

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592591

研究課題名(和文) G2 checkpoint abrogationによる頭頸部癌抗癌剤耐性の克服

研究課題名(英文) Analysis of G2 checkpoint abrogation to overcome drug resistance in head and neck cancers

研究代表者

成田 憲彦(Narita, Norihiko)

福井大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：80345678

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：頭頸部癌シスプラチン耐性細胞株においてシスプラチンがPoly(rC)-Binding Protein 4 (PCBP4)の発現を誘導し、Cdc25Aと結合することで細胞周期G2/M停止を誘導することが解った。PCBP4を抑制することで、この細胞周期停止が解除され(G2 checkpoint abrogation)、シスプラチンによるアポトーシスが増加し、シスプラチン耐性を減弱できる可能性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The present study showed that suppression of PCBP4 by RNAi reduced cisplatin-induced G2/M arrest and enhanced apoptosis in IMC-3CR cells, resulting in the reduction of cisplatin resistance. In contrast, overexpression of PCBP4 in IMC-3 cells induced G2/M arrest after cisplatin treatment and enhanced cisplatin resistance. We revealed that PCBP4 combined with Cdc25A and suppressed the expression of Cdc25A, resulting in G2/M arrest. PCBP4 plays important roles in the induction of cisplatin resistance in human maxillary cancers. PCBP4 is a novel molecular target for the therapy of head and neck cancers, especially cisplatin-resistant cancers.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：PCBP4 head and neck cancer cisplatin resistance G2 checkpoint

1. 研究開始当初の背景

過去に我々は G2/M arrest に着目し、HDAC3 を抑制することで頭頸部癌温熱療法の効果を増感できることを報告してきた(Narita, Matsumoto et al. Oncogene 2005)。本研究では G2/M arrest に着目し、頭頸部癌シスプラチン新規耐性機構の解析を行った。我々は頭頸部癌におけるシスプラチン耐性機構を解析するために、頭頸部癌(上顎癌)細胞株 IMC3 からシスプラチン高度耐性株 IMC3CR を樹立した。フローサイトメトリーの結果、IMC3CR をシスプラチン処理すると、野生株に比べて優位に G2/M arrest が誘導されアポトーシスが回避されている可能性が示された。また PCR array の結果から、IMC3CR にシスプラチンを添加した際に、POLY(rC)-BINDING PROTEIN 4(PCBP4)の発現が2倍以上に増加する事を見出した。PCBP4 は複数種の癌において G2/M arrest を誘導するとの過去の報告から、この分子の高発現が IMC3CR においてシスプラチン処理後、G2/M arrest とその間の DNA 修復を誘導し、アポトーシス回避に寄与すると考えた。

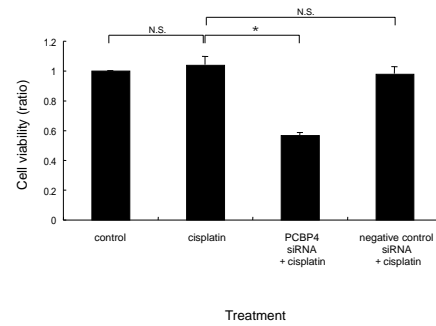
2. 研究の目的

頭頸部癌のシスプラチン耐性に PCBP4 による G2/M arrest が関与し、PCBP4 を抑制することでシスプラチン耐性を克服できるかを検討した。

3. 研究の方法

PCBP4 の機能解析のため RNAi により PCBP4 を抑制し、MTT assay を施行した。その結果、PCBP4 を抑制することで、シスプラチン処理後の IMC3CR の細胞生存率は約 1 / 2 に

著明に減少することが解った。



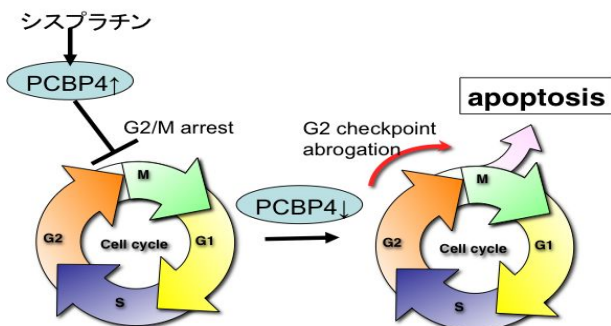
また、RNAi で PCBP4 を抑制すると、シスプラチン処理後に誘導される G2/M arrest が解除され、アポトーシス(sub G1)に移行することが判明した。次に PCBP4 を強制発現するベクターを作成し、野生株 IMC3 にトランスフェクションした。得られた PCBP4 強発現株(IMC3-PCBP4)において、フローサイトメトリーによる細胞周期解析を行うと、シスプラチン刺激後に、IMC3 よりも G2/M arrest が有意に誘導され、アポトーシスが減弱することが判明した。また MTT assay においても、IMC3-PCBP4 は IMC3CR と同程度のシスプラチン耐性を獲得していることが明らかになった。また RIP assay を用いた解析から PCBP4 は Cdc25A の mRNA に結合し、その発現を抑制し、G2/M arrest を誘導することが解った。これらの結果から PCBP4 は頭頸部癌シスプラチン耐性において重要な働きをしており、この分子を抑制することでシスプラチン耐性頭頸部癌に対する分子標的治療に発展できると考えられた。

4. 研究成果

本研究で明らかになった PCBP4 を介した頭頸部癌のシスプラチン耐性機構について以下のように考える。シスプラチンなどの DNA 傷害をもた

らず抗癌剤は細胞周期 G2/M arrest を生じることが知られている。PCBP4 は G2/M arrest を誘導する働きを持つ分子である。PCBP4 は、シスプラチンなどの抗癌剤投与によって誘導され、細胞周期を G2/M で停止させ、この間に傷害を受けた DNA は修復される。この結果、癌細胞はアポトーシスを回避し、シスプラチンに耐性を獲得すると考える。この際、PCBP4 を抑制すれば G2/M arrest は解除され、DNA 修復が不完全なまま細胞周期が進行する。この現象は G2 checkpoint abrogation と呼ばれているが、これにより、DNA 修復が不完全な癌細胞がアポトーシスに至り、シスプラチン耐性の減弱につながると考えている。従ってこのメカニズムは DNA 傷害による G2/M arrest を誘導する様々な抗癌剤に応用できる可能性があり、本研究の成果は今後の頭頸部癌の様々な抗癌剤耐性克服へ発展できる可能性があると考えられる。

本研究で予想された PCBP4 抑制による G2 checkpoint abrogation を介したシスプラチン耐性減弱メカニズム



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. Yumi Ito, Norihiko Narita, Nozomi Nomi, Chizuru Sugimoto, Tetsuji Takabayashi, Takechiyo Yamada, Kazuhiro Karaya, Hideki Matsumoto, and Shigeharu Fujieda Suppression of Poly(rC)-Binding Protein 4 (PCBP4) reduced cisplatin resistance in human maxillary cancer cells. Scientific Reports 2015 in press.

[学会発表](計 9 件)

1. Norihiko Narita Dai Susuki Chizuru Sugimoto Shigeharu Fujieda
Analysis of the Paclitaxel-resistant mechanism in head and neck cancers The 73rd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association 2014, 9 Yokohama, Pacifico Yokohama

2. 成田憲彦 伊藤有未 呉明美 高林哲司 杉本千鶴 藤枝重治
頭頸部癌タキソール耐性機構の解析
第 38 回日本頭頸部癌学会 2014.6 東京
ファッションタウンビルホール

3. Norihiko Narita Yumi Ito Dai Susuki Chizuru Sugimoto Shigeharu Fujieda
Suppression of SESN1 reduces cisplatin and hyperthermia resistance in human maxillary cancer cells. The 72nd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association 2013, 10 Yokohama, Pacifico Yokohama

4. 成田憲彦 眼窩下壁吹き抜け骨折に対する Combined Approach による整復術
第 52 回日本鼻科学会総会・学術講演会 2013.9 福井 フェニックスプラザ福井

5. 成田憲彦 伊藤有未 鈴木弟 杉本千鶴 藤枝重治
SESN1 阻害による頭頸部癌新規分子標的治療の可能性 第 37 回日本頭頸部癌学会 2013.6 東京 京王プラザホテル

6. Norihiko Narita Yumi Ito Masayuki

Okamoto Chizuru Sugimoto Shigeharu Fujieda

Suppression of SESN1 reduces cisplatin resistance in human maxillary cancer cells. 20th World Congress of The International Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies June 2013, Seoul, Korea

7. 成田憲彦 加藤雄士 森川太洋 坂下雅文 須長 寛 藤枝重治
当科での甲状腺手術における非反回下喉頭神経症例の検討 第23回日本頭頸部外科学会総会 2013.1 鹿児島 城山観光ホテル

8. Norihiko Narita, Yumi Ito, Yuichi Kimura, Dai Susuki, Chizuru Sugimoto, Shigeharu Fujieda Analysis of the cisplatin-resistant mechanism through SESN1 in head and neck cancers. 71th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association 2012.9 Sapporo, Royton Sapporo

9. 成田憲彦 伊藤有未 木村有一 鈴木弟 杉本千鶴 藤枝重治 SESN1による頭頸部癌シスプラチン耐性機構の解析
第36回日本頭頸部癌学会 2012.6 島根 島根県民会館

6. 研究組織

(1) 研究代表者

成田 憲彦 (NARITA, Norihiko)
福井大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：80345678

(2) 研究分担者

松本 英樹 (MATSUMOTO, Hideki)
福井大学・高エネルギー医学研究センター・准教授
研究者番号：40142377

(3) 連携研究者

伊藤 有未 (ITO, Yumi)
福井大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：00646458

高林 哲司 (TAKABAYASHI, Tetsuji)
福井大学・医学部・助教
研究者番号：70397272

山田 武千代 (YAMADA, Takechiyo)
福井大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：70283182

藤枝 重治 (FUJIEDA, Shigeharu)
福井大学・医学部・教授
研究者番号：30238539

柄谷 和宏 (KARAYA, Kazuhiro)
福井大学・ライフサイエンス支援センター・助手
研究者番号 70233997

(4) 研究協力者

杉本千鶴 (SUGIMOTO, Chizuru)

能美 希 (NOMI, Nozomi)