

氏 名	藤 岡 大 也
(ふりがな)	(ふじおか ひろや)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲 第 号
学位審査年月日	平成28年1月13日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題名	Comparative proteomic analysis of paclitaxel resistance-related proteins in human breast cancer cell lines (ヒト乳癌細胞株におけるパクリタキセル耐性関連 タンパク質のプロテオーム解析)
論文審査委員	(主) 教授 朝 日 通 雄 教授 矢 野 貴 人 教授 大 道 正 英

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

《目 的》

乳癌治療では、手術や放射線照射の局所治療と全身治療である薬物治療の組み合わせが重要である。進行再発乳癌に対しては、化学療法の奏効率は30~60%程度であり完全奏効率は数%にすぎない。進行再発乳癌は未だ予後不良の疾患であり、その大きな要因として抗癌剤に対する感受性の低下(耐性獲得)が挙げられる。

抗癌剤耐性に関連する因子を検索するためにはmRNA、タンパク質レベルの解析方法があるが、多くの場合mRNAとタンパク質の発現レベルが比例しないことを考えると、細胞内で機能するタンパク質の発現変動を調べる必要がある。

本研究では乳癌の化学療法における代表的な抗癌剤の一つであるタキサン系薬剤のパクリタキセルの抗癌剤耐性に関連するタンパク質を同定し、その耐性機構を解明することを

目的とする。

《方 法》

ヒト乳癌細胞株（MCF-7、以下親株）とそのパクリタキセル耐性株（MCF-7/PTX、以下耐性株）を用い、それぞれの細胞株からタンパク質を抽出した。タンパク質の分離は、汎用される等電点二次元電気泳動法の欠点（再現性の悪さ、スポットの分裂、添加量の少なさ）を改良した改良型等電点二次元電気泳動法を用いた。各々の試料約 350 μg を用いて二次元電気泳動を行い、ゲルをクマジーブルー染色し、Prodigy 2D 解析ソフトを用いて統計的に有意かつ平均強度が 1.5 倍以上変化したスポットを検出した。スポットをゲルより切り抜き、ゲル内トリプシン消化した後に酵素消化物を溶媒抽出した。得られたトリプシン断片化ペプチドを MALDI-TOF/TOF による質量分析を行い、Swiss-Prot タンパク質データベースに基づいてタンパク質を同定した。同定したタンパク質についてその機能を考察した。特に抗癌剤耐性と関連性の高いと思われるタンパク質については、siRNA 法を用いてその細胞内での発現を減少させることで耐性の消失があるかを MTT assay を用いて確認した。

《結 果》

用いたパクリタキセル耐性株は親株に比べ IC_{50} 値で 75 倍耐性になっていることを確認した。この親株と耐性株で発現するタンパク質をプロテオーム解析した結果、耐性株において発現が増加したスポットを 13 個、減少したスポットを 17 個検出し質量分析による解析を行った。同一のタンパク質が翻訳後修飾を受けたスポットがあるため、最終的に発現が増加したタンパク質として 11 個、発現が減少したタンパク質として 12 個を同定した。発現が亢進しているタンパク質のほとんどがアポトーシスや癌に関連すると報告されており、そのうちの 1 つである Peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase A（以下、PPIA）に注目した。耐性株における PPIA の発現を siRNA 法を用いて減少させ、それを Western blot 法で確認した。種々の濃度のパクリタキセルによる細胞生存率を比較すると、耐性株にお

ける PPIA のノックダウンによって 13 倍ほど（親株の IC₅₀ 値に比べ 6 倍まで）パクリタキセル耐性が減弱したことを確認した。

《考 察》

今回同定した耐性株において発現が亢進しているタンパク質はその作用機序から大きく 3 つに分類される。ストレス応答タンパク質、代謝系酵素、細胞骨格タンパク質の 3 つである。その中で今回着眼した PPIA はストレス応答タンパク質の一つであり、タンパク質のフォールディングを促進することが報告されている。本研究において、耐性株における PPIA の発現を抑制することでパクリタキセル耐性が減弱することが示されたことより、耐性獲得において PPIA が重要な役割をしていることが示された。しかし、その抑制解除の程度は親株ほどの感受性回復までには至らなかった。そこにはパクリタキセル耐性獲得には複数のメカニズムが組み合わされていることも示唆される。

《結 論》

プロテオーム解析を用いることによって、ヒト乳癌細胞株においてパクリタキセル耐性に関連するタンパク質を 23 種類同定した。耐性株で発現が亢進していた PPIA はパクリタキセル耐性における重要な関連タンパク質であることを示した。本論文での知見は、今後の耐性獲得のマーカーや新たな治療の可能性を探る上で重要であると考えられる。

論文審査結果の要旨

本研究は、乳癌の化学療法における代表的な抗癌剤の一つであるタキサン系薬剤のパクリタキセルの抗癌剤耐性に関連するタンパク質を同定し、その耐性機構を解明することを目的としたものである。

申請者は、ヒト乳癌細胞株 (MCF-7、以下親株) とそのパクリタキセル耐性株 (MCF-7/PTX、以下耐性株) を用いプロテオーム解析を行った。すなわち、それぞれの細胞株からタンパク質を抽出し、汎用される等電点二次元電気泳動法の欠点である再現性の悪さ、スポットの分裂、添加量の少なさを改良した等電点二次元電気泳動法と MALDI-TOF/TOF による質量分析を行い、親株とパクリタキセル耐性株で発現が変動したタンパク質を同定した。発現が増加したタンパク質は 11 個、発現が減少したタンパク質は 12 個認められた。発現が増加しているタンパク質のほとんどがアポトーシスや癌に関連すると報告されていたが、その中で、タンパク質のフォールディングを促進するストレス応答タンパク質で、抗癌剤耐性との関連性が高いと報告されている Peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase A (以下、PPIA) に注目して研究を進めている。そして、耐性株における PPIA の発現を siRNA 法を用いて減少させることで、13 倍ほど (IC₅₀ 値で 75 倍から 6 倍まで) パクリタキセル耐性が減弱したことを確認した。

申請者は、プロテオーム解析によって PPIA がパクリタキセル耐性における重要な関連タンパク質であることを明らかにしている。本論文での知見は、今後の耐性獲得のマーカーや新たな治療の可能性を探る上で重要であると考えられる。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条第 1 項に定めるところの博士 (医学) の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Oncology Letters in press