

研究種目：若手研究 (B)

研究期間： 2007 ~ 2008

課題番号：19791537

研究課題名 (和文)

口腔癌における抗癌剤耐性に関連する遺伝子の解析と耐性克服についての検討

研究課題名 (英文) Analysis of gene expression profiles related to anticancer drug resistance in oral cancer

研究代表者

中谷 現 (NAKATANI KEN)

和歌山県立医科大学 医学部 博士研究員

研究者番号：70382348

研究成果の概要：

CDDP は抗癌剤化学療法を中心薬剤であるが、症例によって臨床効果にばらつきがあり、治療前から薬剤抵抗性を示すもの（自然耐性）や、再発例などでみられる抵抗性（獲得耐性）が口腔癌の治療において臨床上大きな問題であり、その克服が今後の重要な課題である。本研究では、耐性獲得に関係する遺伝子発現を解析することにより耐性克服法を含めた診断、治療法の開発を目的として行った。

当科で新たに樹立した CDDP 耐性口腔扁平上皮癌耐性株 (H-1R, Sa-3R, KB-R) と各親株を対象に、千葉大学臨床分子生物学講座（丹沢秀樹教授）を中心とするグループとの共同研究により Microarray 解析を行い、CDDP 耐性細胞株における遺伝子発現の変動をそれぞれ検討した。その結果、3種類の細胞株において共通して変動する発現亢進・減弱する遺伝子のうち、何種類かの遺伝子が感受性・耐性を規定する候補遺伝子としてリストアップされた。候補遺伝子群の中から有意差のある遺伝子（5種類）について、CDDP を中心とした術前化学療法（CVP-2 経路動注化学療法）を施行した口腔癌症例の生検時検体と対象として免疫組織学的検討を行った。その結果、Microarray 解析の結果とほぼ一致する解析結果が得られた。この結果より、CDDP 感受性の予測因子としての遺伝子解析、および数種の遺伝子発現を組み合わせた診断方法の有用性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学 外科系歯学 2

キーワード：(c) 臨床腫瘍学 7406

1. 研究開始当初の背景

口腔癌患者の機能を温存し、かつ、再発・リンパ節転移や遠隔転移を防止し、より高い生存率とQOLを維持するためには、neo-adjuvant chemotherapyを有効に応用することが重要であると考えられている。当教室では、1985年からCDDP-VLB-PEPおよびチオ硫酸ナトリウムによる2経路注入化学療法（CVP療法）を臨床応用し、奏効率（CR+PR）は86%と良好な治療効果を示しているが、CR率は46%に過ぎないのが現状である。また、化学療法に全く反応を示さないNC症例も存在しており、このような症例は局所再発や後発転移をきたす確率が高く口腔癌患者の予後を左右する因子の一つと考えられる。再発転移症例を含め、これらの化学療法に抵抗性を示す症例への対応が今後の課題と考えている。

臨床における耐性獲得には、種々の要因が化学療法に対する抵抗性発現に関与していると考えられ、それらは化学療法に対する内因性の自然耐性と治療経過中に生じる獲得耐性に大きく分けられる。これまでに、アポトーシス関連因子、転写因子、DNA修復酵素、ABCトランスポーターなどの分子因子が耐性獲得に働くことが知られている。近年の研究により遺伝子発現の変動により、感受性/耐性に影響を及ぼしていることが報告されている。つまり、治療開始前にあらかじめ感受性・耐性に影響を及ぼす遺伝子学的因子を検索し、それぞれの病態を把握することが可能であれば、治療効果に格段の向上をもたらすものと考えられる。しかし、現在のところ、ある程度の知見は集まってきてはいるが、的確に判定できる方法は確立されていない。術前化学療法の効果はそのまま予後にも強く相関することから、効果のある抗癌剤の選択を含めた治療法を選択することが重要視されている。

2. 研究の目的

化学療法に対する口腔癌の抵抗性や口腔癌患者の薬剤代謝能力など遺伝子学的に評価し、より効果の高い治療法の選択、なかでも、効率のよい化学療法剤の選択法を開発することを目的とする。

1) 抗癌剤耐性のモデルとして、当科で新規に樹立した抗癌剤（CDDP）耐性口腔扁平上皮癌細胞株を3種類使用し、多数の遺伝子を対象にマイクロアレイ解析（Affymetrix社 Gene chip）を行い、親株（感受性株）と耐性株において、それぞれの感受性における遺伝子発現パターンの特徴を把握する。

2) 発現パターンから、薬剤感受性や耐性に関連する責任遺伝子群の絞込みを行い、個々の遺伝子について機能解析を行い、病態に影響を及ぼす遺伝子間の感受性・耐性発現起序を解明する。

3) 各ケースに適した（オーダーメイド/テーラーメイド的な）使用薬剤の種類の選択と投与スケジュール（量と投与時期、方法、各抗癌剤の組み合わせ）を決定するための遺伝子学的基準を検討する。

最終的には、臨床応用の可能性について、動物実験モデルおよび臨床症例での検討を重ねてさらに詳細に検討する。

3. 研究の方法

(1) 口腔扁平上皮癌細胞株およびそのCDDP耐性株において、CDDP、5-FU、Taxotelなどの各抗癌剤に対する抗癌剤感受性をMTT法により耐性度の測定を行う。

(2) 任意の抗癌剤（CDDP）濃度で癌細胞株を処理し、72時間培養後の各細胞株からmRNA、DNA、タンパクを抽出・精製する。

(3) 遺伝子発現の解析 ① in-house cDNA microarray system および Affymetrix 社の Gene Chip を使用して array microarray 解

析を行う。②semi-quantitative RT-PCR

③ realtime RT-PCR

(4) 親株—耐性株（獲得耐性）、感受性株—耐性株（自然耐性）間で解析結果の比較を行い、感受性・耐性発現に影響を及ぼすと考えられる候補遺伝子の抽出を行う。

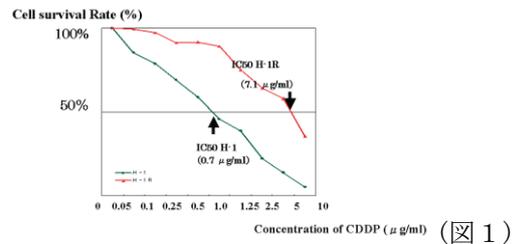
(5) 複数の候補遺伝子について、それぞれ検討を加え CDDP 感受性・耐性発現に影響を及ぼすと考えられる候補遺伝子の絞り込みをすすめる。

(6) 臨床組織検体における、化学療法効果と遺伝子発現の関連について、過去の標本については、生検時の組織標本の免疫染色などにより検討を加え、実際の化学療法効果との関連性を検索する。承諾が得られた組織標本の場合は、mRNA を抽出し、遺伝子発現の解析を行い、化学療法効果との関連を検討する。

4. 研究成果

【CDDP 耐性細胞株の樹立】

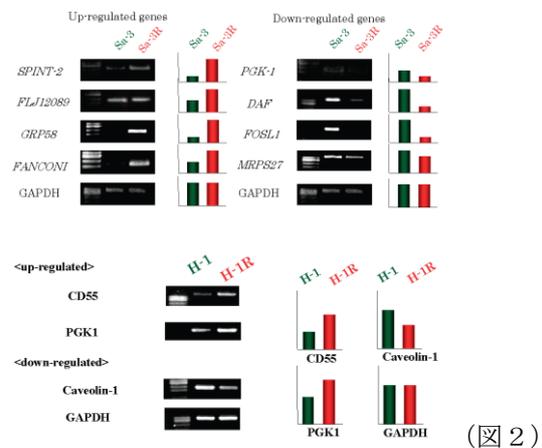
2 種類の口腔扁平上皮癌由来細胞株（H-1, Sa-3）を独自に樹立した。それら2 種類の口腔扁平上皮癌由来細胞株の他にKB 細胞をシスプラチン添加培養液で継続して培養し、それぞれ3 種類のCDDP 耐性細胞株（H-1R, Sa-3R, KBR）を樹立した。さらに、各親株・耐性株をCDDP で処理し、MTTアッセイをおこない、50%増殖抑制濃度（IC50）を増殖曲線から求めた。図1 にH-1 とH-1R のMTT アッセイの結果を代表例として示す。H-1 とH-1R の相対的な耐性度は約10 倍、Sa-3 とSa-3R の相対的な耐性度は約7.5 倍、KB とKBR の相対的な耐性度は8.6 倍であった。



【独自開発マイクロアレイによるCDDP 感受性・耐性関連遺伝子の検索】

次に、千葉大学大学院医学研究院機能ゲノム学講座と共同開発したマイクロアレイを用いた解析により、耐性株において2倍以上の発現亢進をした遺伝子と0.5 倍以下の発現減弱が認められた遺伝子を抽出した

これらの遺伝子の中から、機能や文献的検索を通じてCDDP耐性と関係ありそうな遺伝子についてそれぞれの細胞中での発現量を確認した。（図2）

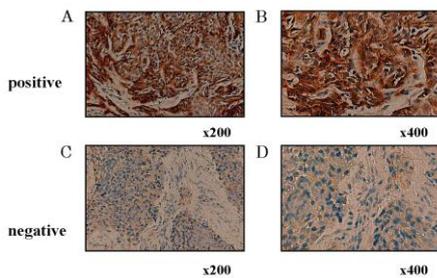


【臨床検体によるCDDP 耐性関連遺伝子検索】

さらに、臨床検体によって抗癌剤の奏効率を予測しうる遺伝子群の検索を行った。特許等の関係で、ここでは1 つの遺伝子Caveolin-1 に絞って記載する。Caveolin-1 遺伝子は染色体7 q 3 1. 1 に存在する新規癌抑制遺伝子である。Caveolin-1 遺伝子の強発現は前立腺癌、食道癌、大腸癌、乳癌などで検出されており、Caveolin-1 遺伝子の強発現はこれらの癌の転移や予後との関係が報告されている。しかし、発現レベルと臨床的諸指標との関連

は、さまざまに報告され、今ひとつ明確さに欠け、さらに、CDDP 耐性・感受性との関連は報告されていない。

和歌山医科大学医学部歯科口腔外科学講座における臨床サンプルを用いてCDDP の効果と Caveolin-1 タンパク発現状態を比較 (図3) したところ、表1 のように有意な相関を認めた。いくつかの同様なマーカーを組み合わせることにより、実際の臨床で役に立つCDDP 感受性・耐性判定法を開発することが実現できることが期待される。



(図3)

	(+)	(-)	P
CR	18	16	2
PR	5	3	2
NC	7	1	6
	20	10	

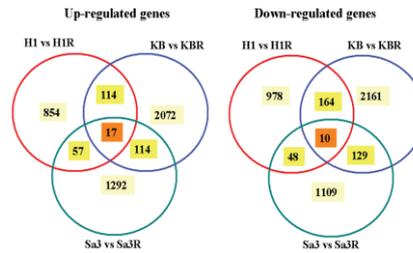
P=0.002

表 6. 口腔扁平上皮癌における CDDP の奏功状態と Caveolin-1 タンパク発現の相関

(表1)

【ヒト全遺伝子搭載マイクロアレイとクラスター解析によるCDDP 感受性・耐性関連遺伝子の探索】

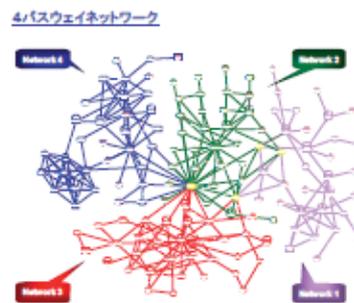
独自に樹立した3 種類のCDDP 耐性細胞株 (H-1R, Sa-3R, KBR) について、Affymetrix 社製GeneChipTM により耐性株とその親株である感受性株の各遺伝子の発現状態を比較した。図4 に示すように3 種類のCDDP 耐性細胞株において共通に強発現を示した遺伝子が17 種類、共通に発現減弱した遺伝子が10 種類明らかになった。現在、これらの遺伝子の機能解析を行っている。



(図4)

【マイクロアレイ解析結果から、機能解析によるCDDP 感受性・耐性関連遺伝子の探索】

これらの共通発現増強遺伝子164 種類に関して、50 遺伝子が4 つの主要ネットワークを作り、さらに、この4 つのネットワークが大きな1 つのネットワークを作ることが明らかになった(図5)。これら50 遺伝子のうち、抗体を入手できる15 遺伝子を選び、さらに、real time PCR 法で3 組の感受性—耐性細胞株群での発現状態を確認して、耐性細胞株中の方が明らかに発現増強している遺伝子5 種類をCDDP 耐性遺伝子候補として絞り込んだ。



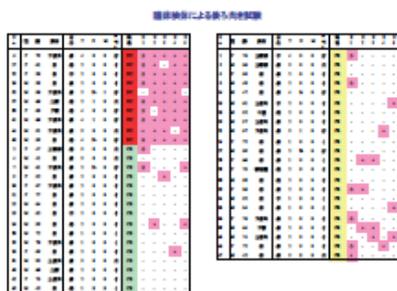
(図5)

臨床検体の免疫染色法による遺伝子機能解析：これら5 種類の遺伝子産物 (タンパク) 発現状態を47 症例の臨床サンプル (生検組織) について免疫染色で検索し、各症例のCDDP に対する感受性・耐性との相関を調べた。図6 に代表的染色例としてX1 タンパクの発現状態とCDDP による治療効果との相関状態を示す。



(図6)

47 臨床サンプルにおける5 遺伝子タンパクの発現状態とCDDP 治療効果の結果を図7に示す。これらの遺伝子はCDDP耐性遺伝子であることが臨床データから確認された。



(図7)

以上の結果から、分子生物学的遺伝子発現解析により、候補に挙げた5 遺伝子はCDDP耐性に関連する遺伝子であることが示唆され、今後、研究開発を進めることにより遺伝子発現情報をもとにした抗癌剤化学療法の効果予測法開発の可能性が考えられた。

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 5 件)

- ① Negoro K, Yamano Y, Nakashima D, Saito K, Nakatani K, Shiiba M, Bukawa H, Yokoe H, Uzawa K, Wada T, Tanzawa H, Fujita S. Cross-resistance of platinum derivatives in H-1R, a cisplatin-resistant cell line. *Oncol Rep*21(2) 443-9 2008 あり
- ② Hiraishi Y, Wada T, Nakatani K, Tojyo I, Matsumoto T, Kiga N, Negoro K, Fujita S. EGFR inhibitor enhances cisplatin sensitivity of oral squamous cell carcinoma cell lines. *Pathol Oncol Res* 14(1) 39-43 2008 あり
- ③和田健, 中谷現, 根来健二, 平石幸裕, 藪田達雄, 東條格, 藤田茂之 TPFL-セフランチン療法に放射線治療を併用し、著効を得た顎下腺原発扁平上皮癌の胸鎖関節部転移の1例 *頭頸部癌* 33 巻3号 380-384 2007 あり
- ④ Negoro K, Yamano Y, Fushimi K, Saito K, Nakatani K, Shiiba M, Yokoe H, Bukawa H, Uzawa K, Wada T, Tanzawa H, Fujita S. Establishment and characterization of a cisplatin-resistant cell line, KB-R, derived from oral carcinoma cell line, KB. *Int J Oncol.* 30(6) 1325-32. 2007 あり
- ⑤ Hiraishi Y, Wada T, Nakatani K, Negoro

K, Fujita S Immunohistochemical Expression of EGFR and p-EGFR in Oral Squamous Cell Carcinomas. *Pathol Oncol Res.* 12(2) 87-91 2007 あり

〔学会発表〕(計 2 件)

- ① 中谷 現 口腔扁平上皮癌におけるセフランチンによる抗癌剤の感受性増感と耐性克服剤としての可能性について 第34回アルカロイド研究会 平成20年6月21日 大阪市
- ② 中谷 現 下顎歯肉への転移をみとめた進行大腸癌の1例 第62回日本口腔科学会総会 平成20年4月17日 福岡市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中谷 現 (NAKATANI KEN)

和歌山県立医科大学 医学部 博士研究員

研究者番号：70382348