

平成21年 5月 18日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19791480

研究課題名（和文）口腔癌のクロマチン修飾制御によるシスプラチン感受性の増強

研究課題名（英文）Enhancement of CDDP sensitivity by chromatin modification in OSCC

研究代表者

鈴木 麻衣子（SUZUKI MAIKO）

東北大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：70420049

研究成果の概要：本研究では、口腔扁平上皮癌細胞株（HSC-2, -3, -4）、および p53 野生型の肺癌細胞株 A549 を用いて、エピジェネティクス制御化合物である Zebularine（ZEB）と suberoylanilide hydroxamic acid（SAHA）と抗癌剤（CDDP, 5-FU）の併用効果による細胞毒性・アポトーシス誘導効果を検討し、以下の研究成果を得た。【結果】HSC-3 細胞では、CDDP 単独処理に比較して ZEB の前処理または SAHA の同時処理で CDDP による細胞毒性が有意に増強した。CDDP 単独で 30%、CDDP/ZEB または CDDP/SAHA で 80% のアポトーシス誘導が確認された。一方、5-FU の処理では、5-FU/SAHA でアポトーシス誘導の増強が観察されたが、5-FU/ZEB は逆に 5-FU の細胞毒性を減弱するという、興味深い知見が得られた。このことから、口腔癌の抗癌剤感受性にはエピジェネティクス制御が関与し、ZEB や SAHA と抗癌剤の併用は薬剤感受性増強に有効であることが示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	0	1,800,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	420,000	3,620,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯科・外科系歯学

キーワード：臨床腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

口腔癌は临床上重大な予後不良の疾患であり、その主な治療法は手術療法と放射線療法

である。化学療法は口腔癌の標準的な治療法ではないが、最近では、シスプラチンと 5-FU を併用した術前化学療法が放射線療法の向

上や転移の予防など治療に有効であり、化学療法の意義が見直されている。しかしながら、化学療法には、依然として薬剤耐性と副作用という重大な問題がある。様々な要因により癌は薬剤耐性になるが、その一つに癌のエピジェネティクス制御がある。エピジェネティクス(epigenetics)制御とは、クロマチンへの後天的な修飾により遺伝子発現を制御することであり、DNAのメチル化とヒストンのアセチル化がある。

エピジェネティクス制御の重要な役割は、ゲノム上の多数の遺伝子を選択的に活性化または不活性化することである。すなわち、エピジェネティクス制御は、遺伝子発現の on/off の機能を担い、ゲノムの遺伝子活用という高次元の生命情報を可能にしている。エピジェネティクス制御の異常は、発生、再生、遺伝の異常、発癌などさまざまな病態を引き起こし、癌の血管新生や、抗癌剤耐性の要因であることも報告されている。薬剤耐性因子(例えば多様な発癌因子や抗癌剤そのもの)は、生体のエピジェネティクス制御を攪乱し、口腔癌の性質を巧みに変化させる。その結果、口腔癌患者の薬剤感受性は一様ではなくなり、予想外の薬剤耐性癌の出現や重篤な副作用の発症など、今後、従来の化学療法では対応できない口腔癌患者が増えることが危惧される。口腔癌のエピジェネティクス制御が薬剤耐性や副作用に重要な役割を演じていることは確実であるが、果たしてどのように関わっているのか、そのメカニズムは、現在のところ不明である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、①口腔癌のエピジェネティクス制御メカニズムを解析・検討し、②従来の化学療法+ α としてエピジェネティクス制御化合物を口腔癌治療に応用し、③最小の

副作用で最大の抗腫瘍効果が得られるエピジェネティクス制御型化学療法を確立することである。

3. 研究の方法

口腔癌細胞株を用いて抗癌剤とエピジェネティクス阻害剤との併用効果を検討し、併用の最適条件を決定しその分子生物学的解析をする。

抗癌剤とHDAC阻害剤・DNMT阻害剤の併用効果の検討

(1) 細胞毒性・アポトーシス誘導の確認

細胞株は、口腔扁平上皮癌細胞株(HSC-2, -3, -4)と舌癌由来細胞株(SAS)、およびp53野生型の肺癌細胞株A549を用いる。

ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤(HDAC阻害剤)はNaB, SAHA, MS-275を使用する。

DNAメチル化酵素阻害剤(DNMT阻害剤)はDecitabine, Azacitidine, Zebularineを使用する。HDAC阻害剤またはDNMT阻害剤存在下シスプラチン, 5-FU, タキソテールによる抗腫瘍効果を観察し、併用効果のみられる至適条件(各種薬剤濃度、組み合わせ、投与時間)を検討する。細胞毒性はMTT assay, アポトーシスはTUNEL法で解析する。

(2) 併用によるアポトーシス誘導の解析

至適条件下のアポトーシス誘導について、以下の件を解析する。Sub-G1測定によるアポトーシス誘導率、フローサイトメトリー法による細胞周期の測定、特に、阻害剤や抗癌剤による細胞周期停止は重要な意味をもつので、詳細に検討する。カスパーゼ活性の測定カスパーゼカスケードの解析は、アポトーシスの要因を知る上で重要であるので、本研究では、Caspase-3, -8, -9について調べる。

(3) アポトーシスにおけるミトコンドリアの役割。細胞内のミトコンドリアがアポトーシスの中心的位置にあることが確認されて

いる。本研究においても、ミトコンドリアが関与し、重要な役割を担っている可能性が大きい。以下の実験によりミトコンドリアの役割について検討する。活性酸素(ROS)の生成、膜電位の変化、チトクロームCの放出、チトクロームCによるCaspase-9の活性化

(4) 併用によるシグナル伝達の解析

MAPキナーゼおよびPI3/Aktキナーゼの解析
多種類のキナーゼがアポトーシス経路に関与し、これをコントロールすることが指摘されている。このうち、併用効果の機構としてMAPキナーゼ(p38, ERK, JNK)がBcl-2ファミリー分子をリン酸化し、アポトーシスを促進している可能性を検討する。

(5) 併用効果とメチル化遺伝子(標的遺伝子の同定)メチル化遺伝子を同定するため methylated CpG island amplification (MCA)法を用い口腔扁平上皮癌で効率にメチル化している遺伝子断片を多数クローン化する。また、正常上皮細胞でもメチル化している断片を除外し、癌特異的にメチル化している断片を同定する。特に、p16遺伝子にメチル化がある癌とp53遺伝子の異常を持つ癌は重複するかどうかを調べる。MS・RDA法を用いたゲノムスキャンによってヒト口腔癌におけるCpGメチル化異常を調べる。

(6) 併用効果におけるp53遺伝子の制御

併用効果におけるp53遺伝子の制御を検討するため、肺癌細胞株(p53野生株)とp53のsiRNAを用いて、抗癌剤とHDAC阻害剤、DNMT阻害剤の併用効果を検討する。

(7) 転写因子の制御

活性化NF-kappa Bは転写因子としてアポトーシスの促進あるいは抑制遺伝子の重要な制御因子となる。特に、抗癌剤に対するアポトーシス感受性に深く関与することが予想されるので、併用によるNF-kappa Bの活性化レベルを各処理群で比較検討する。方法は、a)ゲ

ルシフトアッセイ法、b)NF-kappa Bの認識配列を含むオリゴヌクレオチドをコーティングした96穴プレートを用いたELISA用キットを用いる。転写因子CREBについてもb)と同様の方法でその活性を測定する。

(8) 関連アポトーシス因子の同定

抗癌剤によるアポトーシスの誘導に、Bcl-2ファミリー(Bcl-2, Bcl-XL, Bax, Bid), IAPファミリー(XIAP, IAP-1, IAP-2), TRAFファミリーなどのアポトーシス関連蛋白が関与している。本実験系の併用効果でこれらの因子にどのような変化が観察されるのかをReal-time PCR法、フローサイトメトリー法、ウェスタンブロット法などで解析する。

4. 研究成果

本研究より、以下の興味深い新発見が明らかとなった。

HSC-3細胞では、CDDP単独処理に比較してZEBの前処理またはSAHAの同時処理でCDDPによる細胞毒性が有意に増強した。CDDP単独で30%、CDDP/ZEBまたはCDDP/SAHAで80%のアポトーシス誘導が確認された。一方、5-FUの処理では、5-FU/SAHAでアポトーシス誘導の増強が観察されたが、5-FU/ZEBは逆に5-FUの細胞毒性を減弱するという、興味深い発見が得られた(図1参照)。CDDP/SAHAによる抗腫瘍効果の増強は、SAHAが小胞体にストレスを与え、小胞体経由のアポトーシスが関与していることが示唆された。一方、5-FU/ZEBの組み合わせでは、逆に5-FUの細胞毒性を減弱し、そのメカニズムとしてZEBによるCREBのリン酸化が関与していることが示唆された。

本研究成果により、口腔癌の抗癌剤感受性にはエピジェネティクス制御が関与し、ZEBやSAHAと抗癌剤の併用は薬剤感受性増強に有効であることが示唆された。しかし、その併

用効果は、併用する抗癌剤の種類、細胞種により異なり、抗癌剤の代謝や抗腫瘍効果の作用機序に依存していることが推察された。本研究成果は、薬剤併用による思いがけない副作用を回避するために非常に重要な意義をもつ。

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6件)

① Suzuki M, Endo M, Shinohara F, Echigo S and Rikiishi H. Enhancement of cisplatin cytotoxicity by SAHA involves endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in oral squamous cell carcinoma cells. *Cancer Chemo. Pharma.* (Online Pub. 2009 Feb.) 査読有り

② Suzuki M, Shinohara F, Endo M, Sugazaki M, Echigo S and Rikiishi H. Zebularine suppresses the apoptotic potential of 5-fluorouracil via cAMP/PKA/CREB pathway against human oral squamous cell carcinoma cells. *Cancer Chemo. Pharma.* (Online Pub. 2008 Oct.) 査読有り

③ Suzuki M, Shinohara F and Rikiishi H. Zebularine-induced reduction in VEGF secretion by HIF-1 α degradation in oral squamous cell carcinoma. *Mole. Med. Repo.* (1) 465-471, 2008 査読有り

④ Suzuki M, Shinohara F, Nishimura K, Echigo S and Rikiishi H. Epigenetic regulation of chemosensitivity to 5-fluorouracil and cisplatin by zebularine in oral squamous cell carcinoma. *Int. J. Oncology* (31) 1449-1456, 2007 査読有り

⑤ Suzuki M, Shinohara F, Nishimura K, Sato Y, Echigo S and Rikiishi H. Epigenetic regulation of susceptibility to anti-cancer drugs in HSC-3 cells. *Interface Oral Health Science* 279-280, 2007 査読有り

⑥ Rikiishi H, Shinohara F, Sato T, Sato Y, Suzuki M and Echigo S.

Chemosensitization of oral squamous cell carcinoma cells to cisplatin by histone deacetylase inhibitor, Suberoylanilide hydroxamic acid. *Int. J. Oncology* (30) 1181-1188, 2007 査読有り

[学会発表] (計3件)

① Maiko Suzuki, Fumiaki Shinohara, Manabu Endo, Masaki Sugazaki, Seishi Echigo and Hidemi Rikiishi. Effects of Zebularine on the apoptosis of 5-Fluorouracil via cAMP/PKA/CREB pathway against human oral squamous cell carcinoma cells. The 3rd International Symposium for interface Oral Health Science. 2009年1月15日—16日。仙台

② 鈴木麻衣子、篠原文明、遠藤学、力石秀実 エピジェネティクス制御剤を用いた癌血管新生の抑制。第38回免疫学会総会。2008年12月1日—3日。京都

③ 鈴木麻衣子、篠原文明、西村謙太郎、力石秀実。Zebularineによる抗癌剤感受性のエピジェネティクス制御。第37回免疫学会総会。2007年11月20日—22日。東京

[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

鈴木 麻衣子 (SUZUKI MAIKO)
東北大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：70420049

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：