ

ー)となり得るか検証する。

## 3. 研究の方法

- (1) ヒト膵癌細胞株 PANC-1 (親株) より 1% FBS または 1% O<sub>2</sub> 条件下で 90 日間継代培養し、低血清および低酸素耐性株を樹立する。また、薬剤獲得耐性株としてゲムシタピンを段階的に上げて継代培養したゲムシタピン(獲得)耐性株を樹立する。形態学的解析およびウェスタンブロット法による分子生物学的解析により樹立株の細胞表現型を評価する。また、MTT 法により樹立株のゲムシタピン IC<sub>50</sub> 値を算出し、ゲムシタピン耐性の獲得を評価する。
- (2) 親株および樹立 3 株の HSP72 結合タンパク質を質量分析により同定し、比較解析する。低血清・低酸素・ゲムシタピン耐性株に共通する HSP72 結合タンパク質を選抜し、薬剤自然耐性に関連する分子を見つける。
- (3) 同定した分子がエンハンサーの標的となり得るか、*in vivo* スクリーニングにより検証する。腫瘍の可視化を目的に、親株を含めた 4 株の mCherry 安定発現株を作製する。mCherry 発現株を用いたマウスゼノグラフトにより、同定分子の発現抑制がゲムシタピンの奏効率を高めるか検証する。

## 4. 研究成果

- (1) PANC-1 を 1% FBS (低血清) 条件下で培養し、生細胞を 90 日間継代培養した。また、1% O<sub>2</sub> (低酸素) 条件下で同じく生細胞を 90 日間培養した。それぞれの細胞株を低血清細胞株 PANC-1/Stv および低酸素耐性株 PANC-1/Hyp とし、耐性能を細胞生存アッセイおよび生細胞イメージングシステムにより評価した。樹立株は親株と同じ 10% FBS および常酸素下

で7日以上継代培養した後、1% FBS または 1% O<sub>2</sub> に再曝露した。その結果、ストレス条件における両株の細胞生存率および増殖率は有意に上昇していたため、低血清および低酸素に耐性を獲得していることが明らかとなった。また、ストレス応答に関与する分子の発現をウェスタンブロット法にて評価した結果、両株に共通して小胞体ストレス応答の亢進およびアポトーシス抑制因子である Bcl-2 の発現亢進が見とめられた。ゲムシタピン獲得耐性株として樹立した PANC-1/GEM 細胞においても小胞体ストレス応答および Bcl-2 の発現亢進が見られた。PANC-1/Stv および PANC-1/Hyp 細胞は紡錘形の形態を示し、親株に比べてコロニー形成能が著しく低下していた。ウェスタンブロット法により上皮間葉転換 (EMT) のマーカー発現を定量した結果、両株ともに EMT の亢進が示唆された。さらに、創傷治癒アッセイにより遊走能を評価した結果、同じく両株ともに遊走能が有意に亢進していた。以上より PANC-1/Stv および PANC-1/Hyp は EMT 様の形質を獲得していることが示唆された。次に親株を含めた4株のゲムシタピン感受性を MTT 法にて定量し、IC<sub>50</sub> 値を算出した。PANC-1/GEM 細胞の IC<sub>50</sub> 値は親株の 263 倍、PANC-1/Stv 細胞は 142 倍、PANC-1/Hyp 細胞においては 37 倍に上昇しており、いずれの細胞株もゲムシタピン耐性を示した (図 1)。しかし、PANC-1/GEM 細胞はゲムシタピンの不活化により耐性を獲得したことが示唆されたが、PANC-1/Stv および PANC-1/Hyp 細胞においてはゲムシタピン耐性因子の mRNA 発現 (*DKC*, *CDA*, *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC5*, *ABCG2*, *ENT1*) はいずれも親株との間に差はなかった。以上より、低血清や低酸素に耐性を獲得した細胞はゲム

シタピンに耐性を示すことが明らかとなった。また、その耐性機序はゲムシタピン獲得耐性株とは大きく異なるものの、共通機構として小胞体ストレス応答やアポトーシスの抑制などを介してゲムシタピン耐性を獲得している可能性が示唆された。

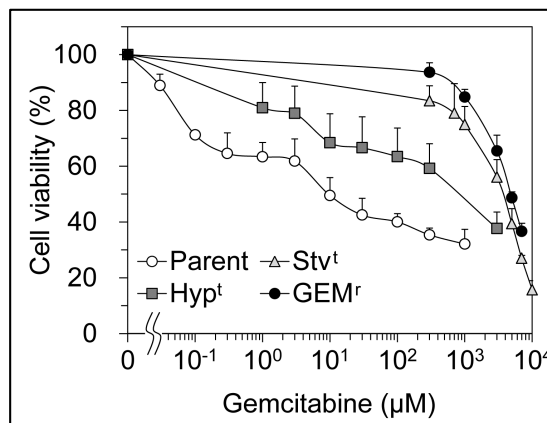


図 1 各細胞株におけるゲムシタピン容量反応曲線

(2) 親株、PANC-1/GEM、PANC-1/Stv および PANC-1/Hyp 細胞の HSP72 結合タンパク質を質量分析にて同定した。95%以上の信頼度をもつペプチドが2本以上同定されたタンパク質を解析対象とし、合計で 205 のユニークタンパク質を同定した。親株で同定されたタンパク質をバックグラウンドコントロールとし、比較解析した結果、PANC-1/GEM 細胞にユニークなタンパク質は 24、PANC-1/Stv および PANC-1/Hyp 細胞に共通であるタンパク質は 37、また樹立 3 株に共通するタンパク質は 41 であった (図 2)。Gene-annotation enrichment analysis により、これらのタンパク質の機能を分類したところ、PANC-1/GEM 細胞では細胞分化や細胞骨格系タンパク質が多く含まれており、PANC-1/Stv および PANC-1/Hyp 細胞ではユビキチン依存的なタンパク質分解や細胞骨格、アクチン結合タンパク質が多く占めることが明

らかとなった。また、タンパク質フォールディングや翻訳に関与する分子が3株に共通して多いことがわかった。前項の結果より、ゲムシタピン自然耐性と獲得耐性の機序が異なることが示唆されたため、PANC-1/Stv および PANC-1/Hyp 細胞に共通で検出された 37 タンパク質に着目した。他の細胞株において同一ペプチドが検出されたタンパク質を除外して解析し直し、6 分子 (ZYX, CRKL, RRM2, PFKP, CAPN2, KPRP) を選抜した。以上より、ゲムシタピン自然耐性株と獲得耐性株の HSP72 結合タンパク質のプロファイルが異なること、自然耐性株ではユビキチン依存的なタンパク質分解やアクチン結合タンパク質を多く含まれることが明らかとなった。また、ゲムシタピン耐性に関与する可能性がある6分子を選抜した。

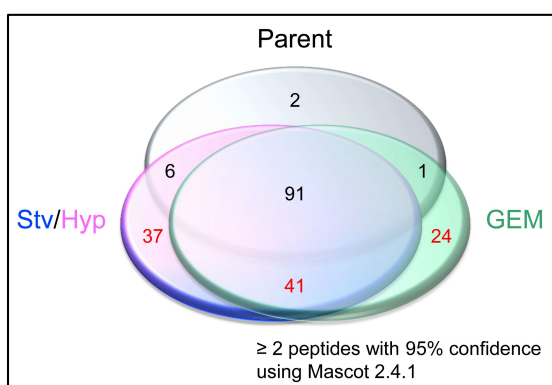


図 2 HSP72 結合タンパク質の同定

(3) 細胞イメージングシステムにより腫瘍の増殖および転移量をモニターするために、親株を含めた4株の mCherry 発現株を樹立した。mCherry の蛍光量をモニターするために IncuCyte 生細胞イメージングシステムにより、各細胞株にスフェロイドを形成させたところ、PANC-1/Stv 細胞ではスフェロイド形成能が亢進したが、PANC-1/Hyp および PANC-1/GEM 細胞はスフェロイドを形成しないことが明らかとなった(図3)。

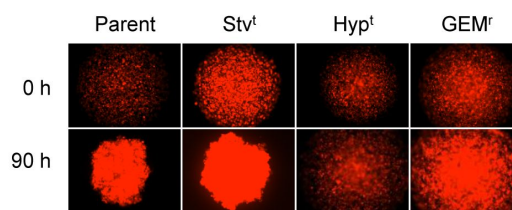


図 3 mCherry 発現株を用いたのスフェロイド形成能の評価

#### <引用文献>

- Ueno H et al. “Randomized phase III study of gemcitabine plus S-1, S-1 alone, or gemcitabine alone in patients with locally advanced and metastatic pancreatic cancer in Japan and Taiwan: GEST study” *J Clin Oncol*. 31:1640-8,2013
- Brown JM, Wilson WR. “Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment” *Nat Rev Cancer* 4:437-47, 2004
- Holohan C et al. “Cancer drug resistance: an evolving paradigm” *Nat Rev Cancer* 13:714-26, 2013

#### 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5件)

- Takahashi K, Tanaka M, Yashiro M, Matsumoto M, Ohtsuka A, Nakayama KI, Izumi Y, Nagayama K, Miura K, Iwao H, Shiota M. “Protection of stromal cell-derived factor 2 by heat shock protein 72 prevents oxaliplatin-induced cell death in oxaliplatin-resistant human gastric cancer cells” *Cancer Lett*. 378:8-15, 2016, 査読有  
doi: 10.1016/j.canlet.2016.05.002.  
Tanaka M, Shiota M, Nakao T, Uemura R,

Nishi S, Ohkawa Y, Matsumoto M, Yamaguchi M, Osada-Oka M, Inagaki A, Takahashi K, Nakayama KI, Gi M, Izumi Y, Miura K, Iwao H. "Identification of low-abundance proteins in serum via the isolation of HSP72 complexes" *J Proteomics*. 136:214-21, 2016, 査読有 doi: 10.1016/j.jprot.2016.01.008.

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. "Hsc70 contributes to cancer cell survival by preventing Rab1A degradation under stress conditions" *PLoS One* 9:e96785, 2014, 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0096785.

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. "Establishment of neutralizing rat monoclonal antibodies for fibroblast growth factor-2" *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother*. 33:261-9, 2014, 査読有 doi: 10.1089/mab.2013.0085.

Sano S, Izumi Y, Yamaguchi T, Yamazaki T, Tanaka M, Shiota M, Osada-Oka M, Nakamura Y, Wei M, Wanibuchi H, Iwao H, Yoshiyama M. "Lipid synthesis is promoted by hypoxic adipocyte-derived exosomes in 3T3-L1 cells" *Biochem Biophys Res Commun*. 445:327-33, 2014, 査読有 doi: 10.1016/j.bbrc.2014.01.183.

[学会発表](計8件)

田中 昌子、大塚 明日香、高橋 克之、泉 康雄、塩田 正之、三浦 克之、ゲ

ムシタピン耐性膵癌におけるHSP72結合タンパク質の同定、第89回日本薬理学会年会、2016年3月9日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

大塚 明日香、高橋 克之、田中 昌子、泉 康雄、岩尾 洋、塩田 正之、三浦 克之、SDF-2はオキサリプラチン耐性に関する、第89回日本薬理学会年会、2016年3月9日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

高橋 克之、田中 昌子、塩田 正之、Stromal cell-derived factor 2はoxaliplatin耐性に寄与する、第74回日本癌学会学術総会、2015年10月9日、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

田中 昌子、高橋 克之、泉 康雄、塩田 正之、三浦 克之、ゲムシタピン耐性ヒト膵癌細胞株における生存因子の同定、第127回日本薬理学会近畿部会、2015年6月26日、長良川国際会議場(岐阜県岐阜市)

市坪 大介、田中 昌子、高橋 克之、泉 康雄、塩田 正之、岩尾 洋、三浦 克之、低血清・低酸素耐性膵癌細胞におけるゲムシタピン感受性の評価、第88回日本薬理学会年会、2015年3月19日、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

高橋 克之、田中 昌子、塩田 正之、泉 康雄、三浦 克之、岩尾 洋、Stromal cell-derived factor 2はoxaliplatin耐性に寄与する、第88回日本薬理学会年会、2015年3月18日、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

市坪 大将、田中 昌子、高橋 克之、泉 康雄、塩田 正之、岩尾 洋、三浦 克之、膵癌細胞における低血清・低酸素耐性株の樹立とGemcitabine感受性の評価、第126回日本薬理学会近畿部会、2014年10月24日、和歌山県JAビル(和歌山県和歌山市)

市坪 大将、田中 昌子、高橋 克之、  
鰐淵 英機、塩田 正之、膵癌細胞株  
PANC-1 の環境ストレス耐性株樹立とゲ  
ムシタビン感受性の評価、第 73 回日本  
癌学会学術総会、2014 年 9 月 27 日、パ  
シフィコ横浜（神奈川県横浜市）

田中 昌子、高橋 克之、市坪 大将、  
鰐淵 英機、塩田 正之、Hsp72-TGFBI  
複合体はエンドリソソーム系によって  
分泌される、第 73 回日本癌学会学術総  
会、2014 年 9 月 27 日、パシフィコ横浜  
（神奈川県横浜市）

〔図書〕(計 1 件)

塩田正之、田中昌子、HSP70 ファミリー  
の新たな機能、日本薬理学雑誌 143:315  
(310-312)、公益社団法人日本薬理学会、  
2014

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

田中 昌子 (TANAKA, Masako)

大阪市立大学・大学院医学研究科・特任助  
教

研究者番号：733651