

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 27 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：平成 23 年度～平成 24 年度

課題番号：23792369

研究課題名（和文）

口腔がんにおける microRNA の抗がん剤抵抗性への関与の検討

研究課題名（英文）

Investigation of the participation in anticancer agent tolerance of microRNA in oral cancer

研究代表者

山川延宏（奈良県立医科大学・医学部・助教）

研究者番号：00526709

研究成果の概要（和文）：

平成23年度は、フッ化ピリミジン系の代謝拮抗剤である5-FUおよび白金製剤のシスプラチン（CDDP）は、頭頸部がんをはじめ、様々な固形がんの治療に使用されてきたが、薬剤耐性により十分な治療効果が得られないことがある。近年、タンパク質発現を制御する因子として microRNA (miRNA) が注目されている。本研究は口腔がんにおける microRNA の 5-FU および CDDP 抵抗性への関与を明らかにすることを目的とした。

各種 DNA 修復酵素欠損 Chinese hamster lung fibroblast 由来の細胞を用いて、DNA 修復経路における 5-FU の殺細胞効果を高める標的候補を検討した。Chinese hamster lung fibroblast 由来の BRCA2 deficient 細胞および ku80 deficient 細胞とそれぞれの親株細胞を用いて、生存率の測定：各種濃度の 5-FU を培地中に添加して 24 時間、37℃ 処理し、コロニー形成法にて生存率を算出した。また、DNA 二本鎖切断量の測定：フローサイトメトリーによって、5-FU による 24 時間添加処理後の γ H2AX 量を経時的に測定し、DNA 二本鎖切断量を比較検討した。

結果として、BRCA2 deficient 細胞は、5-FU により約 2.5 倍の高い殺細胞効果を認めた。また、BRCA2 deficient 細胞では、その親株細胞に比べて、5-FU 処理によって生じる DNA 二本鎖切断の修復遅延も確認された。

平成24年度は、Chinese Hamster Lung Fibroblast (BRCA2 野生型)由来の細胞と舌癌細胞である SAS 細胞を用いて、BRCA2 と関わりのある Chk1 阻害薬である UCN を用いて 5-FU の増感効果を確認した。両細胞において 5-FU の単独使用に比べて、UCN を併用することにより有意に細胞の生存率を低下認めた。つまり、相同組み換え修復を阻害することにより 5-FU の感受性を上げることができた。

研究成果の概要（英文）：

Using cells derived from DNA repair enzyme deficiency Chinese hamster lung fibroblast, we investigated the target candidate what raised cytotoxicity reaction of 5-FU in the DNA repair course. We measured a survival rate and the measurement of the quantity of DNA double-strand break using BRCA2 deficient cells derived from Chinese hamster lung fibroblast and ku80 deficient cells and each parent root cell. As a result, the BRCA2 deficient cells accepted the cytotoxicity reaction that had high approximately 2.5 times by 5-FU. Furthermore, with the BRCA2 deficient cells, the repair delay of the

DNA double-strand break to result from 5-FU treatment as compared with the parent root cells was confirmed.

As an additional experiment, we confirmed a sensibilization effect of 5-FU using the SAS cells which were cells and the tongue cancer cells of the Chinese Hamster Lung Fibroblast (BRCA2 wild-type) origin using UCN which was BRCA2 and the Chk1 inhibitor with the relation. A low bottom significantly accepted the survival rate of cells by using UCN together as compared with 5-FU use alone in both cells. In other words we were able to achieve sensitivity of 5-FU by inhibiting homologous recombination restoration.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 23 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
平成 24 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：

5-FU、BRCA2、UCN

1. 研究開始当初の背景

口腔がんは、治療法の進歩により治療成績は向上しつつあるが、化学療法や放射線療法に対し抵抗性を示すことがあり問題となっている。これらの抵抗性を克服し、有効な治療法の開発が重要な課題である。われわれは、これまでにこれらの抵抗性の克服を目指し、化学療法に対する抵抗性に対しグリセロールを用いた化学シャペロン効果により感受性が向上することを明らかにしていた。また、細胞の抵抗性に関係なく効果が期待されている重粒子線のアポトーシス誘導のメカニズムについて明らかにしていた。しかしながら、グリセロールは特定の変異型 p53 だけを増感し、すべての変異型に対して有効とは限らないことが明らかとなり、重粒子線治療においても治療施設が少なく、費用が高いことなどから恩恵を受けられる人に限りがある状態であり現在もその状態が続いている。

近年、様々ながんにおいて miRNA の発現異常が報告され、miRNA ががんの発生と進展に深くかかわっていることが明らかとなってきた。miRNA は非コード RNA の一種であり、発生、増殖、分化、アポトーシスなど様々な生命現象に関わっていると考えられている。がん細胞では、多くの miRNA の異常が起こっていることが明らかとなっていたが、miRNA が化学療法に対する抵抗性に関してどのように関与するか、また、そのメカニズムについても未だ明らかとはなっていなかった。

2. 研究の目的

フッ化ピリミジン系の代謝拮抗剤である 5-FU は、約半世紀にわたり頭頸部がんをはじめ、様々な固形がんの治療に使用されてきたが、薬剤耐性により十分な治療効果が得られないことがある。近年、タンパク質

発現を制御する因子として microRNA (miRNA) が注目されており、今回 5-FU 感受性細胞株と抵抗性株の発現 miRNA を比較検討し、また発現の違いが実際に 5-FU の感受性に影響を与えるのか否かの検討し 5-FU による化学療法の向上を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

平成 23 年度は各種 DNA 修復酵素欠損 Chinese hamster lung fibroblast 由来の細胞を用いて、DNA 修復経路における 5-FU の殺細胞効果を高める標的候補を検討した。

(1) Chinese hamster lung fibroblast 由来の BRCA2 deficient 細胞および ku80 deficient 細胞とそれぞれの親株細胞を用、生存率の測定：各種濃度の 5-FU を培地中に添加して 24 時間、37°C 処理し、コロニー形成法にて生存率を算出した。

(2) DNA 二本鎖切断量の測定：フローサイトメトリーによって、5-FU による 24 時間添加処理後の γ H2AX 量を経時的に測定し、DNA 二本鎖切断量を比較検討した。

平成 24 年度は、Chinese Hamster Lung Fibroblast (BRCA2 野生型)由来の細胞と舌癌細胞である SAS 細胞を用いて、BRCA2 と関わりのある Chk1 阻害薬である UCN を用いて 5-FU の増感効果を確認した。

4. 研究成果

BRCA2 deficient 細胞は、5-FU により約 2.5 倍の高い殺細胞効果を認めた。また、BRCA2 deficient 細胞では、その親株細胞に比べて、5-FU 処理によって生じる DNA 二本鎖切断の修復遅延も確認された。

Chinese Hamster Lung Fibroblast (BRCA2 野

生型)由来の細胞と舌癌細胞である SAS 細胞において、BRCA2 と関わりのある Chk1 阻害薬である UCN を用いて 5-FU の増感効果を確認した。両細胞において 5-FU の単独使用に比べて、UCN を併用することにより有意に細胞の生存率を低下認めた。つまり、相同組み換え修復を阻害することにより 5-FU の感受性を上げることができた。

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 1 件)

① Yousuke Nakagawa, Akihisa Takahashi, Athuhisa Kajihara, Nobuhiro Yamakawa, Yuichiro Imai, Ichiro Ota, Noritomo Okamoto, Eiichiro Mori, Taichi Noda, Yoshiya Furusawa, Tadaaki Kirita, Takeo Ohnishi.

Depression of p-53-independent Akt survival signals in human oral cancer cells bearing mutated p53 gene after exposure to high-LET radiation.

Biochemical and Biophysical research Communications

査読：有

423: 2012, 654-660

[学会発表] (計 2 件)

① 仲川洋介

口腔がんにおける重粒子線照射による生存シグナルを介した細胞周期および細胞死の制御

第 57 回日本口腔外科学会総会・学術大会

2012 年 10 月 19 日

横浜

②仲川洋介
DNA 修復経路を標的とした 5-FU 増感効果
の検討
第 14 回癌治療増感研究シンポジウム
2012 年 2 月 10 日
奈良

〔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
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

山川延宏 (奈良県立医科大学・医学部・助教)

研究者番号：

00526709

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし