

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592542

研究課題名(和文) 頭頸部癌におけるシスプラチン感受性規定因子の解明—網羅的タンパク解析法を用いて

研究課題名(英文) Elucidation of CDDP sensitivity related factors on the head and neck cancer-using comprehensive proteomics analysis

研究代表者

小川 徹也 (Ogawa, Tetsuya)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：40334940

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト頭頸部細胞株のシスプラチン感受性株、その獲得耐性株、自然耐性株を用いて、シスプラチン感受性に関連するタンパクの網羅的解析を行い抵抗性株に特異なピークの減弱を2つ検出した。これらピークの減弱が見られる症例は、シスプラチン耐性症例であると迅速に判断できる可能性が示唆された。またiTRAQ法によりシスプラチン特異的耐性因子として エノラーゼを同定し、siRNA法により感受性再獲得を示した。本研究は、臨床におけるシスプラチン耐性症例を事前に選択し無用な抗がん薬投与を避けることができること、さらには新たな頭頸部癌治療法開発にも繋がり、トランスレーショナル研究の観点からも有用な研究であると思われる。

研究成果の概要(英文)：Establishment of a method to assess CDDP resistance before treatment would make it possible to avoid unnecessary administration in cases when no effect was expected. We conducted a comprehensive, protein-level analysis of human head and neck cancer cell lines using a ProteinChip System with cell lines that had sensitivity to CDDP, acquired resistance, and natural resistance. We found two peaks and may therefore be effective markers for predicting CDDP effectiveness. Extracted proteins were labeled with iTRAQ and analyzed to identify resistance. Protein expression was confirmed by western blotting and analysis using siRNA. Seven proteins with specific resistance to CDDP, including alpha-enolase. Functional analysis for alpha-enolase by siRNA showed that CDDP sensitivity significantly was increased in naturally resistant cell line. Such proteins could be used as biomarkers for anticancer agent resistance and as targets of cancer therapy.

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：頭頸部外科学

## 1. 研究開始当初の背景

頭頸部癌はその発生部位より、治療法選択が問題となる。生活の上で重要な役割をもつ頭頸部領域の手術治療は、侵襲の大きさにかかわらずこれら領域の重要な機能を冒すことになる(Ogawa T et al. *Auris Nasus Larynx* 2000)。頭頸部癌は比較的抗癌剤に効きやすい癌であり、患者の生活の質を考慮すると可能な限り手術を避け、抗癌剤を中心とした治療がより望ましいと考える(Ogawa T et al. *Gan to Kagaku Ryoho* 2005)。以上から、頭頸部癌における抗癌剤治療の役割は非常に大きいといえる。現在の頭頸部癌抗癌剤治療は、頭頸部癌全体の感受性に基づいた化学療法であり、個々の腫瘍の特性に基づいたものでなく、その効果は実際に抗癌剤を投与してみないと判断できないのが現実である。これらの経験的な抗癌剤治療は、無効例に対しては非常に不利益かつ不経済である。我々はこれまで頭頸部癌において様々な *in vitro* および *in vivo* の感受性試験、さらには分子標的に基づく抗癌剤感受性試験を行い、知見を得てきた(Aoki K, Ogawa T et al. *Oncol Rep* 2000, Bradford CR et al. *Head Neck* 2003, Muramatsu Y et al. *Anticancer Res* 2000)。また頭頸部癌に特異的な癌関連遺伝子を同定、報告した(Takebayashi S, Ogawa T et al. *Cancer Res* 2004, Henson BS et al. *J Bio Chem* 2005)。しかしながら未だ、真の抗癌剤感受性規定因子を解明したとは言えない。

頭頸部癌の抗癌剤治療の中心的な薬剤はシスプラチンである。これまでもシスプラチンの感受性因子に関して多くの報告があるが、研究内容としては従来のDNAマッピング法、RNAレベルのマイクロアレイ法、あるいは経験的に予測される代謝、解毒関連酵素などに関連した因子を探るといった方法に偏っている。

頭頸部癌治療において、今後益々、機能温存治療を考慮した精度の高い抗癌剤治療が

求められる。その中心的な薬剤であるシスプラチンの、真の感受性規定因子の解明が必要である。

## 2. 研究の目的

そこで我々は、セントラルドグマの最終産物であるタンパクからの網羅的解析を行い、検出されたタンパクの比較を行うことで、より精度の高いシスプラチン感受性規定因子を解明する研究をするべきとの考えに至った。

本研究では網羅的タンパク解析法を用いることで、頭頸部癌におけるシスプラチン感受性規定因子の解明を目的とした。本研究はタンパクレベルから網羅的解析を行うという、これまで他でなされてきた研究方法とは異なるゆえ、真の因子を発見できる可能性が高いと考えた。

将来的には解明した因子を利用した、新しい頭頸部癌抗癌剤治療の臨床応用に展開するための基盤となる研究を目指した。

## 3. 研究の方法

### 1) 細胞株と培養

本研究にはミシガン大学(USA)のThomas E. Carey 博士より分与されたヒト頭頸部細胞癌細胞株であるUM-SCC-23(シスプラチン感受性株)、UM-SCC-23:CDDP-R(獲得耐性株)、UM-SCC-6,UM-SCC81B(シスプラチン自然耐性株)、UM-SCC-23/WR(5-FU耐性株)を用いた。細胞は10%非働化牛胎児血清(IGS, Tokyo, Japan)と100U/mlペニシリンと0.1mg/mlストレプトマイシンを加えたRPMI1640 medium(SIGMA, St. Louis, USA)を培養液として、5%CO<sub>2</sub>通気下、37℃にて培養した。

シスプラチン感受性試験に関しては下記のとおりである。96穴平底プレート(Falcon 3072, Beckton Dickinson, NJ, USA)にヒト頭頸部癌細胞株を播種し、様々な濃度(0、0.15、0.3、0.6、1.25、2.5、5、10μg/ml)

のシスプラチン（日本新薬，Tokyo，Japan）を添加して5%CO<sub>2</sub>通気下、37℃にて培養した。培養開始後5日後に、WST-1 assay Kit（Cell Counting Kit，DOJINDO，Tokyo，Japan）を用いて細胞数の比較を行い、シスプラチンによる細胞増殖抑制効果の判定を行った。

## 2) タンパク解析の方法

### ProteinChip® SELDI-TOF-MS での解析

頭頸部癌シスプラチン感受性株 UM-SCC-23、シスプラチン存在下の培養によって得られた獲得耐性株 UM-SCC-23:CDDP-R、自然耐性株 UM-SCC-6 を作成、所有しており、3者のタンパク発現の相違を発現タンパクの網羅的解析のためケミカルチップと飛行時間型質量分析計を組み合わせた ProteinChip® SELDI-TOF-MS で網羅的に解析し、複数の候補タンパクのピークを絞り込んだ。

検出には、Bio Rad 社の推奨するプロトコルを基に、検出感度の良い条件を検討し、解析を行った。ProteinChip®の設定条件は以下の通りである。（Acquisition Mode: Source at 25KV-Positive ions, focus mass:7000Da, matrix attenuation: 1000Da, Mass Range: 0 ~ 100000Da, Sampling Rate: 400MHz, Warning shot: 1energy: 2800nj, Data shot: 10, energy: 2800nj）

また得られたスペクトラムの解析は Proteinchip® software version 2.1b (Bio-Rad Laboratories)を用いて行った。

ExpASy Molecular Biology Server の SWISS-PROT を用いて、発現タンパクの分子量を基に、近似分子量を持つタンパクの検索を、分子量の誤差を 0.3%として行った。

SELDI-TOF-MS は比較的小さな分子量のタンパク解析を得意とする。大きな分子量のタンパクは SELDI-TOF-MS は有用ではなく、この解析法では正確な結果を得ることが難しくなる。そこで次の方法を考慮した。

### MALDI-TOF-MS(マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間質量分析)を用いたペプチドマスフィンガープリンティング法による解析

大きな分子量のタンパクの発現の違いは、電気泳動（SDS-PAGE, 銀染色）を利用し、この差の見られる部分を直接抽出することで解析を試みた。それぞれの細胞株から抽出したタンパクを用い、電気泳動（SDS-PAGE, 銀染色）を行った。発現に違いのあったタンパクを切り出し、ゲル内トリプシン消化を施行し、MALDI-TOF-MS で解析し、シスプラチン感受性規定因子と考えられるタンパクを同定した。

（ペプチドマスフィンガープリンティング法）

タンパクの同定方法には MATRIX SCIENCE 社の MASCOT 法を用いた。

上記の研究方法で同定されるタンパクは、小さな分子量から大きな分子量までを網羅した、真のシスプラチン感受性規定因子の可能性が高いといえる。これらを同定した上で、次の研究に移った。

### LC-ESI-MS/MS を用いた iTRAQ 法による解析

当初の研究計画での3者解析に加え、多剤耐性因子をみるために他抗癌薬耐性株(今回は5-FU耐性株)との同時比較も行った。各セルラインから抽出したタンパクをそれぞれ重量の異なる iTRAQ 試薬でラベリングし、LC-ESI-MS/MS (Triple TOF5600) を用いて同定、定量比較を行った。このような複数の sample をタンパクレベルで比較するのは従来の方法では困難であったが iTRAQ 法を用いることにより可能となった。その結果は WB でも確認をした。

## 3) siRNA による機能解析

この結果同定されたタンパクを、siRNA を用いて機能解析を行った。感受性株、耐性株にて siRNA 法、あるいは遺伝子導入法を用いることでその発現を調節し、感受性の変化がみられることを確認した。

前述の研究計画・方法で得られたタンパクの発現を調節することで、感受性が実際に変化することを確認し、本研究で得られたタンパクが、真のシスプラチン感受性規定因子であることを証明した。耐性株で発現するタンパクを、siRNA 法でノックダウンし、MTT 法で感受性が増加すること、あるいは耐性株で減弱するタンパクを、遺伝子導入法で機能獲得し、感受性が増加することを見出せば、得られたタンパクが、真のシスプラチン感受性規定因子であると考えられた。

#### 4. 研究成果

##### 1) 細胞株と培養

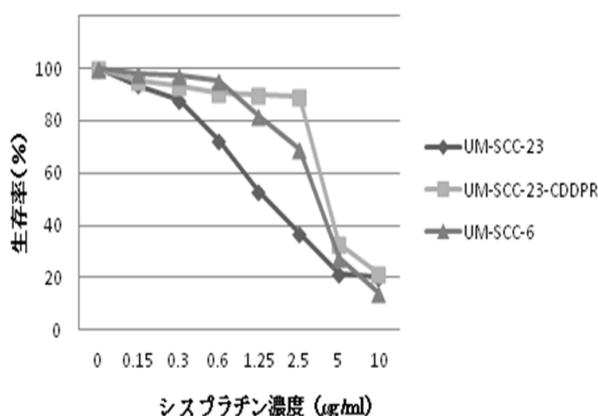


Fig.1 シスプラチン感受性曲線

ミシガン大学より供与されたヒト頭頸部癌細胞株のうち UM-SCC-23、UM-SCC-6、シスプラチン存在下の培養によって得られた獲得耐性株 UM-SCC-23:CDDP-R の 3 株のシスプラチンに対する感受性を WST-1 assay にて検討した。結果を図に示す (Fig.1)。UM-SCC-23 の IC<sub>50</sub> は 1.3 µg/ml、UM-SCC-6 は IC<sub>50</sub> 3.2 µg/ml、UM-SCC-23:CDDP-R は IC<sub>50</sub> 4.6 µg/ml であった。この結果より UM-SCC-23 はシスプラチンに対し感受性が高く、UM-SCC-6 は UM-SCC-23 の 2.5 倍の自然耐性を持つこと、

また作成した UM-SCC-23:CDDP-R も 3.5 倍の獲得耐性を持つことが確認された。

#### 2) プロテイン解析

##### ProteinChip® SELDI-TOF-MS での解析

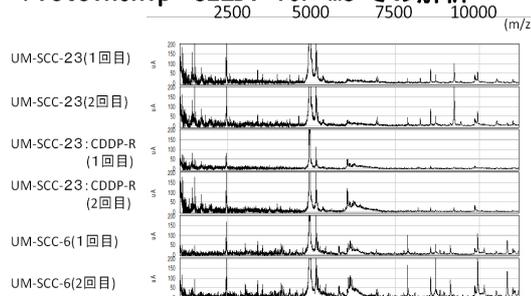


Fig.2 CM10 チップを用いた再現性の確認

CM-10 (陽イオン交換チップ)、Q-10 (陰イオン交換チップ) の各チップを用いて測定 of 再現性を確認した。Fig.2 に、CM-10 チップを用いた独立した 2 回ずつの検査結果を示す。図のように各サンプルにおいてほぼ同様のパターンが得られ、本技術を用いた測定は再現性があることが確認できた。

また 5000m/z 付近で全サンプルともほぼ同程度のピークが得られており、今回検討したサンプルはほぼ同量のタンパク量であることが推測された。

MW of detected protein	accession number(SMSS-PROT)	PRO TERN
8250	015342	V-type proton ATPase subunit e 1
	P04004	Vimentin
	P05204	Non-Histone chromosomal protein HMG-17
	P07816	Cytochrome b-c1 complex subunit 6, mitochondrial
	P0C84-1	STAG3-like protein 2
	P55713	C-C motif chemokine 23
	P81605	Dermcidin
	012574-3	Protein tyrosine phosphatase type IVA 2
	013186	CATR tumorigenic conversion 1 protein
	015517	Neurostatin
	066E14-2	RecQ-mediated genome instability protein 2
	066F12	DPH2 homolog
	066H31	Putative uncharacterized protein Cxor#9
	024165-3	CDC42 small effector protein 2
8230	A61ML2-2	Putative uncharacterized protein ENSP000002824
	042521-15	Bcl-2-like protein 11
	042633	Prostate stem cell antigen
	P10145	Interleukin-8
	042035	Secretoglobin-like protein
	062047-8	Paroxysmal nocturnal hemiparesis/epilepsy oxidase
	072400	Keratin-associated protein 19-3
	029025-4	Plasma cell-induced resident endoplasmic reticulum protein
	029021	Secretoglobin family 3A member 1
	029566-6	ADP-dependent glucokinase
	024072	Putative uncharacterized protein PRO025

Table.1 ExPASy Molecular Biology Server を用いたタンパクの検索

ExPASy Molecular Biology Server の SWISS-PROT の結果 9259m/z のピークと類似した分子量のタンパク断片をもつものとして 14 種類のタンパクが見いだされた。また 8244m/z のピークにおいては同条件で 11 種類のタンパクが見いだされた (Table1)。

**MALDI-TOF-MS(マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間質量分析)を用いたペプチドマスフィンガープリンティング法によるシスプラチン感受性規定因子の同定**

Protein score 178 という高い精度で2つのタンパク(FAS、CK8)を同定することができた。

さらに同定されたタンパクをウエスタンブロットング法にて発現を確認、この方法の確実性を示した。

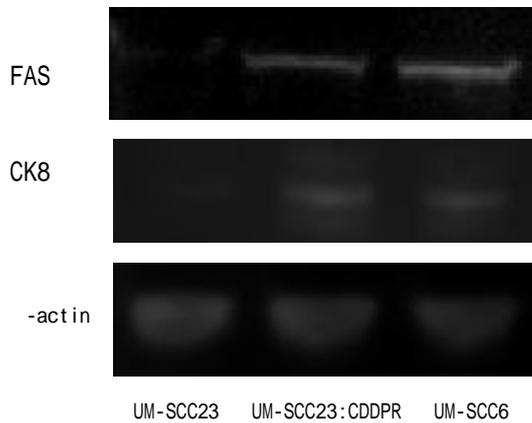


Fig.3 ウエスタンブロットング法での発現の確認

**iTRAQ 法と LC-ESI-MS/MS を用いた網羅的解析**

Table.2の上段がCDDP 耐性に特異的に関与する可能性のあるタンパク7つである。

下段が MDR、多剤耐性因子に関与する可能性のあるタンパク 13 個である。

この中には GST や XRCC-1 など過去に抗癌薬耐性に関与すると報告のあったタンパクもふくまれていたが、今回我々は -enolase についてその機能解析を行った。

この -enolase に関して siRNA を使用した機能解析を行った。

Table 1 Differentially expressed proteins

Accession #	protein name	% Cov	N
aa210300	63Da heat shock protein	83.6	10
ep201787	Keratin, type II cytoskeletal 8	85.1	11
ep213647	Keratin, type II cytoskeletal 5	62.4	17
oc0000137	Cytokeratin precursor	91.3	20
ep214613	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	77.4	23
ep200335	L-lactate dehydrogenase A chain	80.0	16
ep207797	Cytochrome c	77	19
ep204505	Keratin, type I cytoskeletal 17	60	17
ep211916	N-glycoprotein-cochaperone protein 1	94.2	34
ep201261	Keratin, type II cytoskeletal 1	32.8	181
ep200723	Enolase subfamily protein 1	51.1	449
ep211781	Purified DNA methyltransferase 3	15.1	344
ep200556	Neurofilament-tubulin-associated protein	30.9	2

CDDP specific resistance proteins

Accession #	protein name	% Cov	N
ep205579	Myosin 9	32.7	1
ep206733	α-enolase	77.7	24
ep202398	Keratin, type II cytoskeletal 6A	71.0	31
ep209211	Cytoskeleton-binding factor P	70	37
ep204241	Myosin 10	54	30
ep209764	Protein 3.1/3-45	54.1	298
ep205526	Adenovirion hexon protein	39.4	142

Table.2 iTRAQ 法と LC-ESI-MS/MS を用いたタンパクの検索

ここでは 5-FU 耐性株である UM-SCC-23/WR に対し、A 群として 5-FU 単独で培養した群、B 群として -enolase をノックダウンし 5-FU とともに培養した群を比較したが、予測通りその感受性に変化はなかった。

次に CDDP 獲得耐性株である UM-SCC-23-CDDPR に対しても同様に A 群として CDDP 単独培養群、B 群として -enolase をノックダウンし CDDP とともに培養した群と比較をおこなったが、ここは予測に反して CDDP 感受性に有意な変化はみられなかった。

最後に CDDP 自然耐性株である UM-SCC-81B に対しても同様に実験を行った。ここでも群として CDDP 単独培養群、B 群として -enolase ノックダウンし CDDP とともに培養した群と比較をおこなった。ここでは予測通り CDDP 感受性が Fig.4 のように有意差をもって変化した。このことより獲得耐性株と自然耐性株ではその耐性獲得の機序が異なることも推測された。

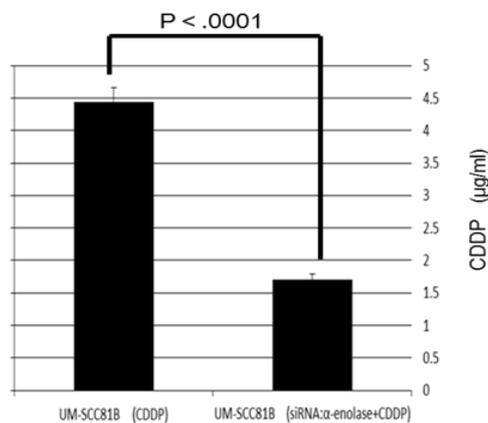


Fig.4.CDDP 自然耐性株 (UM-SCC-81B) 感受性変化

多剤耐性因子に関与していると思われるタンパクが高発現している症例では、CDDP、5-FU に耐性である可能性が高く PF 療法の効果が低い事が考えられ、初期根治治療に手術などを考慮する一助となると示唆された。また α-enolase を含めた群に含まれるタンパクが高発現する症例では、CDDP 以外の抗癌薬は有効である可能性があり 5-FU, TXT などを選択できると思われた。現在マイクロアレイなどを使用してさらに候補タンパクの絞り込みもおこなっており、臨床検体をしようした免疫染色なども予定している。

本研究の意義、結論を以下に示す。

α-enolase は抗癌薬耐性を治療前に判断するバイオマーカーとなる可能性がある。さらに頭頸部扁平上皮癌の治療法選択因子となり得る可能性が示唆された。

抗癌薬自然耐性、獲得耐性では耐性機序が異なることが示唆された。

今後臨床検体を使用した免疫染色なども予定している。

新たなる頭頸部癌治療法の開発に繋がる研究である。

## 5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計3件)

1. Identification of chemoresistant factors by protein expression analysis with iTRAQ for head and neck carcinoma. Nishimura K, Tsuchiya Y, Okamoto H, Ijichi K, Gosho M, Fukayama M, Yoshikawa K, Ueda

H, Bradford CR, Carey TE, Ogawa T. British Journal of Cancer, 2014, in press 査読あり

2. 西村邦宏、小川徹也、土屋吉正、池田篤彦、吉川和宏、植田広海。  
頭頸部扁平上皮癌細胞株を用いた CDDP 耐性因子に関わるタンパクの解析。  
愛知医科大学医学会雑誌 査読あり  
40 : 43-51 , 2012.

3. 小川徹也、池田篤彦、西村邦宏、土屋吉正、伴野真哉、植田広海。  
頭頸部癌治療の個別化に向けて-腫瘍外科医としての考えから-(From Bench to Clinic, Clinic to Bench) .  
耳鼻と臨床 57 : 159-164 2011.

〔学会発表〕(計15件)

1. Tetsuya Ogawa et al.  
Molecular targeted therapeutic approach for head and neck squamous cell carcinoma cell lines using p16 functional peptide  
The 12<sup>th</sup> Taiwan-Japan Conference on Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Taipei  
2013.12

2. Tetsuya Ogawa.  
Tailored Therapy for Head and Neck Cancer: the Surgical Oncologist Perspective  
Guest speaker, Ulm University, Germany  
2013.8.12

など

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

小川 徹也 (OGAWA, Tetsuya)  
愛知医科大学・医学部・教授  
研究者番号 : 40334940

### (2)研究分担者

吉川 和宏 (YOSHIKAWA, Kazuhiro)  
愛知医科大学・医学部・教授  
研究者番号 : 60109759