

Title	プロヒビチンのオキサリプラチン感受性予測バイオマーカーへの展開
Sub Title	Prohibitin1, potential predictive marker of Oxaliplatin response of colorectal cancer cells
Author	原, 可奈子(Hara, Kanako)
Publisher	
Publication year	2018
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2017.)
JaLC DOI	
Abstract	<p>オキサリプラチン(L-OHP)は大腸癌治療のキードラッグである。Prohibitin1(PHB1)タンパク質発現量は、L-OHPの感受性と相関があることが以前の検討により解明された。本研究ではPHB1のL-OHP効果予測バイオマーカーへの展開を目的とし、PHB1のL-OHP作用機序への関与と、臨床検体での相関を検討した。PHB1の発現抑制によりL-OHPの感受性が低下する。この原因はPHB1発現抑制による抗アポトーシスの増加がL-OHPが導くアポトーシスを抑制する結果と示唆された。患者血清を用いた検討よりPHB1と抗腫瘍効果にも有意な相関が確認され、効果予測バイオマーカーへの可能性を示した。</p> <p>Oxaliplatin (L-OHP) is a key drug used for the treatment of colorectal cancer (CRC). However, approximately half of patients who receive FOLFOX gain no benefit despite the incidence of side effects. In this study, we aimed to identify a predictive marker of response to L-OHP in human CRC cells. Proteomics analysis by 2D-DIGE was performed to compare between low and highly sensitive cell lines. Prohibitin1 (PHB1) was identified by proteomics analysis. Protein expression of PHB1 was correlated with IC50 value for L-OHP by immunoblot. Knockdown of PHB1 by siRNA decreased the sensitivity to L-OHP in human CRC cell lines. The knockdown of PHB1 reduced apoptosis that L-OHP induced and the expression of anti-apoptosis factor increased. Furthermore, ELISA analysis of clinical samples indicated that PHB1 expression in serum correlated with antitumor effect. This study found that PHB1 is considered a potential biomarker predictive of response to L-OHP for CRC.</p>
Notes	研究種目：若手研究(B) 研究期間：2016～2017 課題番号：16K18443 研究分野：生物学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_16K18443seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18443

研究課題名(和文) プロヒビチンのオキサリプラチン感受性予測バイオマーカーへの展開

研究課題名(英文) Prohibitin1, potential predictive marker of Oxaliplatin response of colorectal cancer cells

研究代表者

原 可奈子 (HARA, Kanako)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任助教

研究者番号：90624685

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：オキサリプラチン(L-OHP)は大腸癌治療のキードラッグである。Prohibitin1(PHB1)タンパク質発現量は、L-OHPの感受性と相関があることが以前の検討により解明された。本研究ではPHB1のL-OHP効果予測バイオマーカーへの展開を目的とし、PHB1のL-OHP作用機序への関与と、臨床検体での相関を検討した。PHB1の発現抑制によりL-OHPの感受性が低下する。この原因はPHB1発現抑制による抗アポトーシスの増加がL-OHPが導くアポトーシスを抑制する結果と示唆された。患者血清を用いた検討よりPHB1と抗腫瘍効果にも有意な相関が確認され、効果予測バイオマーカーへの可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Oxaliplatin (L-OHP) is a key drug used for the treatment of colorectal cancer (CRC). However, approximately half of patients who receive FOLFOX gain no benefit despite the incidence of side effects. In this study, we aimed to identify a predictive marker of response to L-OHP in human CRC cells. Proteomics analysis by 2D-DIGE was performed to compare between low and highly sensitive cell lines. Prohibitin1 (PHB1) was identified by proteomics analysis. Protein expression of PHB1 was correlated with IC50 value for L-OHP by immunoblot. Knockdown of PHB1 by siRNA decreased the sensitivity to L-OHP in human CRC cell lines. The knockdown of PHB1 reduced apoptosis that L-OHP induced and the expression of anti-apoptosis factor increased. Furthermore, ELISA analysis of clinical samples indicated that PHB1 expression in serum correlated with antitumor effect. This study found that PHB1 is considered a potential biomarker predictive of response to L-OHP for CRC.

研究分野：生物学

キーワード：オキサリプラチン バイオマーカー プロテオミクス 効果予測

1. 研究開始当初の背景

日本国内において大腸癌（結腸癌 + 直腸癌）は癌による死亡率が男性では3位、女性では1位を占める。大腸癌の標準治療である、フルオロウラシル(5-FU)/ロイコボリン(LV)に、オキサリプラチン(L-OHP)やイリノテカンを併用した FOLFOX 療法や FOLFIRI 療法により、進行性・再発大腸癌の生存期間は約20ヶ月、奏効率は50%にまで到達した。しかし逆の見方をすれば、これらの治療を受けたほぼ全員の患者に副作用が発現するにも関わらず、効果が得られるのは半分に過ぎないという現状であり、薬物投与前に個々の治療に対する感受性予測が出来るバイオマーカーの確立が必要であることを示している。現在、L-OHP 感受性因子の探索研究としては、DNA修復に関わる excision repair cross-complementation group 1(ERCC1)の遺伝子多型をバイオマーカーとした、FOLFOX 療法の予後予測の大規模臨床試験が試みられた。その結果、ERCC1 が感受性予測バイオマーカーとして有効であるという報告[Br J Cancer 108, 1238-1244 (2013)]もある一方、それを否定する報告[Mol Diagn Ther 5, 277-83 (2011)]もあり、またこれら以外にも多くの候補因子が報告されているにも関わらず未だに実用化に至っているバイオマーカーはない。加えて感受性因子の研究には薬効発現本体であるタンパク質レベルでの作用機序解明が必須である。

研究代表者は、9種類の人ヒト大腸癌細胞株を用いてL-OHP感受性をMTS assayにより検討した。IC50を元にL-OHPに感受性の最も高い方から3細胞株を、最も低い方から3細胞株をピックアップし、2D-DIGE法によりタンパク質発現量に差が見られるスポットを16個見つけた(p<0.001)。続いて、ショットガン解析により10種類のタンパク質が同定された。それぞれのタンパク質の発現量を9種類の大腸癌細胞株でWestern Blotting法に

より解析し、発現量と感受性(IC50)に相関の見られたタンパク質が6種類得られた。これら6種類のタンパク質はそれぞれL-OHP感受性予測バイオマーカーとして報告はなく、新しい知見であった(2014年特許出願済み)。申請者はこれら6種類のタンパク質の中から癌抑制遺伝子として知られているPHB1に注目した。PHB1はL-OHP感受性が高い細胞株で発現量が高いタンパク質である(図1)。

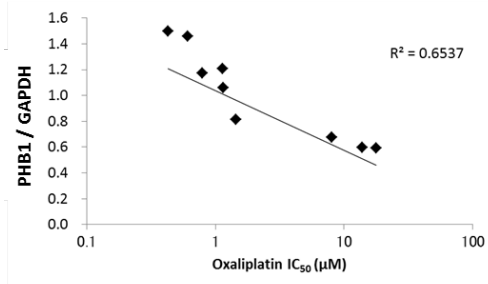


図1. PHB1発現量とIC₅₀の相関

PHB1の発現量の変化に伴い、L-OHPの感受性も変化することを確かめるためにDLD-1細胞を用いsiRNAによりPHB1をノックダウンし、オキサリプラチンの感受性の変化を調べたところPHB1ノックダウンによりL-OHPの感受性は有意に低下した(図2)。

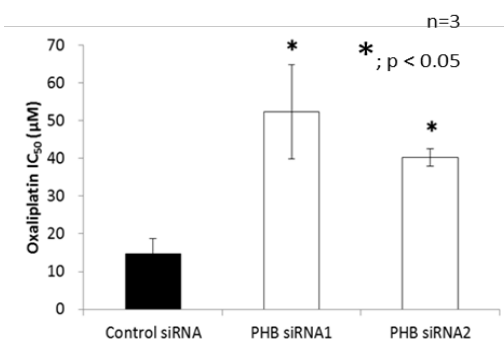


図2. PHB1 siRNAによるL-OHP感受性の変化

PHB1は生物種を越えて高度に保存されたタンパク質であり、アポトーシス、細胞周期制御、シグナル伝達、老化などへの関与が示唆されている多機能性タンパク質である。癌においてPHB1の発現量と癌化や悪性度の報告は組織により異なり、癌に対して抑制的に働くのか促進的に働くのか明らかではない。薬剤感受性の報告では、子宮頸癌においてシス

プラチンが誘導するミトコンドリアの断片化によるアポトーシスが、シスプラチン耐性細胞株で PHB1 の発現量が少なく Opa1 と P53 の複合体が減りミトコンドリアの断片化が進まずアポトーシスが誘導されない[J Biol Chem. 289(39),27134-45 (2014)]というシスプラチン耐性機序に PHB1 が関与している報告がある。また、臨床血液検体において正常者と比べ大腸癌患者では PHB1/PHB2 抗体の血中濃度が高い [oncogene 23, 7430-7435 (2004)] などの報告がある。PHB1 と L-OHP 感受性の関与は新規かつ独創的な知見であり、本研究課題は、これまで進めてきた研究をさらに発展させ、抗癌剤感受性予測バイオマーカーとして臨床応用へ展開する研究である。

2. 研究の目的

- (1) PHB1 の L-OHP 感受性に関わるメカニズムの解明
- (2) PHB1 のバイオマーカーとしての臨床応用に向けた検討

3. 研究の方法

- (1) PHB1 の L-OHP 感受性に関わるメカニズムの解明

PHB 過剰発現による L-OHP 感受性の評価

p-CMV6_PHB1 をトランスフェクションし過剰発現させたヒト大腸癌細胞株 (HCT116) を用いて、PHB1 過剰発現による L-OHP 感受性の変化を MTS assay で評価する。

その他の抗癌剤における PHB1 の感受性への関与の検討

ヒト大腸癌細胞株を使用し siRNA を用いて PHB1 を抑制し、L-OHP 以外の大腸癌で使用される抗癌剤シスプラチン (CDDP)、フルオロウラシル (5-FU)、SN-38 への感受性を MTS assay により評価する。PHB1 が L-OHP 感受性予測において単剤のバイオマーカー、もしくは、その他の抗癌剤

の感受性にも関与しているか検討した。

PHB1 の発現調節を用いた感受性に関わる経路の解析

ヒト大腸癌細胞株 (DLD-1) を用い、PHB1 発現抑制による L-OHP 感受性の低下が、L-OHP が生じるアポトーシスを抑制していることが原因か検討した。その後、L-OHP の作用機序、または PHB1 の関わるアポトーシス経路に対してどのように関わっているか Western blotting により解析した。

- (2) PHB1 のバイオマーカーとしての臨床応用に向けた検討

PHB1 の ELISA 法の確立

ELISA 法の確立：ヒト大腸癌患者の血液検体を用い、PHB1 の ELISA の系を確立する。また、評価に使用する定量方法を確立する。

臨床検体を用いた血清中 PHB1 発現解析

で確立した ELISA 法を使用して、化学療法未治療の進行・再発大腸癌患者に対する FOLFIRI + Bevacizumab 療法の治療開始前と初回画像診断時の血清中の PHB1 を ELISA によって分析した。

4. 研究成果

- (1) PHB1 の L-OHP 感受性に関わるメカニズムの解明

PHB 過剰発現による L-OHP 感受性の評価

p-CMV6_PHB1 をトランスフェクションし PHB1 を一過性発現したヒト大腸癌細胞株 (HCT116) を用い、L-OHP 感受性の変化を MTS

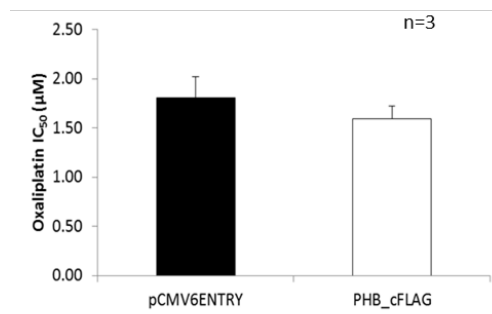


図3. PHB1 過剰発現による L-OHP 感受性の変化

assay で評価した(図 3.)ところ、過剰発現による L-OHP の感受性に有意な差は認められなかった。原因として PHB1 自体の発現量が多く過剰発現による発現量増加が影響を与えない程度だと考えられた。

その他の抗癌剤における PHB1 の感受性への関与の検討

他の薬剤においても PHB1 が関与するのか検討するために、PHB1 発現抑制を用いて、大腸癌で使用する 5-FU、CDDP、SN38 に対する細胞毒性試験を実施した(図 4)。

PHB1 発現抑制により CDDP と SN38 の感受性に影響は得られなかった。しかし、5-FU の感受性は L-OHP 同様に有意に低くなった。以上の結果より、PHB1 は L-OHP の感受性に影響を与えていると示唆された。また、5-FU の感受性への関与も示唆された。

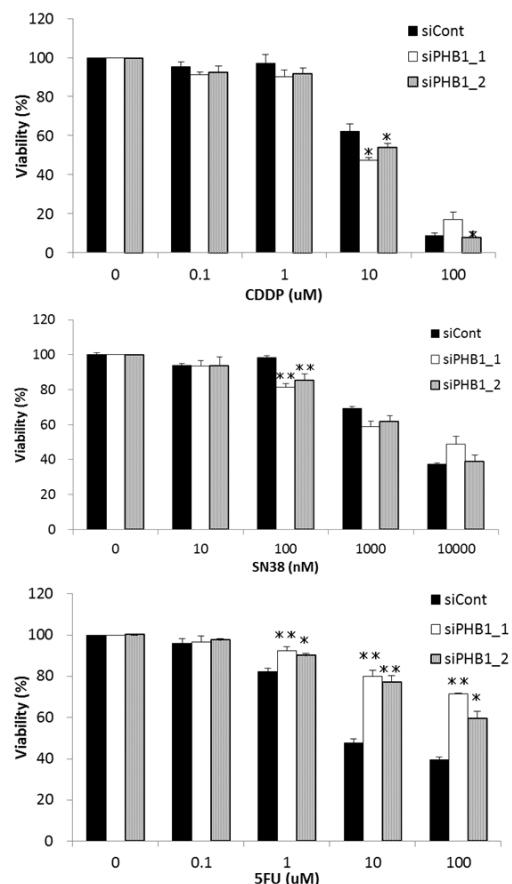


図4. PHB1 発現抑制による感受性の変化

PHB1 の発現調節を用いた感受性に関わる経路の推定

まず、PHB1 発現抑制による L-OHP の感受性の

低下がアポトーシスの抑制が原因となるのか、PHB1 発現抑制を用いて、L-OHP 曝露 24 時間後のアポトーシスに関連するタンパク質の発現量を確認した(図 5.)。

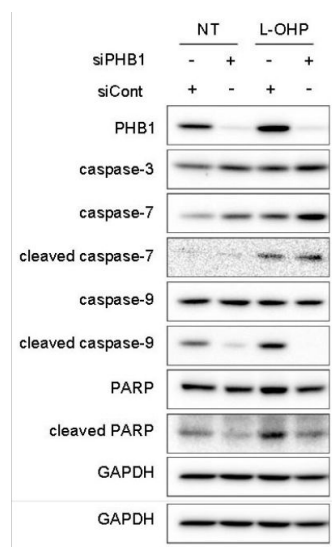


図5. PHB1 発現抑制によるアポトーシスの変化

L-OHP 曝露により生じる cleaved caspase9 と cleaved PARP の発現上昇が PHB1 発現抑制により減少することから、PHB1 発現抑制による L-OHP 感受性の低下はアポトーシスの減少が関わっていると示唆された。その後、L-OHP の作用機序、または PHB1 の関わるアポトーシス経路に対してどのように関わっているか Western blotting により解析した。PHB1 の発現抑制により、リン酸化 ERK や Akt などの細胞の生存に関わるタンパク質の発現が増加し、Bcl-2 や Bcl-xL の抗アポトーシスを促進するタンパク質の発現も増加することを確認したことから、PHB1 はこれらの経路を調節することで L-OHP によるアポトーシスを制御していると考えられた。

(2)PHB1 のバイオマーカーとしての臨床応用に向けた検討

ヒト大腸癌患者の血液検体を用い、PHB1 の ELISA の系を確立し、この方法を使用して化学療法未治療の進行・再発大腸癌患者に対する FOLFOX + Bevacizumab 療法の治療開始前と初回画像診断時の血清中の PHB1 を ELISA

によって分析した。試験治療期間中の最大腫瘍縮小効果をもとに Responder (CR+PR)と Non-responder (SD+PD)に分け、血清中のPHB1量と効果の相関を解析した(図6)。

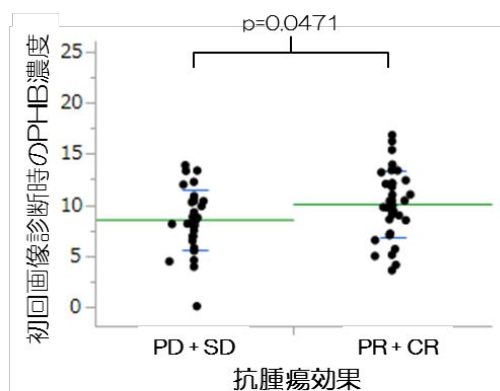


図6. 初回画像診断時の血清中PHB1量と抗腫瘍効果

初回画像診断時の血清中の PHB1 発現量と抗腫瘍効果に有意な差が確認できた。この結果は細胞の結果と同じ傾向を表していて、バイオマーカーとしての可能性を示した。

PHB1 とオキサリプラチン感受性の関与は国内外ともに新規かつ独創的な知見であった。また、PHB1 が L-OHP が生じるアポトーシスを抑制することで L-OHP の効果を減少させるという作用機序も明らかになり、臨床検体での比較とも相関した。以上より、PHB1 の抗癌剤感受性予測バイオマーカーとして臨床応用へ可能性を示した。

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)

[学会発表](計 1 件)

Kanako Hara

Prohibitin1, potential predictive marker of Oxaliplatin response of colorectal cancer cells.

(International Association of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology, 2017)

6. 研究組織

(1)研究代表者

原 可奈子 (HARA, Kanako)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任助教

研究者番号: 90624685