慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	抗がん剤反応性の個体差解明とバイオマーカー開発をめざしたプロテオーム解析
Sub Title	Proteomic analysis for elucidation of individual differences in chemotherapeutic response and for biomarker development
Author	谷川原, 祐介(Tanigawara, Yusuke) 渡辺, 光博(Watanabe, Mitsuhiro)
Publisher	
Publication year	2011
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2010.)
JaLC DOI	
Abstract	本研究では、プロテオーム解析手法により癌細胞の抗がん剤感受性と相関して発現変動するタンパク質を網羅的に探索し、抗腫瘍効果の個人差解明と薬剤反応性の指標となるバイオマーカーの開発をめざした。研究の結果、ヒト大腸癌細胞における発現量がオキサリプラチンに対する感受性と相関を示すタンパク質を発見し、S100A10タンパク質と同定した。さらに、5-フルオロウラシルやイリノテカン活性代謝物曝露に対して特徴的な挙動を示すバイオマーカー候補タンパク質を新たに見出した。
Notes	研究種目：基盤研究(B) 研究期間：2008～2010 課題番号：20390049 研究分野：臨床薬理学 科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_20390049seika

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.

様式Ｃ-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 23 年 6 月 16 日現在

機関番号：32612
研究種目：基盤研究(B)
研究期間：2008～2010
課題番号：20390049
研究課題名（和文）　抗がん剤反応性の個体差解明とバイオマーカー開発をめざしたプロテオーム解析
研究課題名（英文）　Proteomic analysis for elucidation of individual differences in chemotherapeutic response and for biomarker development

研究代表者
谷川原　祐介　(TANIGAWARA YUSUKE)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号：30179832

研究成果の概要（和文）：
本研究では、プロテオーム解析手法により癌細胞の抗がん剤感受性と相関して発現変動するタンパク質を網羅的に探索し、抗腫瘍効果の個人差解明と薬剤反応性の指標となるバイオマーカーの開発をめざした。研究の結果、ヒト大腸癌細胞における発現量がオキサリプラチンに対する感受性と相関を示すタンパク質を発見し、S100A10 タンパク質と同定した。さらに、5-フルオロウラシルやイリノテカン活性代謝物曝露に対して特徴的な挙動を示すバイオマーカー候補タンパク質を新たに見出した。

研究成果の概要（英文）：
We applied proteomic approach to elucidate individual differences in chemotherapeutic response of human colorectal cancer cells and to develop protein biomarkers for predicting chemosensitivity. We have identified the protein S100A10 whose expression well correlated with sensitivity to oxaliplatin, and our findings suggested this protein a potential biomarker in clinical setting. Furthermore, we have also found several proteins as potential biomarkers to predict sensitivity to anticancer drugs such as 5-fluorouracil and active metabolite of irinotecan.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2008 年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2009 年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2010 年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
総　計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

研究分野：臨床薬理学
科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学
キーワード：個別化医療、抗癌剤、薬剤反応性、バイオマーカー、プロテオーム、SELDI-TOF MS、オキサリプラチン

１．研究開始当初の背景

近年、新規抗がん剤の開発が進みがん薬物治療成績は向上してきたが、今なお治癒の期待できない疾患であることは変わらない。進

行性疾患であるがんの薬物治療は、有効な薬剤選択が生存期間延長にとって必須であるが、薬剤投与前に各個人の反応性（レスポンダー・ノンレスポンダー）を判別する手法は確立していない。例えば、癌死亡数の第３位を占める大腸癌の標準一次治療としてFOLFOX 療法と FOLFIRI 療法が共に生存期間20 か月、奏効率 50%を示すものの、個々の癌患者でどちらの治療法により良く反応するかを予測する手だてはなく、実際に治療を行ってみるまで結果は分からない。抗がん剤反応性予測をめざした研究は、ゲノム、トランスクリプトームからの研究が数多くなされており、塩酸イリノテカンの副作用に対する UGT1A1 遺伝多型の影響など、副作用予測においては一定の成果が得られつつある。しかしながら、がん細胞の抗がん剤に対する反応性（抗腫瘍効果）を遺伝子発現だけで予測することは難しく、薬効発現本体であるタンパク質レベルの作用機序解明が必要である。

本研究で用いるプロテインチップ・システム（Surface-enhanced laser desorption/ionization Time-of-flight/Mass Spectrometry; SELDI-TOF/MS）は、m/z 1,000～70,000 の範囲に及ぶタンパク質の網羅的な発現解析が可能であり、微量試料でも分析可能である。研究代表者は、いち早く本手法を薬剤反応性のプロテオーム研究に導入し、すでに免疫抑制剤の薬効マーカーの発見・同定に成功した。

そこで本研究では、SELDI-TOF/MS 法を用いてタンパク質レベルでの抗腫瘍効果の個体差解明と抗がん剤反応性予測マーカーの開発を目指す研究に着手した。

２．研究の目的

本研究は、プロテオーム解析手法により、抗がん剤感受性と相関して発現変動するタンパク質を見出し、薬効の個人差要因の解明と薬剤反応性の指標となるバイオマーカー開発を目的とする。具体的には、ヒト大腸癌の抗がん剤反応性に関係するタンパク質の探索・同定とオーダーメイド医療に向けた基礎検討を行う。

３．研究の方法

(1)ヒト大腸癌細胞を用いたタンパク質発現解析と新規タンパク質の同定

①実験材料

１２種類のヒト由来大腸癌細胞株（DLD-1, HT29, SW480, SW1116, WiDR, HCT116, SW620, COLO205, HCT-15, LS174T, COLO201, COLO-320）を用いた。

②新規バイオマーカー・タンパク質の発見と同定

SELDI-TOF/MS 解析法により、ヒト大腸癌細胞における発現量が、オキサリプラチン（L-OHP）に対する感受性と良く相関する分子量 11kDa のタンパク質を見出した。このタンパク質を二次元電気泳動にて分離したゲル内消化物を LC/MS/MS 解析により同定した。同定されたタンパク質はモノクローナル抗体を用いるウエスタンブロット法により確認した。

③抗がん剤曝露後の細胞内タンパク質発現プロファイリング

L-OHP、SN-38（イリノテカン活性代謝物）、5-フルオロウラシル（5-FU）の各薬剤に対する高感受性癌細胞と低感受性癌細胞を用いて、薬剤曝露後の細胞内タンパク質発現プロファイルの経時的変化について SELDI-TOF MS を用いた網羅的解析を行った。各薬剤曝露後に特徴的な挙動を示すタンパク質ピークを薬剤反応性に関わる候補タンパク質として選び出した。

(2)バイオマーカー・タンパク質の機能解析

①発現調節機構の検討

L-OHP 感受性と相関が見出されたバイオマーカー候補タンパク質（S100A10）およびその結合パートナーである Annexin A2（ANXA2）について L-OHP 感受性の異なる 8 種類のヒト大腸癌細胞株における発現量の関係について検討した。

②RNA 干渉を用いたノックダウン実験

S100A10 および ANXA2 について各 siRNA 単独、および両者を同時ノックダウンした細胞について L-OHP 感受性の変化について検討した。

(3) 臨床応用に向けた基礎的検討

①大腸癌細胞培養上清における S100A10 の検出

S100A10 高発現細胞株（HT29 および DLD-1）の培養上清をウエスタンブロット法により分析し、S100A10 の存在を検出した。

②ヒト血清からの S100A10 検出の試み

慶應義塾大学医学部倫理委員会にて承認を得たヒト血液検体を SELDI-TOF/MS により分析した。

③S100A10 測定系の開発

リコンビナント S100A10 を免疫原としてマウスを免疫し、細胞融合後、得られたハイブリドーマ培養上清（候補抗体）を評価してスクリーニング後、サンドイッチ ELISA 構築の検討に入った。

４．研究成果

(1) ヒト大腸癌細胞を用いたタンパク質発現解析と新規タンパク質の同定

①発現量が L-OHP 感受性と相関するタンパク質の発見と同定

大腸癌細胞内における発現量が L-OHP 感受性と相関する分子量 11.1 kDa タンパク質(Fig.1)は protein S100A10 であると同定された。S100A10 の発現は抗 S100A10 モノクローナル抗体を用いたウエスタンブロット法により確認された。S100A10 は結合パートナーである ANXA2 をはじめとする膜タンパク質や受容体と結合することに加え、さまざま細胞内物質により誘導されることが報告されているが、抗がん剤感受性の異なる大腸癌細胞において S100A10 の発現量が異なり、且つ L-OHP 感受性とこのタンパク質発現量が相関することを見出したのは本研究が初めてである。

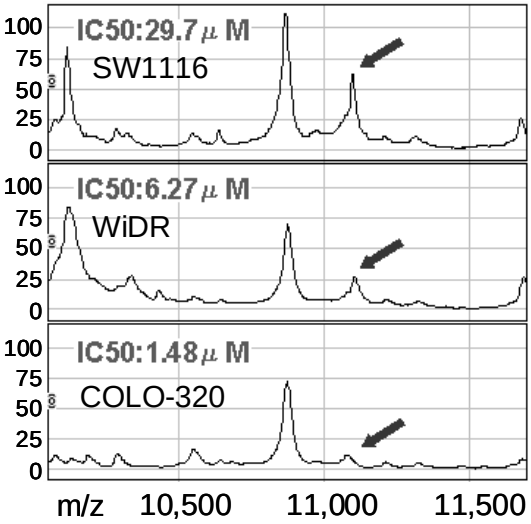

Fig.1 Expression Difference Mapping Analysis in human colorectal cancer cell-lines with different sensitivity to oxaliplatin (typical 3 cell-lines)

②抗がん剤曝露後の細胞内タンパク質発現プロファイリング

L-OHP 単剤、5-FU 単剤および L-OHP と 5-FU の併用の 3 通りの曝露条件において、抗がん剤曝露後に異なる発現挙動を示す 15 種類のタンパク質ピークを見出した。SN-38 と 5-FU についても、同様に各々単剤と併用の曝露条件において異なる発現挙動を示す 3 種類のタンパク質ピークを見出した。これらは、

L-OHP、SN-38 および 5-FU に対する反応性を薬剤投与後に評価しうるバイオマーカー候補物質であるとともに、各薬剤の併用メカニズムの分子機構解明につながると期待される。

(2) S100A10 タンパク質の機能解析

①発現調節機構の検討

L-OHP 感受性の異なる 8 種類のヒト大腸癌細胞において、S100A10 とその結合タンパク質である ANXA2 との発現量は強い相関を示した。S100A10 の発現には ANXA2 が関与している可能性が高い。

②RNA 干渉を用いたノックダウン実験

siRNA を用いて ANXA2 の発現をノックダウンした結果、ANXA2 に加えて S100A10 の発現も低下し、抗がん剤に対する感受性は増大する傾向を示した。S100A10 と ANXA2 はそれぞれの二量体が結合したヘテロテトラマーを形成していることが知られているが、①において S100A10 と ANXA2 の発現が強く相関すること、および ANXA2 のノックダウンにより S100A10 発現量も低下し L-OHP 感受性が変化する傾向を示したことから、L-OHP 感受性への影響については細胞内における両者の相互作用が関与していることが示唆された。

(3) 臨床応用に向けた基礎的検討

①大腸癌細胞培養上清における S100A10 の検出

S100A10 高発現細胞の培養上清からも S100A10 が検出された。当初、S100A10 は細胞内タンパク質として発見したが、この結果は S100A10 が細胞外に分泌される可能性を示す知見であり、血液をはじめとする細胞外液における検出可能性を示唆するものである。

②ヒト血清からの S100A10 検出の試み

ヒト血液検体を SELDI-TOF/MS により分析した結果、S100A10 とほぼ一致する 11kDa 付近にピークを検出した。

③S100A10 測定系の開発

②の結果にもとづき、ヒト血液検体あるいはその他の細胞外液を用いた S100A10 測定系を開発する目的で、ELISA 構築に着手した。ハイブリドーマ培養上清(候補抗体)の評価段階まで進めた。

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 24 件）

① Yusuke Tanigawara, Metabolomic and proteomic analyses for pharmacotherapy, Annual Congress of International Pharmaceutical Federation (FIP 2010), Aug.30, 2010, Lisbon (Portugal).

② Yusuke Tanigawara, Cancer Pharmacogenomics in Asia: Post-genome proteomic and metabolomic analysis for pharmacological responses to anticancer agents, 9th International Conference of the Asian Clinical Oncology Society, Aug.25, 2010, Gifu (Japan).

③Sayo Suzuki, Protein S100A10: Expression and correlation with sensitivity to oxaliplatin in colorectal cancer cells, American Association for Cancer Research Annual Meeting 2010, Apr.20, 2010, Washington, DC (USA).

④Akito Nishimuta, CE-TOFMS metabolome analysis for pharmacological response to CPT-11 in colorectal cancer cells with different chemosensitivities, American Association for Cancer Research Annual Meeting 2010, Apr.19, 2010, Washington, DC (USA).

⑤鈴木小夜,大腸癌細胞におけるS100A10のオキサリプラチン感受性予測タンパク質としての特異性，日本薬学会第130年会，2010.3.28，岡山.
⑥鈴木哲也，ヒト大腸癌細胞におけるSN-38曝露後のメタボローム変動解析，日本薬学会第130年会，2010.3.28，岡山.
⑦入江秀大，SN-38/5-FU併用に対する大腸癌細胞応答のプロテオーム・メタボローム解析第8回日本臨床腫瘍学会学術集会，2010.3.18，東京.
⑧生駒祐介、オキサリプラチン/5-FU併用に対する大腸がん細胞応答のプロテオーム・メタボローム解析，第8回日本臨床腫瘍学会学術集会，2010.3.18，東京.
⑨ Yusuke Tanigawara, Pharmaco-proteomics and metabolomics for personalized medicicine, Approach of individualized medicine in near-future, FIP and JSPHCS International Conference on Individualized Medicine: Bridging between Scientific and Clinical Studies, Oct.25, 2009, Nagasaki (Japan).
⑩鈴木小夜，プロテオーム解析によるオキサリプラチン感受性予測バイオマーカーの同定、第68回日本癌学会学術総会，2009.10.3，横浜.
⑪西牟田章戸， CE-TOFMSメタボローム解析による5-FU曝露後代謝変動の細胞間比較，第68回日本癌学会学術総会，2009.10.1，横浜.
⑫鈴木哲也，ヒト大腸癌細胞におけるSN-38曝露後のメタボローム変動，第26回日本TDM学会・学術大会，2009.6.13，新潟.
⑬Akito Nishimuta, CE-TOFMS metabolome analysis comparing cellular responses to 5-FU exposure in colorectal cancer cells with different chemosensitivities. American Association for Cancer Research Annual Meeting 2009, Apr.21, 2009, Denver (USA).
⑭Sayo Suzuki, S100A10 as a potential protein biomarker for oxaliplatin sensitivity in colorectal cancer cells, American Association for Cancer Research Annual Meeting 2009, Apr.20, 2009, Denver (USA).
⑮鈴木小夜，プロテオーム解析によるオキサリプラチン感受性予測バイオマーカーの同定、日本薬学会第129年会，2009.3.28，京都.
⑯Mitsuhiro Watanabe, The blood biomarkers to predict sensitivity to CPT-11 by metabolome analysis, CBI Society Annual Meeting 2008, Oct.22, 2008, Tokyo (Japan).
⑰Sayo Suzuki, Protein biomarkers for predicting sensitivity to oxaliplatin by SELDI-TOF MS screening, CBI Society Annual Meeting 2008, Oct.22, 2008, Tokyo (Japan).
⑱Akito Nishimuta, Intracellular metabolite kinetics after 5-FU exposure by CE-TOFMS metabolome analysis, American Association for Cancer Research Annual Meeting 2008. Apr.15, 2008, San Diego (USA).
⑲Sayo Suzuki, Proteomic approach to discover new biomarkers that can predict oxaliplatin sensitivity by using SELDI-TOF MS, American Association for Cancer Research Annual Meeting 2008, Apr.15, 2008 , San Diego (USA).
⑳Eri Arita, Metabolomic screening for blood biomarkers to predict sensitivity to CPT-11 by using CE-TOFMS, American Association for Cancer Research Annual Meeting 2008, Apr.15, 2008, San Diego (USA).

〔図書〕（計２件）
①谷川原祐介，PK/PD バイオマーカーに基づ

く抗がん剤治療の個別化，メディカルビュー社，Mebio Oncology6，88-98(2009)．
②西牟田章戸，谷川原祐介，抗癌剤反応性のメタボローム解析－癌細胞の薬剤応答解明と個別化医療実現に向けた新戦略，医歯薬出版，医学のあゆみ 231，1159-1164（2009）．

〔産業財産権〕
○出願状況（計 3 件）
①名称：抗がん剤の感受性判定方法
発明者：谷川原祐介、鈴木小夜、入江秀大
西牟田章戸、鈴木哲也、杉本伸二
権利者：学校法人慶應義塾、
株式会社ヤクルト本社
種類：特許
番号：PCT/JP2010/69362
（基礎出願：特願2010－020456
特願2009－250257)
出願年月日：2010 年 10 月 29 日
国内外の別：国内、外国
②名称：抗がん剤の感受性の判定方法
発明者：谷川原祐介、鈴木小夜、生駒祐介
西牟田章戸、鈴木哲也、杉本伸二
権利者：学校法人慶應義塾、
株式会社ヤクルト本社
種類：特許
番号：PCT/JP2010/69363
（基礎出願：特願2010－020457
特願2009－250259)
出願年月日：2010 年 10 月 29 日
国内外の別：国内、外国
③名称：抗がん剤感受性の判定方法
発明者：谷川原祐介、鈴木小夜、杉本伸二
権利者：学校法人慶應義塾、
株式会社ヤクルト本社
種類：特許
番号：PCT/JP2009 /000374
（基礎出願：特願2008-223384
特願2008-021124)
出願年月日：2009 年 1 月 30 日
国内外の別：国内、外国

〔その他〕
日本経済新聞記事「大腸がん、薬の効き目予測、たんぱく質、量で個人差」2009.3.23

６．研究組織
(1)研究代表者
谷川原　祐介（TANIGAWARA YUSUKE）
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号：30179832

(2)研究分担者
渡辺　光博（WATANABE MITSUHIRO）
慶應義塾大学・医学部・准教授
研究者番号：10450842