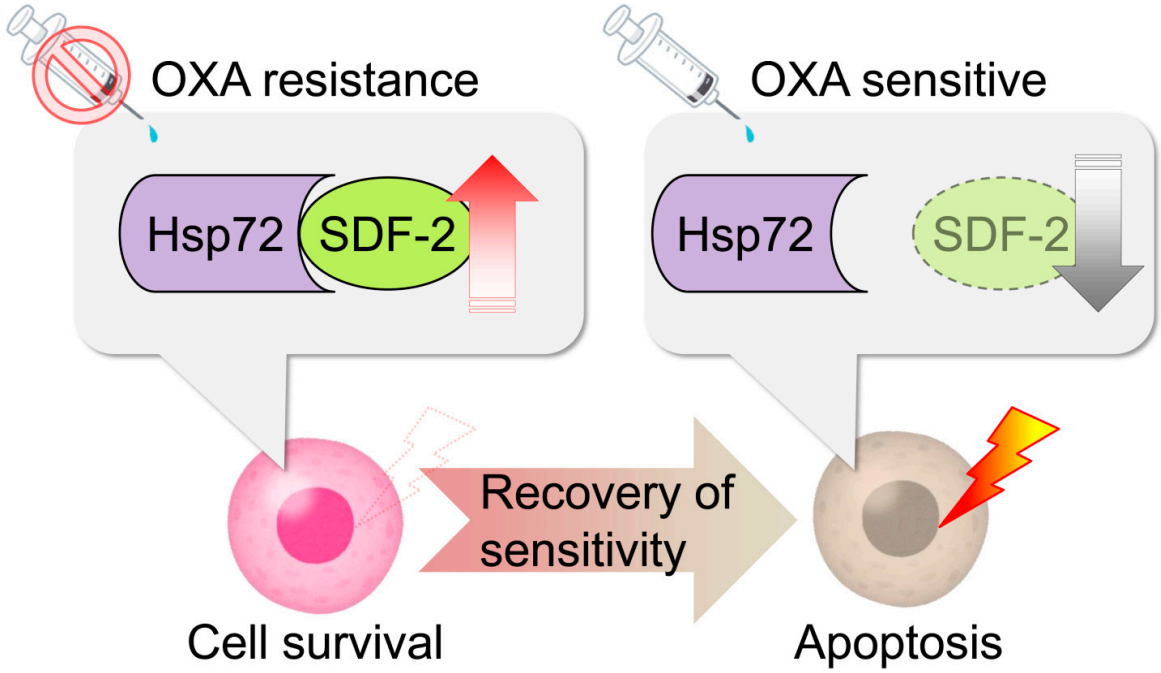
146　オキサリプラチン耐性因子SDF-2の機能解析	田中　昌子

【目的】スキルス胃がんは腹膜やリンパ節に転移しやすい難治性がんの 1 つであり、発見時には外科的治療が困難な場合も多く化学療法に頼らざるを得ない。近年、オキサリプラチンは本邦において切除不能進行・再発胃がんに適応となったが、早期に耐性が生じるため奏効する期間は短い。オキサリプラチン耐性の分子機構は報告されているものの、これらの耐性因子を標的とした治療薬の開発には至っておらず、耐性の解除が化学療法における重要な課題である。著者らはスキルス胃がん細胞株を用い、オキサリプラチンの新規耐性因子として Stromal cell-derived factor-2（SDF-2）を同定した。SDF-2 は分子シャペロンである Hsp72 により安定化されることで、オキサリプラチン耐性を生じさせるが、SDF-2 が耐性を生じさせる分子機構については解明できていない。そこで本研究では、SDF-2 の分子機能の解明を中心にオキサリプラチンの新たな耐性機構の解明を目指した。

【方法】オキサリプラチンまたは小胞体ストレスの誘導剤を細胞に添加したときの、遺伝子発現およびタンパク質発現を定量し、ストレス条件下における SDF-2 の分子機能を評価した。遺伝子発現はリアルタイム PCR 法にてタンパク質発現は免疫蛍光染色およびウェスタンブロット法にて評価した。

【結果】SDF-2 はこれまでに報告されている耐性因子の発現に影響を与えることなく、胃がん細胞株に耐性を獲得させていることが明らかとなった。さらに、SDF-2 はオキサリプラチンだけではなく、小胞体ストレスによってもタンパクレベルが上昇することから、ストレス応答を制御する機能を持つことが示唆された。しかし、SDF-2 は小胞体ストレス応答のシグナル伝達には影響を与えないことから、タンパク質プロセシング、小胞輸送やカルシウム濃度制御など小胞体機能の正常化に貢献し、オキサリプラチン耐性を生じさせている可能性が示唆された。

SDF-2 の安定化はオキサリプラチン耐性を生じさせる



146. オキサリプラチン耐性因子 SDF-2 の機能解析

田中　昌子

大阪市立大学 大学院医学研究科 薬効安全性学

Key words：抗がん剤耐性，オキサリプラチン，小胞体ストレス応答

緒　言

スキルス胃がんは進行が早く、腹膜やリンパ節に転移しやすい難治性がんの 1 つであり、5 年生存率は 10～20%にとどまっている。発見時には外科的治療が困難な場合も多く化学療法に頼らざるを得ない［1］。近年、オキサリプラチンは本邦において切除不能進行・再発胃がんに適応となったが、早期に耐性が生じるため奏効する期間は短い［2］。オキサリプラチン耐性の分子機構としては、薬剤排出ポンプの発現上昇、薬剤取り込みポンプの発現低下、グルタチオンなどの結合による無毒化、また DNA 修復およびアポトーシス抑制の亢進が知られている［3］。しかし、これらの耐性因子を標的とした治療薬の開発には至っておらず、耐性の解除が化学療法における重要な課題である。著者らはスキルス胃がん細胞株を用い、オキサリプラチンの耐性因子として Stromal cell-derived factor-2（SDF-2）を同定した［4］。しかし、SDF-2 がどのような分子機構によってオキサリプラチン耐性を生じさせるのか解明できていない。本研究では、SDF-2 の分子機能の解明を中心にオキサリプラチンの新たな耐性機構の解明を目指す。

方　法

1. Real-Time PCR

ISOGEN（ニッポン・ジーン）を用いて抽出したトータル RNA 1 μg から ReverTra Ace qPCR RT kit（TOYOBO）を用いた逆転写反応により cDNA を合成した。Real-Time PCR は FastStart Universal SYBR Green Master（Merck）を用いたインターカレーター法にて cDNA を増幅させ、7500 Fast real-time cycler（Applied Biosystems）にて蛍光強度をモニターおよび定量した。18s rRNA を内部標準とし相対定量解析を行った。

2. 免疫蛍光染色

細胞は PBS（−）で 2 回洗浄した後、4% PFA/PBS で固定した。0.1% Triton X-100/PBS で細胞膜を透過処理し、抗 FLAG 抗体（SIGMA-ALDRICH）または抗 Calreticulin 抗体（Cell Signaling Technology）を反応させた後、Goat anti-Rabbit 二次抗体 Alexa Fluor 488 または Goat anti-Mouse 二次抗体 Alexa Fluor 594（Invitrogen）により検出した。細胞は共焦点顕微鏡 Leica TCS SP5（Leica Microsystems）を用いて観察した。

3. ウェスタンブロット

細胞は PBS（−）で 2 回洗浄し、細胞溶解液（50 mM HEPES-NaOH、pH 7.5、150 mM NaCl、1% NP-40、0.65% CHAPS、5 mM EDTA、1 mM PMSF、PI cocktail）を用いて可溶化した。細胞抽出液に含まれるタンパク質は SDS-PAGE により展開した後、一次抗体および HRP 標識二次抗体（Merck）により検出した。化学発光は LAS-4000 lumino-image analyzer system（GE Healthcare Bio-Science）により検出した。

結果および考察

1. SDF-2 は既知のオキサリプラチン耐性因子の発現に影響しない

OCUM-2M/OXA 細胞がどのような分子機構によりオキサリプラチン耐性を獲得しているのか明らかにするために、オキサリプラチンの耐性因子として報告されている 9 遺伝子［3］の mRNA 発現量を感受性株である OCUM-2M 細胞

と比較した（図 1）。その結果、薬剤排出のポンプとして知られる ABC トランスポーターの ABCB1 および ABCG2 の発現が OCUM-2M/OXA 細胞において有意に増加していたことから（図 2）、これらの分子が OCUM-2M/OXA 細胞のオキサリプラチン耐性に関与していることが示唆された。

そこで、SDF-2 が ABC トランスポーターの発現調節を介して耐性を生じさせているか明らかにするために、SDF-2 ノックダウンが ABCB1 および ABCG2 発現に与える影響を調べた。予想に反して、SDF-2 ノックダウンは ABCB1 の発現を上昇させる傾向にあり、ABCG2 は有意に発現が上昇した（図 3）。OCUM-2M/OXA 細胞における SDF-2 ノックダウンは耐性を解除し、オキサリプラチン感受性を回復させる［4］。しかし、2 つの ABC トランスポーターの遺伝子発現は減少するどころか、むしろ上昇したことから、ABCB1 および ABCG2 は SDF-2 を介したオキサリプラチン耐性に関与しないだけではなく、OCUM-2M/OXA 細胞の主要な耐性因子といて機能している可能性は低いと考えられる。

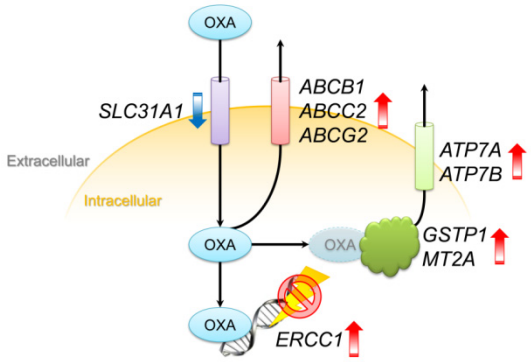


図 1. オキサリプラチン耐性の分子メカニズム

オキサリプラチンの耐性因子として報告されている遺伝子のうち、本研究において遺伝子発現解析を行った遺伝子名およびその耐性機構を示した。青矢印は耐性の獲得に伴い発現が減少する遺伝子を、赤矢印は発現が上昇する遺伝子を示す。

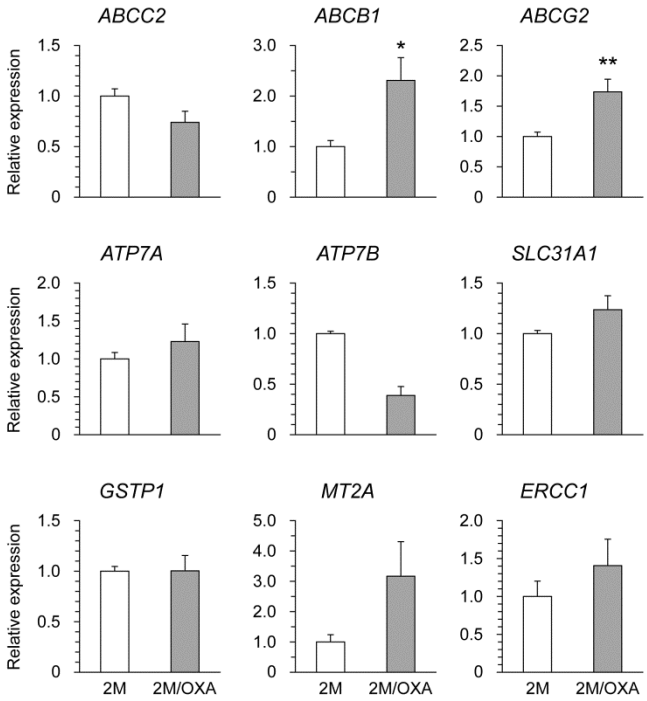


図 2. OCUM-2M および OCUM-2M/OXA 細胞におけるオキサリプラチン耐性因子の発現比較

図 1 で示したオキサリプラチン耐性因子の遺伝子発現を Real-Time PCR 法にて定量した。

2M，OCUM-2M；2M/OXA，OCUM-2M/OXA. *$p < 0.05$；**$p < 0.01$ by Student's t-test (n = 3)。

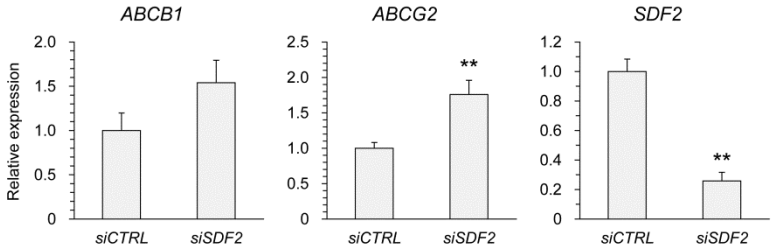


図 3. SDF-2 ノックダウンが耐性因子の発現に与える影響

siRNA 導入 48 時間後に細胞を回収し、Real-Time PCR 法にて遺伝子発現を定量した。

siCTRL, a rondom control siRNA ; siSDF2, siRNA against SDF2. $^{**}p < 0.01$ by Student's *t*-test (n = 3).

2. 小胞体ストレスにより SDF-2 のタンパクレベルが上昇する

SDF-2 が既知の耐性因子の発現調節を介さずに耐性を生じさせることから、次に SDF-2 の機能を推定する目的で SDF-2 の細胞内局在を調べた。HeLa 細胞に SDF-2-FLAG 融合タンパク質を発現させたところ、小胞体のマーカーである Calreticulin と共局在したことから、小胞体に局在することが示唆された（図 4A）。HEK293 細胞を用いた研究においても SDF-2 が小胞体に局在すること、さらに分子シャペロンである Grp78/BiP と協調的に機能することで小胞体内のタンパク質品質管理に関与することが報告されている［5］。そこで、SDF-2 が小胞体ストレス応答に関与するか明らかにするために、HeLa 細胞に小胞体ストレスの誘導剤であるツニカマイシンを添加し、SDF-2 発現を調べた。その結果、GRP78 の経時的なタンパクレベルの上昇に伴い、SDF-2 レベルも上昇した（図 4B）。しかし、GRP78 はツニカマイシン刺激によって遺伝子レベルで強く発現誘導されたのに対し、SDF-2 は遺伝子レベルでの変化はほとんど見られなかった（図 4C）。したがって、SDF-2 は小胞体ストレスにより転写レベルで発現が誘導されないことが明らかとなった。SDF-2 は小胞体内腔のタンパク質 ERdj3 によって安定化されるため［5］、小胞体ストレスにより安定化が促進した結果、タンパクレベルが上昇した可能性がある。

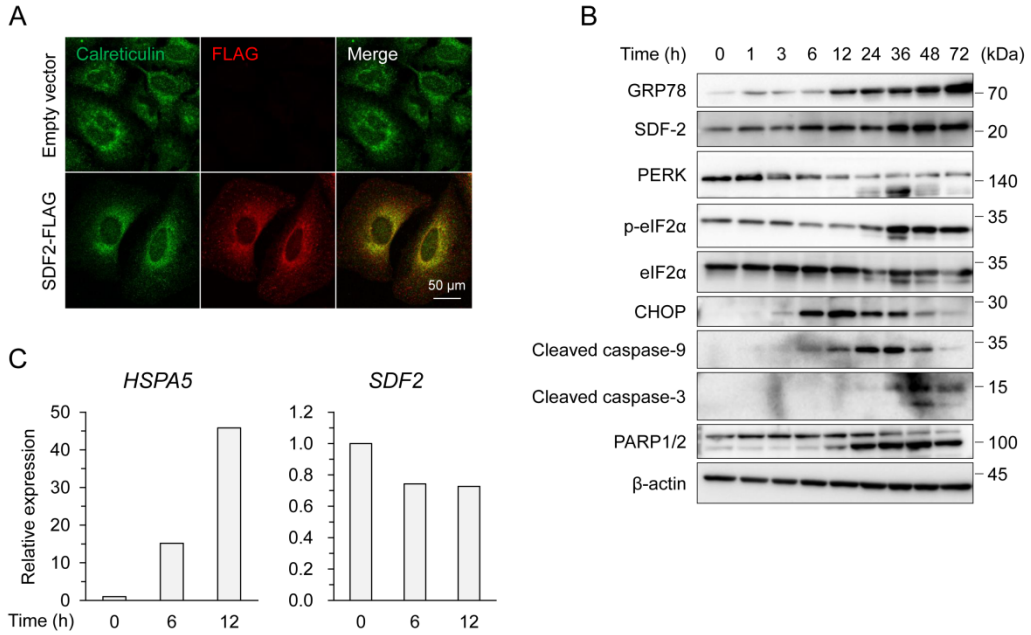


図 4. 小胞体ストレスにより SDF-2 のタンパクレベルが上昇する

A) HeLa 細胞に Empty vector または SDF-2-FLAG を導入し、48 時間後に免疫蛍光染色にて FALG および Calreticulin を検出した。B) HeLa 細胞に 2 μg/ml ツニカマイシンを添加し 0～72 時間培養した。細胞抽出液中のタンパク質は SDS-PAGE にて展開し、ウェスタンブロット法にてタンパク質発現を検出した。β-actin はローディングコントロールとして用いた。C) HeLa 細胞に 2 μg/ml ツニカマイシンを添加し 0, 6, 12 時間培養後、total RNA を抽出し、Real-Time PCR 法にて mRNA 発現を定量した(n = 1)。

3. SDF-2 は小胞体ストレス応答に影響しない

小胞体ストレスにより SDF-2 のタンパクレベルが上昇したため、SDF-2 が小胞体ストレス応答のシグナル伝達に影響を与えるか調べた。CRISPR-Cas9 システムにより樹立した SDF-2 ノックアウト細胞 HeLa$^{SDF2-/-}$ 細胞と野生型 HeLa 細胞を比較した結果、SDF-2 ノックアウト細胞では eIF2α の基底レベルの発現が減少していたが、小胞体ストレスの誘導剤であるタプシガルギンの添加に伴う eIF2α のリン酸化や PERK および GRP78 発現の経時的な変化には影響を与えなかった（図 5A）。したがって、SDF-2 は小胞体ストレス応答のうち少なくとも PERK 経路の活性調節には影響を与えないことが明らかとなった。さらに、OCUM-2M/OXA 細胞を用い、SDF-2 の PERK 経路への関与を調べた結果、SDF-2 ノックダウンはオキサリプラチンの感受性を回復させアポトーシスのマーカーである cleaved caspase-3 を増加させたが、やはり GRP78 発現および eIF2α のリン酸化レベルはコントロール群との間で差はなかった（図 5B）。これは、SDF-2 ノックダウンによりオキサリプラチンが誘導するアポトーシスが小胞体ストレス応答を介して誘導されていないことを示している。また、ツニカマイシンにより増加した SDF-2 タンパク質が小胞体ストレス依存的なアポトーシス誘導因子である CHOP の発現を抑制できないことからも（図 4B）、SDF-2 は小胞体ストレス応答の活性を直接的に制御していないと考えられる。以上より、SDF-2 は小胞体ストレス応答の活性を調節してオキサリプラチン耐性を生じさせているわけではないと考えられる。

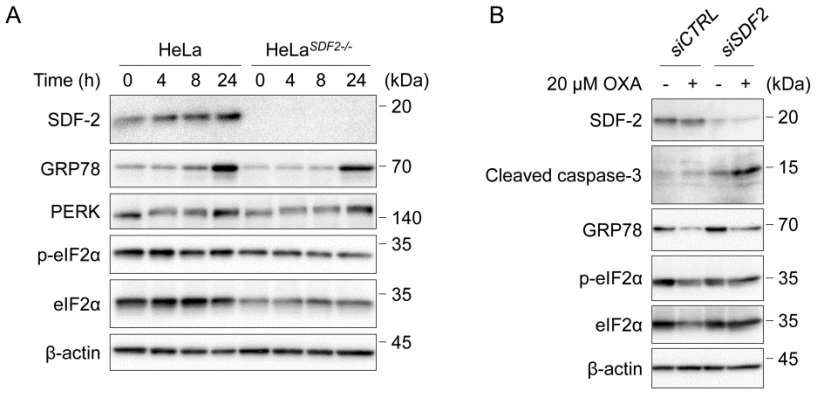


図 5. SDF-2 は小胞体ストレス応答に影響しない

A）HeLa 細胞に 2 μg/ml タプシガルギンを添加し 0～24 時間培養した。細胞抽出液中のタンパク質は SDS-PAGE にて展開し、ウェスタンブロット法にて検出した。β-actin はローディングコントロールとして用いた。

B）OCUM-2M/OXA 細胞に 20 μM オキサリプラチンを添加し 48 時間に細胞を回収した。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、早稲田大学先進理工学部生命医科学科の合田亘人教授、黄山勝（修士 1 年）、大阪市立大学大学院医学研究科研究支援プラットフォームの塩田正之講師、大阪市立大学附属病院薬剤部の髙橋克之主査である。本稿をまとめるにあたり、ご支援を賜った上原記念生命科学財団には厚く御礼申し上げる。

文　献

1） Nakamura R, Saikawa Y, Kumagai K, Kiyota T, Ohashi M, Yoshida M, Kubota T, Kumai K, Kitajima M. A patient with gastric cancer and liver metastases successfully treated with combination chemotherapy including S-1. Int J Clin Oncol. 2007 Aug;12(4):295-9. Epub 2007 Aug 20. PMID:17701010 DOI:10.1007/s10147-006-0648-4

2） Yamada Y, Higuchi K, Nishikawa K, Gotoh M, Fuse N, Sugimoto N, Nishina T, Amagai K, Chin K, Niwa Y, Tsuji A, Imamura H, Tsuda M, Yasui H, Fujii H, Yamaguchi K, Yasui H, Hironaka S, Shimada K, Miwa H, Hamada C, Hyodo I. Phase III study comparing oxaliplatin plus S-1 with cisplatin plus S-1 in chemotherapy-naïve patients with advanced gastric cancer. Ann Oncol. 2015 Jan;26(1):141-8. Epub 2014 Oct

14. PMID: 25316259 DOI: 10.1093/annonc/mdu472

3) Dilruba S, Kalayda GV. Platinum-based drugs: past, present and future. Cancer Chemother Pharmacol. 2016 Jun;77(6):1103-24. Epub 2016 Feb 17. PMID:26886018 DOI: 10.1007/s00280-016-2976-z

4) 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. 2016 Aug 1;378(1):8-15. Epub 2016 May 6. PMID:27157913 DOI: 10.1016/j.canlet.2016.05.002

5) Fujimori T, Suno R, Iemura SI, Natsume T, Wada I, Hosokawa N. Endoplasmic reticulum proteins SDF2 and SDF2L1 act as components of the BiP chaperone cycle to prevent protein aggregation. Genes Cells. 2017 Aug;22(8):684-698. Epub 2017 Jun 9. PMID:28597544 DOI: 10.1111/gtc.12506