

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：24601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659902

研究課題名(和文) 口腔がんにおける遺伝子修復機構を標的とした抗がん剤増感の研究

研究課題名(英文) research on the potential molecular targets in DNA repair pathway for enhancing chemosensitivity of oral cancer cells

研究代表者

桐田 忠昭 (KIRITA, TADAAKI)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：70201465

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、化学療法による口腔顎顔面領域のがん治療増感を目的に、DNA修復経路が抗がん剤の増感効果をもたらす分子標的となり得るか否かについて、特に5-FUに関して検討を行った。様々なDNA修復酵素欠損細胞を用いて、殺細胞効果を高める候補をDNA修復経路の中から検討したところ、5-FUによってもたらされるDNA二本鎖切断(DSBs)の修復には、相同組み換え修復機構(HR)が非相同末端結合修復機構(NHEJ)よりも重要な役割を果たしていることが明らかとなり、HRの中でも特にBRCA2が重要と考えられた。さらに、ヒト口腔扁平上皮癌細胞へBRCA2のsiRNAを導入することで5-FUの増感効果を認めた。

研究成果の概要(英文)：5-FU is widely used in clinical cancer therapy. 5-FU induces DNA double-strand breaks (DSBs). The aim of this study was to learn more about pathways which are involved in the repair of 5-FU-induced DSBs. Cell survival after drug treatment was examined with colony forming assays using Chinese hamster lung fibroblast cells, or Chinese hamster ovary cell lines which are deficient in DSB repair pathways involving the homologous recombination repair-related genes BRCA2 and XRCC2, and the non-homologous end joining repair-related genes DNA-PKcs and Ku80. It was found that BRCA2 was involved in such repair, and might be effectively targeted to inhibit the repair of 5-FU damage. Observations showed that a knockdown of BRCA2 using small interference RNA suppression increased sensitivity to 5-FU in human oral cancer SAS and HSC3 cells. These findings suggest that down regulation of BRCA2 might be useful for sensitizing tumor cells during 5-FU chemotherapy.

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：DNA repair 5-fluorouracil BRCA2 oral cancer

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て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。5-Fluorouracil (FU) は抗がん剤治療において広く使われており、口腔がんでは単剤もしくは他の抗がん剤や放射線と併用で使われことが多い。抗がん剤の多くは DNA を標的としているが、抗がん剤によって生じる DNA 損傷がどのような種類の傷であるのか、またこれらの損傷がどのように修復されるかについては十分に明らかにされていないのが現状である。我々は近年、5-FU が DSB を引き起こすことを確認し、すでに各種 DNA 修復遺伝子の欠損細胞を用いたスクリーニングで候補遺伝子をいくつか同定している。そこで、5-FU をはじめとした抗がん剤に関して、DNA 修復機構における抗がん剤の増感標的候補を明らかにすることで、新規増感剤の開発や治療効果予測指標として臨床に応用出来るのではないかと考えた。

2. 研究の目的

今回我々は、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明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 細胞 : Chinese hamster lung fibroblast 由来の *BRCA2* deficient 細胞、*XRCC2* deficient 細胞、*ku80* deficient 細胞および *DNA-PKcs* deficient 細胞とそれぞれの親株細胞を用いた。

胞を用いた。

(2) 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。

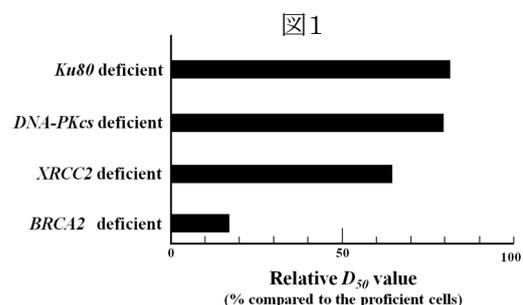
(3) DNA 二本鎖切断量の測定 : フローサイトメトリーによって、5-FU による 24 時間処理後の γ H2AX 量を経時的に測定し、DNA 二本鎖切断量を比較検討した。

(4) 細胞周期の経時的変動の解析 : フローサイトメトリーによって、5-FU による 24 時間処理後の細胞周期の経時的変動を解析した。

(5) ヒト細胞での増感効果の検討 : ヒト口腔扁平上皮癌細胞へ標的になると考えられた *BRCA2* siRNA を導入し、5-FU の増感効果を検討した。

4. 研究成果

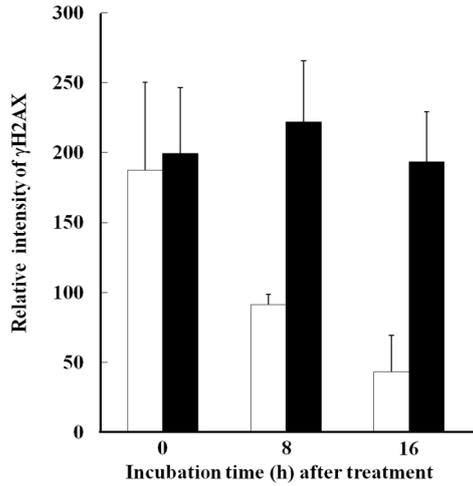
(1) 図 1 は、それぞれの修復酵素欠損細胞の 50% 生存率の薬剤濃度をその親株細胞の 50% 生存率の薬剤濃度と比較し % 表示したものであり、*BRCA2* 欠損細胞が 17% と最も小さくなり、*BRCA2* が 5-FU の増感標的に成り得るのではないかと考えられた。



(2) 図 2 は、*BRCA2* deficient 細胞およびその親株細胞を用いて、5-FU 処理後の DNA 2 本鎖切断量の経時的変化を解析するために γ H2AVX を指標としてフローサイトメトリー

により定量化したものである。*BRCA2* deficient 細胞（黒グラフ）では、その親株細胞（白グラフ）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。

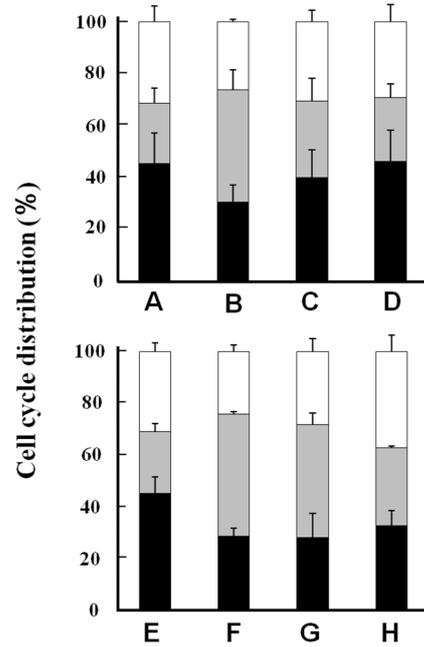
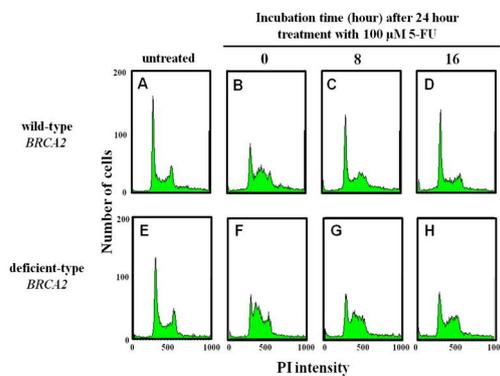
図 2



(3) 図 3 は、*BRCA2* deficient 細胞およびその親株細胞を用いて 5-FU 処理後の細胞周期の変動を示した図である。

図 3 のヒストグラム A~H と棒グラフ A~H はそれぞれ対応している。それぞれの上段 A~D は親株細胞、下段の E~H は deficient 細胞を示している。また、棒グラフの黒色は G1 期、灰色は S 期、白色は G2/M 期を示している。

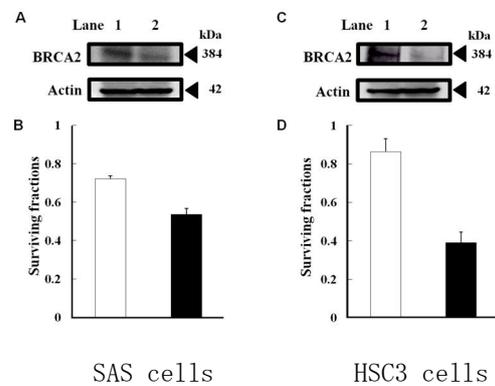
図 3



どちらの細胞も処理直後は S 期での arrest を認めた。親株細胞では、16 時間後には、ほぼ無処理のものと同じ細胞周期に戻っていたのに対し、deficient 細胞では 16 時間後も S 期から G2/M 期での細胞周期の停止を認めていた。

(4) 図 4 は、ヒト口腔扁平上皮癌細胞への *BRCA2* siRNA 導入により、5-FU の増感効果が得られた結果を示している。

図 4

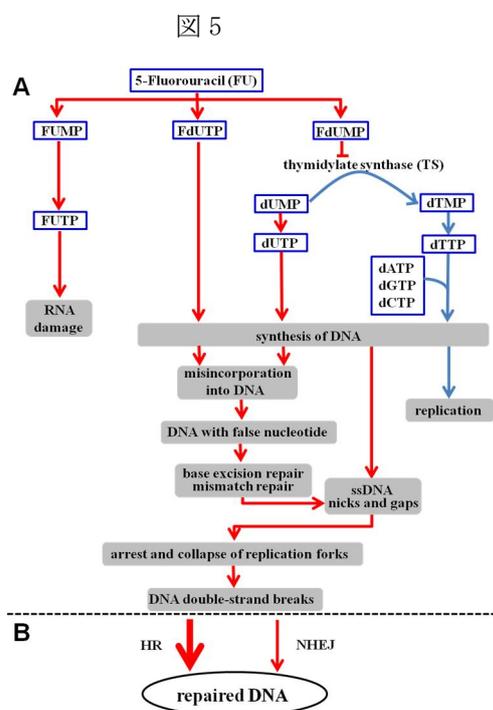


図の上段は、BRCA2 siRNA を導入による BRCA2 のタンパク発現抑制がウエスタンブロット法を用いて確認されたことを示している。Lane1 はコントロール siRNA、Lane2 は *BRCA2* siRNA をそれぞれ導入した結果である。

下段は、siRNA 導入後の 5-FU 処理による殺細胞効果を比較したものであり、どちらの細胞においても、コントロール siRNA (白グラフ) と比較し *BRCA2* siRNA を導入した細胞 (黒グラフ) の方が 5-FU の増感効果を認めた。SAS 細胞では 3 割、HSC3 細胞では 5 割程度の生存率の減少を認めた。

以上の結果から、DNA 修復経路における *BRCA2* は、5-FU 増感の標的になると考えられ、その発現阻害により 5-FU によるより効果的ながん治療が期待されるものと考えられた。

(図 5 の A は、5-FU のもたらす DNA 損傷メカニズムを示し、B は本研究から得られた結果を示している。)



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

- ① Nakagawa Y., Kajihara A., Takahashi A., Kondo N., Mori E., Kirita T., Ohnishi T. The BRCA2 gene is a potential target during 5-fluorouracil therapy in human oral cancer cells. *Oncology reports* 31: 2001-2006, 2014. 査読あり
- ① Kajitani C., Asakawa I., Uto F., Katayama E., Inoue K., Tamamoto T., Shirone N., Okamoto H., Kirita T., Hasegawa M. Efficacy of FDG-PET for defining gross tumor volume of head and neck cancer. *Journal of Radiation Research* 54:671-678, January 3, 2013. 査読あり
- ② Kirita T., Yamanaka Y., Imai Y., Yamakawa N., Aoki K., Nakagawa Y., Yagyuu T., Hasegawa M. Preoperative concurrent chemoradiotherapy for stages II – IV oral squamous cell carcinoma: a retrospective analysis and the future possibility of this treatment strategy *International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery* 41:421-428, 2012. Clinical Paper Head and Neck Oncology 査読あり
- ③ Nakagawa Y., Takahashi A., Kajihara A., Yamakawa N., Imai Y., Ota I., Okamoto N., Mori E., Noda T., Furusawa Y., Kirita T., Ohnishi T. Depression of p53-independent Akt survival signals in human oral cancer cells bearing mutated p53 gene after exposure to high-LET radiation. *Biochem Biophys Res Commun.* 423(4):654-60. Epub 2012. 査読あり

- ④Izumo T., Kirita T., Arijii E., Ozeki S., Okada N., Okabe S., Okazaki Y., Omura K., Kusama M., Sato T., Shinohara M., Shimozato K., and Working Group 1 on the 'Guidelines for Clinical and Pathological Studies of Oral Cancer'. Scientific Committee, Japan Society for Oral Tumors General Rules for Clinical and Pathological Studies on Oral Cancer: A Synopsis. Japanese Journal of Clinical Oncology 42(11):1099-1109, 2012. 査読あり
- ⑤玉置盛浩、山中康嗣、下村弘幸、笹平友則、山川延宏、柳生貴裕、青木久美子、今井裕一郎、桐田忠昭。唾液腺原発粘表皮癌の臨床病理学的検討 日本口腔腫瘍 24(4):137-145, 2012. 査読あり
- ⑥Sasahira T., Kurihara M., Bhawal UK., Ueda N., Shimomoto T., Yamamoto K, Kirita T., Kuniyasau H. Downregulation of miR-126 induces angiogenesis and lymphangiogenesis by activation of VEGF-A in oral cancer. Br J Cancer 107(4): 700-706, 2012. 査読あり

[学会発表] (計5件)

- ①栗原都、笹平智則、山本一彦、ウジャー・パワー、桐田忠昭、國安弘基 「口腔扁平上皮癌における MIA2 の役割」 第 103 回 日本病理学会総会 (2014 年 4 月 24~26 日、広島国際会議場 ANA クラウンプラザ ホテル広島)
- ②桐田忠昭、今井裕一郎、山川延宏、青木久美子、柳生貴裕、中村泰士、仲川洋介、上田順宏、山中康嗣 「口腔進行癌に対する化学放射線療法の臓器機能温存療法としての可能

性」 第 31 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会ワークショップ (2013 年 1 月 24-25 日 秋葉原コンベンションセンター)

- ③梶原淳久、仲川洋介、高橋昭久、桐田忠昭、大西武雄 「DNA 修復を標的とした温熱増感効果」 日本ハイパーサーミア学会第 30 回大会 (2013 年 8 月 30・31 日、横浜シンポジウム)
- ④桐田忠昭 「術前化学放射線療法について～口腔進行癌に対する術前化学放射線療法の評価と今後の新たな可能性」 第 58 回日本口腔外科学会総会・学術大会 (2013 年 10 月 11-13 日、福岡国際会議場・マリヌメッセ福岡)
- ⑤下村弘幸、笹平智則、山中康嗣、栗原都、今井裕一郎、玉木盛浩、青木久美子、國安弘基、長谷川正俊、桐田忠昭 「進行口腔癌の術前治療の評価における FDG-PET/CT の有用性」 第 51 回 日本癌治療学会学術集会 (2013 年 10 月 24-26 日、京都国際会館・グランドプリンスホテル京都)

[その他]

ホームページ等

<http://www.naramed-u.ac.jp/~oral/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桐田 忠昭 (KIRITA, Tadaaki)
奈良県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：70201465

(2) 研究分担者

梶原 淳久 (KAJIHARA, Atsuhisa)
奈良県立医科大学・医学部・研究員
研究者番号：00382317