

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24年 5月 18日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21592184

研究課題名（和文）頭頸部癌の薬剤耐性獲得におけるミトコンドリアDNA変異に関する研究

研究課題名（英文）Mitochondrial DNA deletion or depletion on the acquisition of drug tolerance in head and neck cancer

研究代表者 鈴木 清護（SUZUKI SEIGO）

北海道大学・北海道大学病院・特任講師

研究者番号：00399891

研究成果の概要（和文）：

頭頸部癌細胞株を抗癌剤（シスプラチンまたはドセタキセル）の存在下で培養し、濃度を段階的に上げていく手法で選択的にクローニングすることにより薬剤耐性株を樹立した。耐性株の中の1個の細胞を分離しPCR法を用いてミトコンドリアDNA（mtDNA）を増幅した。耐性株においては、欠失を伴った変異mtDNAが確認できた。また、頭頸部癌症例の組織の凍結切片からレーザーマイクロダイセクションにより得られた細胞ごとのmtDNAは、安定した増幅が得られなかった。

研究成果の概要（英文）：

Chemotherapeutic agent-resistant head and neck cancer cell lines were selected by a dose-escalating exposure to cisplatin or docetaxel. Mitochondrial DNA (mtDNA) from individual drug-resistant cells was extracted and subjected to PCR amplification of full-length mitochondrial genomes to examine mtDNA from single cells. We could detect deleted form of mtDNA in drug-resistant cells. Otherwise, we could not establish mtDNA reproducible amplification from single cells derived by laser microdissection of fresh frozen head and neck cancer tissues.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：頭頸部癌、分子生物学、シスプラチン、ドセタキセル、ミトコンドリアDNA、薬剤耐性

1. 研究開始当初の背景

頭頸部癌の全悪性腫瘍に占める割合は5%程度であるが、世界で毎年50万人以上が罹

患し、全悪性腫瘍中6番目に多い疾患である。治療において、頭頸部領域はその部位の性格上、機能（聴覚、嗅覚、味覚、構音、発声、

嚙下等)と形態の温存が大変重要であり、放射線療法と化学療法の果たす役割は極めて大きい。現在頭頸部癌化学療法の中心的役割を担うのは、シスプラチンとドセタキセルであり、両者の併用療法や、放射線との併用療法により放射線増感作用を有することも認められている。白金錯化合物であるシスプラチンは、核酸塩基と結合することにより、主に DNA の 1 本鎖内架橋や 2 本鎖間架橋を作り DNA 合成や腫瘍細胞の分裂を阻害する。ドセタキセルはチューブリンの重合を促進し、安定な微小管を形成すると共に、その脱重合を抑制する。また、細胞内においては形態的に異常な微小管束を形成する。これらの作用により、細胞の有糸分裂を停止させて抗腫瘍作用を発揮する。このように効果がある一方で、癌が抗癌剤に対する薬剤耐性を獲得することはしばしばおこり臨床上問題となるが、薬剤耐性がおこる機序については、未だ解明されていない。

2. 研究の目的

研究代表者らは、頭頸部癌細胞株およびその株から作成したドセタキセル耐性株を用いて、ドセタキセル耐性の獲得におけるミトコンドリア DNA (mtDNA) および活性酸素の役割について、知見を得た (Mizumachi T., Suzuki S. et al., *Oncogene* 27: 831-838, 2008)。活性酸素の主たる産生源であるミトコンドリアが、抗癌剤の作用に関与していることは十分予想され、このことは抗癌剤と活性酸素との関連を示す報告 (Caporossi, D. et al., *Free Radical Biology & Medicine* 35: 1355-64, 2003, Schaaf, GJ. et al., *Free Radical Research* 36: 835-43, 2002) を裏付ける形となった。

ミトコンドリアは細胞のエネルギー代謝、活性酸素の産生、アポトーシスへの関与などの重要な働きを持ち、独自の DNA を有する唯一の細胞小器官である。ヒトの mtDNA は、大きさ 16.6 kbp の環状二本鎖 DNA であり、細胞により各ミトコンドリアあたりの mtDNA のコピー数は様々である。mtDNA は酸化リン酸化に関与する 13 種のポリペプチド、2 種の rRNA、ミトコンドリア内のタンパク合成に必須な 2 2 種の tRNA をコードしている (Anderson, S. et al., *Nature* 290: 457-65, 1981)。mtDNA の塩基置換速度は核遺伝子の 10 倍速いとされ、mtDNA の変異の頻度は高く、一方で変異を修復する頻度も高いとされている。

研究代表者らは、全ミトコンドリアゲノムを PCR 法を用いて増幅することにより正常 mtDNA 及び欠失を伴った変異 mtDNA を検出する方法を確立した。それにより、前立腺癌細胞の mtDNA がアンドロゲン依存性を決定することを証明した (Higuchi, M., Kudo, T., Suzuki, S. et al., *Oncogene* 25: 1437-45, 2006)。

個々のミトコンドリアには多数の mtDNA が存在しているため、正常 mtDNA と変異 mtDNA が混在する場合には、核遺伝子変異とは全く異なる mtDNA 独自の挙動を示す。また、個々の細胞は多数のミトコンドリアを有し、細胞としての表現型は変異ミトコンドリアの割合、即ち変異 mtDNA の割合に規定されるという仮説が成り立つ。変異ミトコンドリアの変異と修復が同じ確率で起こると仮定すれば、細胞分裂による世代が繰り返されるうちに、多くの変異ミトコンドリアを有する細胞が少数出現する。この確率的再分配理論によれば、個々の細胞における変異ミトコンドリア、言い換えれば変異 mtDNA の数がある「閾値」を越えると、表現型が発現されるという仮説が成り立つ。したがって、mtDNA の変異を見る際に、「腫瘍塊」や「細胞集団」としてではなく、一つあるいは少数の細胞の mtDNA の変異の量的 (ミトコンドリアの数)、質的 (変異 mtDNA の出現の多さ) 解析が極めて重要であると考えられる。

研究代表者は、平成 16 年から平成 17 年にかけて、米国アーカンソー医科大学生化学・分子生物学講座の研究者として、前立腺癌がホルモン不応性を獲得する原因としての mtDNA の変異について研究した。その際に「研究の方法」の項で記述するような方法を用いることにより、培養細胞 1 個から PCR 法によりミトコンドリアゲノムを増幅する方法を経験している。

分子生物学的、生化学的、病理組織学的手法を生かし、本研究では頭頸部癌における抗癌剤に対する薬剤耐性獲得の機序の一部を解明するとともに、将来的に化学療法を施行する際の子後因子として mtDNA の変異を臨床応用できるようにするのが目的である。

3. 研究の方法

(1) 頭頸部癌細胞株での mtDNA 変異の検査 ① 薬剤耐性株の樹立

頭頸部癌細胞株を抗癌剤 (シスプラチン、ドセタキセルなど) の存在下で培養し、死滅しなかった細胞を選択的にクローニングし、薬剤耐性株を樹立する。その方法は細胞により異なり、試行錯誤を要する。いろいろな条件や複数の方法を同時に試みた。

1) 抗癌剤の濃度をある程度高く、短時間の処理を施し、休息期間を設けて、段階的に濃度を上げていく方法 2) 抗癌剤の濃度を低濃度から高濃度に各濃度を数日から数週間かけて段階的に上げていく方法を行う。

② mtDNA の PCR 法による増幅

低濃度の細胞懸濁液をごく少量ずつ培養用のプレート (384 ウェル) 等に分配することにより、一つの細胞のみが含まれるウェ

ルが見つかる。この細胞を溶解し、PCR法を用いてmtDNAを増幅する。その際、全ミトコンドリアゲノムを増幅する方法として、long-distance nested PCR法という手法を用いる。mtDNAのD-Loop領域に設定した二組のプライマーを用いてnested PCRを行い、大きさ16kbpのmtDNAを増幅することができる (Khrapko, K., et al., *Nucleic Acids Research* 27: 2434-41, 1999)。

③mtDNA のreal-time PCR法による増幅

mtDNAのND1領域に設定したプライマーを用いてreal-time quantitative PCRを行い、あらかじめ既知の濃度のスタンダードとの比較により、細胞内のmtDNAの数を測定する。

④解析

以上の手法で親株と薬剤耐性株との間にmtDNAの量的、質的差異、即ち正常mtDNAの数の変化や変異mtDNAの出現や数の変化などがあるかどうかを検討し、薬剤ごとに差があるかどうかなどを解析する。

(2) 頭頸部癌組織での mtDNA 変異の検索

① 頭頸部癌症例から組織の収集

当科受診あるいは関連施設受診の頭頸部癌の症例から生検材料の一部採取や手術材料からのサンプリング等を行い、腫瘍を-70℃にて凍結保存しておく。症例に関しては、抗癌剤治療歴、放射線治療歴、無治療の症例それぞれを収集する。

②組織からの mtDNA 抽出

凍結保存しておいた腫瘍をクリオスタットにて薄切し、スライドガラス上にマウントしたものをレーザーマイクロダイセクション法により、一つの癌細胞または少数の癌細胞集団を得る。これを用いて、(1)-②に示したものと同様な方法により、mtDNAの増幅を行う。

③解析

同一患者での化学療法前後のmtDNAの量的・質的差異があるかどうか、組織型による差異が見られるかどうか、扁平上皮癌の分化度による差異があるかどうかといった解析を行う。

4. 研究成果

(1) 薬剤耐性株の樹立

頭頸部癌細胞株を抗癌剤（シスプラチン、ドセタキセル）の存在下で培養し、死滅しなかった細胞を選択的にクローニングし、シスプラチン耐性株およびドセタキセル耐性株を樹立した。その方法は細胞により異なり、試行錯誤を要した。抗癌剤の濃度を低濃度から高濃度に各濃度を数日から数週間掛けて段階的に上げていく方法で、最終的には薬剤耐性株を樹立した。

(2) 薬剤耐性細胞からの mtDNA の増幅

抗癌剤（シスプラチン、ドセタキセル）耐性の頭頸部癌細胞株に対し mtDNA を long-distance nested PCR 法を用いて増幅を行い、いずれの耐性株においても、欠失を伴った変異 mtDNA が確認できた。一方で real-time PCR 法を用いて増幅を行い、細胞内の mtDNA の定量化を行ったが、その定量は一定の傾向は得られず、再現性を確認できなかった。

(3) 頭頸部癌組織からの mtDNA の増幅

頭頸部癌症例の組織の凍結切片よりレーザーマイクロダイセクションにより細胞株と同様な手法を用いて細胞ごとの mtDNA の量的・質的差異をみることを試みた。抗癌剤・放射線治療歴、無治療いずれの症例の組織からも long-distance nested PCR 法を用いて増幅を行ったが、安定した増幅が得られず、変異あるいは正常 mtDNA の確認ができなかった。

ひとつの細胞から得られる mtDNA を増幅する方法として long-distance nested PCR 法は有用と考えられるが、real-time PCR 法による定量化には課題が残った。別の方法が必要と考えられる。

癌組織のひとつの細胞からレーザーマイクロダイセクションにより得られる mtDNA は、細胞株のひとつの細胞から得られる mtDNA に比して数が少ない可能性があり、癌組織からの mtDNA 抽出には新たな方法が必要と考えられる。

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 15 件)

- ① 本間明宏, 坂下智宏, 折館伸彦, 鈴木清護, 他: 舌根部癌に対する喉頭機能温存治療 中咽頭前壁原発扁平上皮癌に対する超選択的動注化学療法と照射の同時併用療法、*日本気管食道科学会会報* 63: 77-78 (2012) 査読有
- ② Homma A, Inamura N, Oridate N, Suzuki S, et al.: Concomitant weekly cisplatin and radiotherapy for head and neck cancer. *Jpn J Clin Oncol* 8: 980-986 (2011) 査読有
- ③ Kuramoto R, Hirata K, Takei T, Oridate N, Suzuki S, et al.: FDG PET/CT in a patient with spontaneous remission of methotrexate-associated lymphoproliferative disorders after interruption of methotrexate. *Clin Nucl Med* 7: 582-583 (2011) 査読有

- ④ 鈴木崇祥, 加納里志, 折館伸彦, 本間明宏, **鈴木清護**, 他: 唾液導管癌における HER2 の発現解析、*頭頸部外科* 21:195-201 (2011) 査読有
- ⑤ 水町貴論, 畠山博充, 加納里志, 坂下智博, **鈴木清護**, 他: HPV 陽性中咽頭癌に対する個別化治療戦略、*頭頸部癌* 37: 394-397 (2011) 査読有
- ⑥ 北尾恭子, 本間明宏, 折館伸彦, **鈴木清護**, 他: 顎下腺悪性腫瘍 1 次症例の検討、*日本耳鼻咽喉科学会会報* 114: 126-132 (2011) 査読有
- ⑦ **鈴木清護**: <総説>特集・耳鼻咽喉・頭頸部画像アトラス「線維性骨異形成症、化骨線維症」、*JOHNS* 16: 483-485 (2010) 査読無
- ⑧ Homma A, Sakashita T, Oridate N, Suzuki F, **Suzuki S**, et al.: Importance of comorbidity in hypopharyngeal cancer, *Head Neck* 32: 148-153 (2010) 査読有
- ⑨ Taki S, Homma A, Oridate N, **Suzuki S**, et al.: Salvage surgery for local recurrence after chemoradiotherapy or radiotherapy in hypopharyngeal cancer patients. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 267: 1765-1769 (2010) 査読有
- ⑩ 加納里志, 折館伸彦, 本間明宏, **鈴木清護**, 他: 北海道大学における中咽頭癌症例の検討、*耳鼻咽喉科展望* 53: 補 6-7 (2010) 査読有
- ⑪ 水町貴論, 加納里志, 原敏浩, 鈴木章之, **鈴木清護**, 他: 中咽頭扁平上皮癌における HPV 感染と治療成績の検討、*頭頸部癌* 36: 498-501 (2010) 査読有
- ⑫ 本間あや, 高木大, **鈴木清護**, 他: 眼症状を呈した好酸球性副鼻腔炎の 1 例、*耳鼻咽喉科・頭頸部外科* 83: 79-82 (2010) 査読有
- ⑬ 水町貴論, 瀧 重成, 加納里志, 原敏浩, 鈴木章之, **鈴木清護**, 他: 頭頸部癌とヒト乳頭腫ウイルス(HPV) 頭頸部癌におけるヒト乳頭腫ウイルスによる発癌のメカニズムと検出について、*頭頸部癌* 35: 356-359 (2009) 査読有
- ⑭ 鈴木章之, 本間明宏, 折館伸彦, **鈴木清護**, 他: 化学放射線療法後の救済手術問題点とその対策 喉頭・下咽頭癌に対する化学放射線療法後の救済手術、*頭頸部癌* 35: 344-349 (2009) 査読有
- ⑮ Oridate N, Homma A, **Suzuki S**:

Voice-related quality of life after treatment of laryngeal cancer.

Arch Otolaryngol Head Neck Surg 135: 363-368 (2009) 査読有

[学会発表] (計 11 件)

- ① 水町貴論, 瀧 重成, 加納里志, 原敏浩, 鈴木章之, **鈴木清護**, 他: 頭頸部癌におけるヒト乳頭腫ウイルスによる発癌のメカニズムと検出について、第 33 回日本頭頸部癌学会、2009 年 6 月 12 日
ロイトン札幌 (札幌市)
- ② 瀧 重成, 本間明宏, 折館伸彦, **鈴木清護**, 他: 喉頭癌に対する超選択的併用放射線療法の治療成績、第 33 回日本頭頸部癌学会、2009 年 6 月 12 日、ロイトン札幌 (札幌市)
- ③ 水町貴論, 加納里志, 原敏浩, 鈴木章之, **鈴木清護**, 他: 中咽頭扁平上皮癌における HPV 感染と治療成績の検討、第 34 回日本頭頸部癌学会、2010 年 6 月 11 日、京王プラザホテル (東京都)
- ④ 稲村直哉, 本間明宏, 折館伸彦, **鈴木清護**, 他: 頭頸部癌に対する weekly cisplatin と放射線同時併用療法の検討、第 34 回日本頭頸部癌学会、2010 年 6 月 11 日、京王プラザホテル (東京都)
- ⑤ 鈴木章之, 本間明宏, 折館伸彦, **鈴木清護**, 他: 化学放射線療法後の救済手術問題点とその対策 喉頭下咽頭癌に対する化学放射線療法後の救済手術、第 33 回日本頭頸部癌学会、2009 年 6 月 11 日、ロイトン札幌 (札幌市)
- ⑥ 加納里志, **鈴木清護**, 他: 唾液腺悪性腫瘍における EGFR、HER2、c-KIT の発現解析、第 35 回日本頭頸部癌学会、2011 年 6 月 10 日、ウインク愛知 (名古屋市)
- ⑦ 水町貴論, 畠山博充, 加納里志, 坂下智宏, **鈴木清護**, 他: 個別化を目指す薬物療法 HPV 陽性中咽頭癌に対する個別化治療戦略、2011 年 6 月 10 日、ウインク愛知 (名古屋市)
- ⑧ 本間明宏, 折館伸彦, 鈴木章之, **鈴木清護**, 他: 化学放射線療法後の頸部郭清の必要性について、第 34 回日本頭頸部癌学会、2010 年 6 月 10 日、京王プラザホテル (東京都)

- ⑨ 本間明宏, 清水 康, 折館伸彦, 鬼丸力也, **鈴木清護**, 他: 頭頸部進行癌に対する集学的治療 "導入化学療法→化学放射線同時併用療法", 第35回日本頭頸部癌学会、2011年6月9日、ウイנק愛知 (名古屋市)
- ⑩ 坂下智宏, 本間明宏, 折館伸彦, **鈴木清護**, 他: 頭頸部扁平上皮癌 N+症例における放射線動注化学療法後の頸部評価 Wait and See Policy は成立するか、2011年6月9日、ウイנק愛知 (名古屋市)
- ⑪ 畠山博充, **鈴木清護**, 他: 頭頸部癌における NF- κ B パスウェイの活性化とセツキシマブ耐性、2011年6月9日、ウイUNK愛知 (名古屋市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 清護 (SUZUKI SEIGO)

北海道大学・北海道大学病院・特任講師
研究者番号:00399891

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし