

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20195

研究課題名(和文) 頭頸部癌におけるタキソール耐性にCDKN3は関与するか

研究課題名(英文) Analysis of role of CDKN3 in taxan resistant human head and neck cancer

研究代表者

伊藤 有未 (Ito, Yumi)

福井大学・学術研究院医学系部門(附属病院部)・特命助教

研究者番号：00646458

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：タキソール耐性咽頭癌細胞株T3M-1Txではタキソール刺激後に細胞周期解析においてG2M期に誘導される細胞の割合が有意に減少し、G1/S期停止の割合が増加していた。PCRアレイでG1期停止に関与する遺伝子を解析し、その1つのCDKN3に着目した。T3M-1TxにおいてCDKN3を抑制すると、タキソール耐性が減弱することがフローサイトメトリー、MTTアッセイ、コロニーアッセイにおいて示された。またT3M-1Txはタキソールへの交叉耐性も持っているが、CDKN3抑制によりタキソール耐性も減弱した。本研究によりCDKN3をターゲットとした頭頸部癌におけるタキサン耐性克服の可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：We established paclitaxel-resistant cancer cell line T3M-1 TX, from T3M-1 human oropharyngeal cancer cell line. T3M-1TX cells have docetaxel resistance in addition to paclitaxel. T3M-1TX cells show that paclitaxel treatment induces G1/S arrest and G2/M transition of the cell cycle. In the result of PCR array, we focused on Cyclin dependent kinase inhibitor 3 (CDKN3), a regulator of G1/S arrest and G2/M transition. The specific siRNA for CDKN3 reduced the expression of CDKN3, resulting in enhanced apoptosis after paclitaxel and docetaxel treatment. The MTT assays and clonogenic cell survival assays proved that inhibition of CDKN3 reduced cell viability after paclitaxel and docetaxel treatment. CDKN3 is a novel molecular target to overcome taxane-resistance of head and neck cancers.

研究分野：耳鼻咽喉科、頭頸部癌

キーワード：CDKN3 タキサン耐性 頭頸部癌

1. 研究開始当初の背景

当教室では頭頸部癌のタキソール耐性のメカニズムを探るために、ヒト咽頭癌細胞株 T3M-1 においてタキソール耐性株 T3M-1TX を樹立した。T3M-1TX においてタキソール投与 6 時間後の mRNA の発現変化を PCR アレイにて網羅的に解析すると 24 の遺伝子においてその発現がコントロールと比較し 2 倍以上に上昇することが分かった。これらの遺伝子の 3 分の 1 は細胞周期において G1/S 期停止や G2/M 期移行を誘導するものであった。

実際にタキソール投与 12 時間後の T3M-1 と T3M-1TX の細胞周期をフローサイトメトリーで解析すると、T3M-1 では G2/M 期に細胞が誘導されるのに対し、T3M-1TX では細胞は G2/M 期へ誘導される細胞の割合が減少し、G1 期に誘導される細胞が増加していることが分かった。そこで先に行った PCR アレイで発現が上昇していた遺伝子のうち、発現が 4 倍以上に増加した Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 3 (CDKN3) に着目した。

CDKN3 の機能を解析するために、T3M-1TX において RNAi で CDKN3 の発現を抑制し、タキソールで処理して 24 時間後の細胞生存率を MTT アッセイにて解析すると、初期データではあるが、生存率が低下することが分かった。また、タキソール投与 24 時間後の細胞周期を解析すると、CDKN3 を抑制するとアポトーシスに誘導される細胞が約 50% に増加するという結果が得られた。このことから CDKN3 が T3M-1TX においてタキソール耐性に関わっていることが示唆された。

2. 研究の目的

T3M-1TX のタキソール耐性機序の仮説をたてた。T3M-1TX においては、タキソール投与によって CDKN3 の発現が上昇することにより、早期に有糸分裂を脱出しスピンドルチェックポイントで生じるアポトーシスを逃れる。また、G1 期停止を誘導して M 期にリエントリーするのを阻害しアポトーシスを逃れると

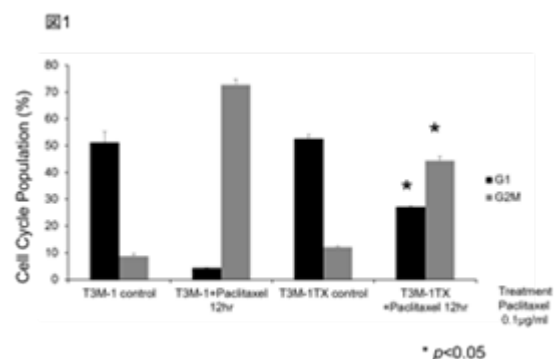
いうものである。この仮説を証明することで、CDKN3 がタキソール耐性を克服するターゲット分子であるかどうかを明らかにし、タキソール耐性癌治療へ応用するための基盤とする。

3. 研究の方法

- (1) タキソール耐性咽頭癌細胞株 T3M-1TX においてタキソール処理によって CDKN3 が誘導されることを確認する。T3M-1TX においてタキソール刺激後に細胞周期がどのように変化しているか解析する。
- (2) CDKN3 を抑制することによってタキソール耐性能を減弱できるかを、MTT アッセイ、フローサイトメトリーで解析する。
- (3) 他の頭頸部癌細胞株においてタキソール耐性株を作成し、CDKN3 がタキソール耐性に関わっているかを解析する
- (4) T3M-1TX がタキソールと同じタキサン系薬剤であるタキソテルにも交叉耐性があるのか検討する。

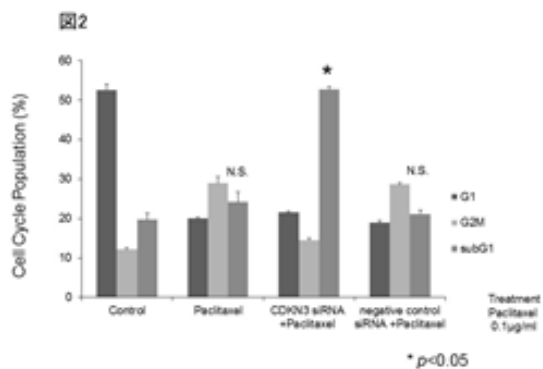
4. 研究成果

(1) タキソール耐性咽頭癌細胞株 T3M-1 において CDKN3 の発現がタキソール刺激後に誘導されることをリアルタイム PCR にて確認した。T3M-1TX においてタキソール刺激後に細胞周期解析を行ったところ、コントロールと比較し G2M 期に誘導される細胞の割合が有意に減少しており、細胞が早期の M 期脱出をしていること、タキソール刺激が G1 期停止に関与していることが分かった。(図 1)

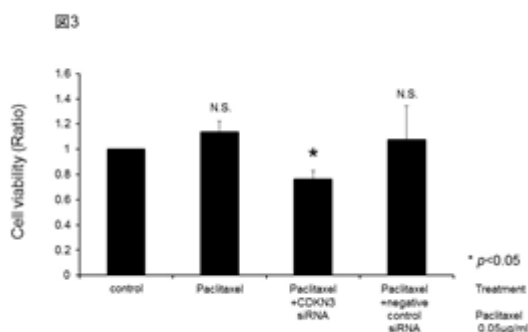


(2) タキソール耐性株 T3M-1TX において、siRNA を用いて CDKN3 を抑制できることをリアルタイム PCR で確認した。

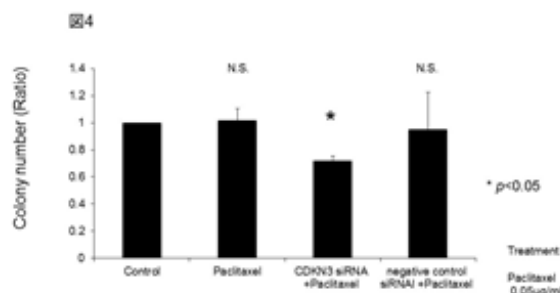
この siRNA を用いて T3M-1TX 株において CDKN3 を抑制すると、タキソール耐性が減弱し、アポトーシスに陥る細胞数が増加することがフローサイトメトリーにて確認できた。(図2)



MTT アッセイにおいても同様に siRNA で CDKN3 を抑制すると、タキソール耐性が減弱し、細胞生存率が低下することが確認できた。(図3)



コロニーアッセイにおいても同様に siRNA で CDKN3 を抑制すると、タキソール耐性が減弱し、細胞生存率が低下することが確認できた。(図4)

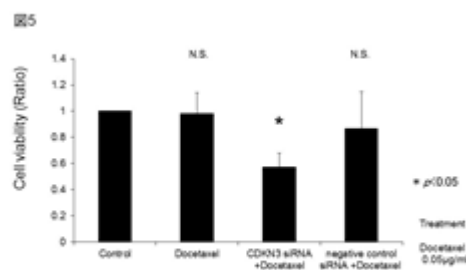


(3) T3M-1 以外のタキソール耐性頭頸部癌細胞株においても CDKN3 がタキソール耐性に関与しているか検証を行うため、SAS、HSC-3、Ho-1-u-1 においてタキソール耐性株の作成を試みた。しかしながら、これらの細胞株ではタキソールの濃度を上昇させていく過程において細胞死、細胞変形が生じたため、タキソール耐性株の作成は成し得なかった。

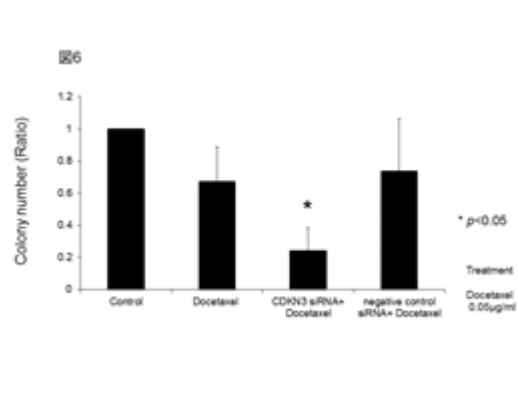
(4) T3M-1TX がタキソールと同じタキサン系のタキソテールにも交叉耐性があるのかを検討した。

MTT アッセイにおいて T3M-1TX はドセタキセル耐性も獲得していることを確認した。

そこで T3M-1TX において CDKN3 を siRNA で抑制し、タキソテール添加後に MTT アッセイを行ったところ、タキソテール耐性が減弱し、細胞生存率が低下することが分かった。(図5)



コロニーアッセイにおいても siRNA で CDKN3 を抑制するとタキソテル耐性が減弱し、細胞生存率が低下することが分かった。(図6)



以上の結果から、T3M-1TX ではタキソール刺激後、G2/M 分画が減少し、G1 分画が増加するが、CDKN3 の発現を抑制することによって、G1/S 期停止が解除され、T3M-1TX のタキソール耐性を減弱させることが分かった。同様に CDKN3 抑制によってタキソールへの交叉耐性も減弱することが示された。

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)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

成田憲彦、CDKN3 抑制は頭頸部癌細胞株におけるタキサン耐性を減弱する、日本頭頸部癌学会、2016年6月9日、ソニックシティ(埼玉県さいたま市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 有未 (Ito Yumi)

福井大学・学術研究院医学系部門(附属病院部)・特命助教

研究者番号: 00646458

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()