

## 科学研究費補助金研究成果報告書

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20791557

研究課題名（和文） 唾液腺癌における治療抵抗性因子の解析

研究課題名（英文） Analysis of the medical treatment resistance factor in salivary gland carcinoma

## 研究代表者

堂東 亮輔 (DOTO RYOSUKE)

松本歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：40329470

## 研究成果の概要（和文）：

唾液腺癌細胞を用いて薬剤耐性機構の解析をおこなった結果、頭頸部癌の抗癌剤多剤耐性獲得機構には multidrug resistance gene (MDR) 1, multidrug resistance associate protein (MRP)1 およびグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) -pi が関与し、特に唾液腺癌細胞では、MDR1 に加え GST-pi の発現に伴う MRP1 の薬剤排泄機能の亢進が明らかとなった。従って、これら ABC transporter の発現が癌化学療法における治療抵抗性因子として考えられた。すなわち、唾液腺癌における抗癌剤耐性克服には、MDR1 の薬剤排泄機構に加え、GST-pi で触媒される解毒抱合体を基質とする MRP1 の薬剤排泄機構を阻害することが分子標的として考えられた。

## 研究成果の概要（英文）：

Objectives: The poor clinical response of salivary gland adenocarcinoma (SGA) to combined chemotherapy for head-and-neck cancer (HNC) suggests that the sensitivities and/or mechanisms of resistance to anti-cancer drugs differ between SGA and oral squamous cell carcinoma (SCC). The present study aimed to clarify whether expression of the ATP-binding cassette (ABC) transporters MDR1 and MRP1 is associated with multidrug resistance (MDR) in HNC, and to determine differences in the associated processes between SGA and SCC.

Materials and Methods: The expression of ABC transporters and glutathione S-transferase enzymes was studied immunohistochemically in the normal salivary gland and in cancer tissues from patients. Expression of MDR1 and MRP1 was analyzed using Western blotting in both SGA and SCC cell lines following vincristine administration. We also determined *mdr1* and *mrp1* mRNA expression levels using reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR).

Results: Immunohistochemical analysis revealed MDR1 and MRP1 expression in ductal cells of salivary glands, but not in the oral mucosal epithelium. When compared with SCC, SGA displayed expressed more intense MRP1 and more MDR1. Analysis *in vitro* indicated more MDR1, MRP1 and glutathione S-transferase (GST)-pi class enzyme expression in drug-resistant SGA cells than in parental SGA or drug-resistant and drug-sensitive SCC cell lines. Immunoblotting and PCR confirmed that the expression of GST-pi was increased relative to that of MRP1 in drug-resistant SGA cells. The MDR1 inhibitor verapamil obviously enhanced cytotoxicity in resistant SGA and SCC cells at low vincristine concentrations. The GST inhibitor curcumin also enhanced cytotoxicity, particularly in resistant SGA cells after the MDR1 efflux barrier had been reversed by verapamil.

Conclusion: These results indicate that MRP1/GST-pi enzymes are involved in the acquired-resistance phenotype of SGA.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：ABC transporter、MDR1、MRP1、GST

1. 研究開始当初の背景

癌化学療法が発達するなかで、依然として多くの固形癌では抗癌剤に対して感受性が低い。また、治療当初は抗癌剤が有効であった癌においても、治療途中でその効果が低下し、作用機序や構造が異なる複数の薬剤に対して耐性を示すことがある。これらは交差耐性といわれ、この原因を明らかにすることが、癌化学療法における課題の一つになっている。癌細胞が抗癌剤耐性を獲得する機序としては、APT-binding cassette transporter (以下 ABC transporter) とよばれる ATP 依存性トランスポーターによる、薬物の細胞外への排出機構が考えられている。頭頸部癌における研究では、ABC transporter の一つである multidrug resistance gene (MDR) 1 が、唾液腺癌の管腔形成細胞に高発現していることが報告されている。しかし、MDR1 の機能を阻害しても、唾液腺癌細胞が薬剤耐性形質を示すことが明らかにされており、MDR1 以外の薬剤耐性機構の存在が示唆される。

2. 研究の目的

MDR1 の構造に類似する ATP 依存性薬剤排出ポンプの一つである multidrug resistance associated protein (MRP) 1 および MRP1 の基質となるグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) の発現について検討することによって、頭頸部癌の主たる組織型である扁平上皮癌と唾液腺癌における抗癌剤耐性機構の解明を行なった。

3. 研究の方法

ヒト正常唾液腺組織と頭頸部癌の臨床材料(癌組織)を用いて ABC transporter と GST のサブクラスの発現を免疫組織学的に検討した。正常唾液腺組織、唾液腺癌組織および口腔扁平上皮癌組織に対し、MDR1、MRP1、GST に対する 1 次抗体を用いて ABC 法による免疫染色をおこない、抗原の局在を DAB 発色メチルグリーン対

比染色法と FITC 標識 PI 対比染色法で検討した。さらに各組織における MDR1 と MRP1 および GST の発現を、陽性率、平均陽性細胞率、染色強度で評価した。頭頸部癌培養細胞を用いた実験系では、唾液腺癌細胞としてヒト顎下腺癌由来培養細胞 (HSG) とヒト耳下腺癌由来培養細胞 (HSY)、ヒト扁平上皮癌由来培養細胞として、SK、TF、KB、KN を用い、ビンクリスチン (VCR) 処理による ABC transporter の発現誘導実験を行なった。VCR によるトランスポーター誘導実験では、両 transporter と GST クラスの蛋白発現を Western blot 法で、mRNA の発現を GAPDH を internal control とした PCR 法で検討した。さらに、両 transporter と GST の阻害剤を用いて耐性克服実験を行なった。MDR1 の阻害剤としては、カルシウムチャネルブロッカーの verapamil を作用させ、HSG 細胞における VCR 処理効果を 50% 増殖抑制濃度で評価し、MRP1 の機能阻害には、グルタチオン合成酵素阻害剤の Buthionine Sulfoximine と GST 阻害剤の Curcumin を用いて検討した。

RNAi による薬剤感受性の変化では、細胞を播種し、24 時間後 HSG 細胞に *mdr-1* siRNA と *mrp-1* siRNA を transfection した後、48 時間後に細胞を回収して再播種した後、VCR 感受性の変化を IC<sub>50</sub> で評価した。なお、MDR1 と MRP1 の RNAi によるノックダウンは RT-PCR 法と Western Blot 法で確認した。

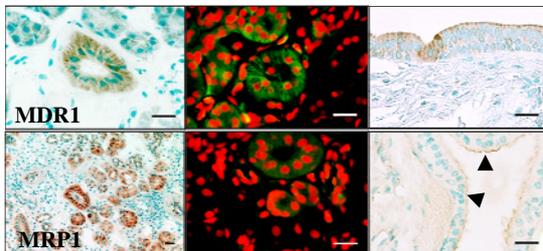
1 × 10<sup>6</sup> 個の培養細胞を Rhodamine123-PBS(-) 溶液中に懸濁し、細胞内に色素を取り込ませ、遠心分離にて細胞を回収し、PBS(-) に再懸濁し、37°C で 60 分間インキュベートして色素を排出させた。細胞内の Rhodamine123 の蛍光強度をフローサイトメーターを用いて測定した。

4. 研究成果

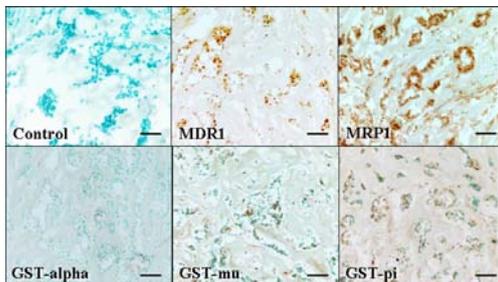
ヒト正常唾液腺組織の免疫染色では、MDR1 と MRP1 の染色態度は類似し、ともに線条部と排泄部の導管上皮細胞に検出された。GST のサブクラ

スである GST-pi は、GST-alpha と GST-mu に比べ弱い染色性を示した。一方、腺様嚢胞癌組織での MDR1 と MRP1 は、主に管腔構造をとる腫瘍細胞で高発現し、GST-mu は染色態度が不均一である一方、GST-pi は比較的均一に強染し、GSTalpha の発現は認めなかった。 transporter の陽性率、平均陽性細胞率、染色強度は、口腔扁平上皮癌ではきわめて低いのに対し、腺様嚢胞癌と腺癌では、両者ともに均一な transporter の発現と強い染色強度を示した。 GST のサブクラスを検討した結果、唾液腺癌は口腔扁平上皮癌に比べ、GST-pi と GST-mu の陽性率、平均陽性細胞率、染色強度がともに高値を示し、どの組織型においても GST-pi は GST-mu に比べて約 10 倍の強い染色強度を示した。これらの免疫組織染色の結果から、唾液腺癌では MDR1 と MRP1 が高発現するとともに、正常唾液腺では発現の低い GST-pi が高発現することが明らかとなった。

正常唾液腺組織

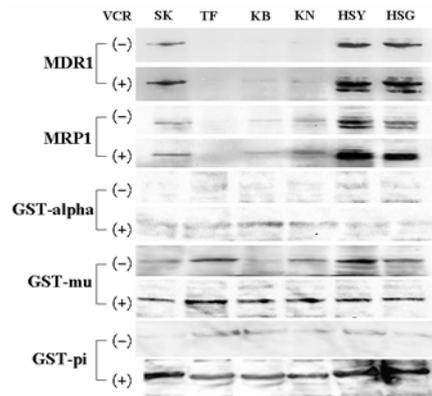


腺様嚢胞癌組織

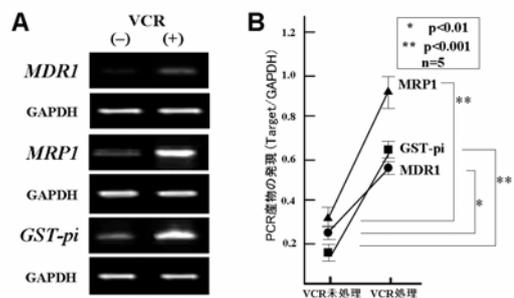


培養癌細胞における MDR1, MRP1 および GST の発現を Western blot 法で検討した結果、VCR 処理を行なった HSG と HSY では、両 transporter が過剰発現するとともに、GST-pi が誘導された。 RT-PCR 法では、VCR 処理細胞の *MDR1*, *MRP1*, *GST-pi* の mRNA の発現は、VCR 未処理に比べ有意に高く、*MRP1* と *GST-pi* の mRNA の発現は相関していた。これらの結果より、唾液腺癌細胞では抗癌剤作用による薬剤耐性遺伝子の発現誘導がみられ、さらに、GST-pi の発現に伴う MRP1 の薬剤排泄機能の亢進が考えられた。

Western Blot Analysis



Semiquantitative analysis RT-PCR

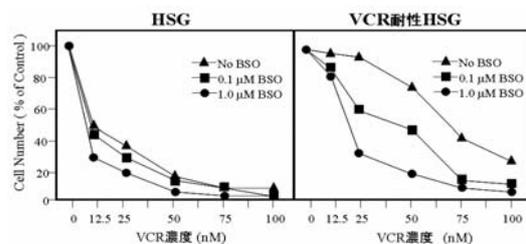


HSG 細胞の VCR 処理効果を 50% 増殖抑制濃度 (IC50) で比較したところ、VCR 処理細胞の IC50 は、VCR 未処理に比べ約 9 倍の高値を示した。この VCR 耐性細胞に MDR1 阻害剤である Verapami または GST 阻害剤である Curcumin を添加すると、IC50 は有意に低下した。また、グルタチオン合成酵素阻害剤の Buthionine Sulfoximine (BSO) を作用させたビンクリスチン耐性細胞では、VCR 感受性が上昇した。

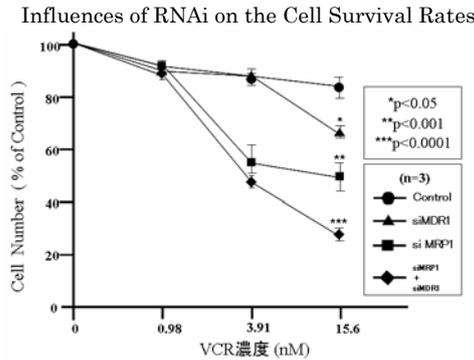
GST阻害剤のCurcuminによるVCR感受性の変化

添加物質	IC <sub>50</sub> (ng/ml)	
	VCR未処理HSG細胞	VCR処理HSG細胞
Vincristine (10nM)	7.41 ± 0.73	63.77 ± 9.30
Vincristine (10nM) + Curcumin (25 μM)	5.02 ± 0.97	31.15 ± 6.53*

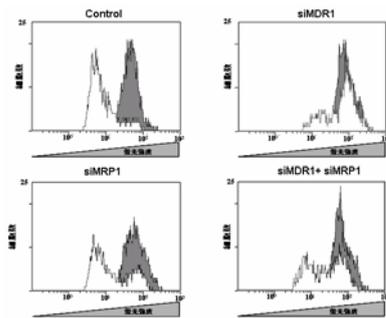
\* Vincristine 単剤処理に対する有意差. (n=3) \*p<0.001



ABC transporter の RNAi による薬剤感受性の変化では、VCR で 3 クール処理した HSG 細胞に MDR1 と MRP1 に対する RNAi を行い、異なる濃度の VCR を含む培地で 3 日間培養したところ、15.6nM の VCR を添加して培養すると MDR1 の RNAi では生細胞数は、コントロールに対して 67% に低下した。MRP1 の RNAi では、生細胞数は 54% にまで低下した。さらに、MDR1 と MRP1 の siRNA を co-transfection すると生細胞数は 30% まで低下した。



フローサイトメリーによる細胞外排泄機能の評価では、VCRを3クール処理したHSG細胞に対してMDR1とMRP1のRNAiを行った後、Rhodamine123を基質とする薬剤排泄試験を行った。MDR1またはMRP1のRNAiを施行した細胞は60分後には、細胞外へのRhodamine123の排泄量が減少し、細胞内蛍光強度はcontrolに比べて増加していた。さらにsiMDR1とsiMRP1をco-transfectionした細胞では、siMRP1を用いたRNAiに比べRhodamine123の細胞内蛍光強度は増加していた(図8)。すなわち、VCRを3クール処理したHSG細胞に対するMDR1とMRP1のRNAiによってRhodamine123の細胞外排泄が減少し、細胞内蓄積量が増加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 0 件)

[その他]

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

堂東 亮輔 (DOTO RYOSUKE)

松本歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：40329470

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者