

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791738

研究課題名(和文)喫煙関連頭頸部癌における浸潤能獲得、薬剤耐性獲得機序の解明と新治療法の開発

研究課題名(英文) Identification of responsible genes associated with an acquired resistance anti-cancer drugs by exome sequence and microarray analyses in smoking exposed human cancers.

研究代表者

小川 武則 (OGAWA, TAKENORI)

東北大学・大学病院・講師

研究者番号：50375060

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、喫煙について、発がん要因のみならず、化学放射線治療の耐性化機序、浸潤能獲得機序の解明のため、頭頸部がんを含む細胞株に喫煙抽出物を曝露させた上で評価を行い、将来の喫煙関連頭頸部がん制圧を目的としているが、以下のごとく研究成果であった。

1、頭頸部扁平上皮癌細胞株3種類について、喫煙曝露細胞株の抗がん剤、分子標的薬感受性を評価し、シスプラチン、EGFR阻害薬の耐性を確認した。また、肺癌、膀胱癌細胞にて浸潤能の新規獲得を確認した。2、次世代シーケンサーを用いた409がん抑制遺伝子のシーケンスにより、新規獲得変異を確認した。3、miRNAアレイにより、喫煙暴露関連miRNAを抽出した。

研究成果の概要(英文)：Acquired resistance to anti-cancer drugs by smoking related carcinomas is a persistent problem in many chemotherapy treatment programs. Currently, no model exists to compare parental and drug resistant cell lines in smoking related head and neck squamous cell carcinomas. In order to effectively study the mechanisms of resistance, we sought to develop a number of cell lines resistant to multiple drugs commonly used in the treatment of smoking related cancers. MTT assay revealed that all three lines were resistant to the EGFR targeted drugs and cis-diamminedichloroplatinum. The identification of the resistance-related genes was also conducted between parental cells and CSE exposed cells using sequencing technologies and microarray. This analyses revealed several genes that were differentially expressed between parental and subline cells. These novel drug resistant cells lines may help to identify gene products responsible for resistance to single and multiple agents.

研究分野：外科系臨床医学

科研費の分科・細目：耳鼻咽喉科学

キーワード：頭頸部癌 薬剤耐性 分子標的薬耐性 喫煙

1. 研究開始当初の背景

喫煙関連癌は、頭頸部癌以外にも肺癌、食道癌、膀胱癌等、男性癌の約50%を占めると言われる。頭頸部扁平上皮癌の主要な発癌要因にも喫煙があるが、さらに、喫煙関連癌は喫煙非関連癌と比較しても、化学放射線療法後の予後不良因子としての側面をもつと言われている(小川 2010)(Maxwell 2010)。一般に喫煙関連癌は、頭頸部癌以外にも肺癌、食道癌、膀胱癌等、男性癌の約50%を占めると言われ、また、本邦においての肺癌の分子標的治療薬奏功患者背景を見ても、喫煙関連癌は非奏功要因であり、喫煙は、がん予防はさることながら、癌治療においても非常に重要な側面を持つ。

喫煙曝露実験としては、喫煙抽出物質を用い、粘膜上皮細胞、喫煙関連癌細胞の遺伝子病理学的特長の研究報告(Kim 2010、Huang 2010)もある。これらの研究は、本邦では、耳鼻咽喉・頭頸部外科学分野のみならず他分野でも稀な基礎研究であるが、実験手法としては頭頸部癌細胞に容易に応用可能であると考えられる。

2. 研究の目的

喫煙関連癌の化学放射線治療耐性機序の解明のため、頭頸部癌細胞株とタバコ抽出物を曝露させた喫煙曝露癌細胞株を用い、薬剤応答性と浸潤能獲得の解析を行い、獲得耐性が認められれば、Exome sequenceによる網羅的DNA変異調査、cDNAマイクロアレイ(遺伝子発現解析用マイクロアレイ)を用いたmRNA発現解析、マイクロRNAマイクロアレイを用いたマイクロRNA発現解析を行い、耐性獲得機序として、DNA、mRNA、miRNA発現の総合的な検討を行う。その耐性機序を解明することで、将来の頭頸部癌治療のオーダーメイド化、遺伝子制御等による頭頸部癌征圧、さらには他部位の喫煙関連癌征圧をも達成される可能性があり、これらを目標とする。これら一連の研究事業は、人為的にRNA干渉

(RNAi)にてのknockdown、発現ベクターを用いてのoverexpressionを用いれば、細胞内でのRNA発現量をコントロールできるため、RNAを制御することによる将来の癌征圧が可能となる。本研究では、さらに*in vivo*での耐性解除の可能性を検討し、将来の頭頸部癌征圧への新治療の開発へとつなげていく可能性のある研究テーマである。

3. 研究の方法

頭頸部癌細胞株とタバコ抽出物を曝露させた喫煙曝露癌細胞株を用い、薬剤(シスプラチン、セツキシマブ、5FU、ドセタキセルなど)応答性をMTT assayにて、浸潤能獲得の解析をInvasion assayにて行う。表現系の変化が認められれば、次世代シーケンサーを用いたexome sequence、cDNAマイクロアレイ、マイクロRNAマイクロアレイを用いたマイクロRNA発現解析、Western blottingを用いた蛋白解析を行い、DNA、RNA、蛋白の多方向から総合的な耐性獲得機序の検討を行う。

4. 研究成果

(1) 頭頸部扁平上皮癌3種類について、親株、喫煙曝露細胞株(直接投与、間接投与)間の薬剤感受性をMTT assayにて評価した。投与薬剤としては、シスプラチン、5FU、ドセタキセル、パクリタキセル、セツキシマブ、ゲフィチニブ、エルロチニブ、ジェムシタピンを用いた。その結果、セツキシマブ、ゲフィチニブ、エルロチニブに対して、喫煙曝露細胞株は優位な耐性を獲得した。またシスプラチン、パクリタキセルにおいても一部の細胞株で耐性を確認した。その他の薬剤については有意変化を確認できなかった。(2) 喫煙関連であるとされる肺癌細胞株、膀胱癌細胞株を用いた同様の実験系においても、上記のEGFRをターゲットとする分子標的薬の耐性が確認された。また、マトリゲルと用いた浸潤能確認実験系では、喫煙癌の高度浸潤

能を確認された。(3)上記耐性を獲得した頭頸部癌細胞株において、次世代シーケンサーを用いた Exome sequence を行った。結果として同期間継体を行った親株とは異なる遺伝子変異を検出した。(4)マイクロ RNA マイクロアレイを用い、喫煙曝露細胞にて優位変化をきたした喫煙関連マイクロ RNA を検出した。(5)蛋白解析において、他分子においてリン酸化の亢進を認め、これらを標的とする阻害薬は喫煙曝露細胞で感受性であり、逆相関していることが確認された。これらの新規分子は、喫煙曝露癌細胞のターゲットとして有用である可能性が示唆された。

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 11 件)

1, Smith DF, Maleki Z, Coughlan D, Gooi Z, Akpeng B, Ogawa T, Bishop JA, Frick KD, Agrawal N, Gourin CG, Ha PK, Koch WM, Richmon JD, Westra WH, Pai SI.

Human papillomavirus status of head and neck cancer as determined in cytologic specimens using the hybrid-capture 2 assay.

Oral Oncol. 2014 Mar 11. pii:

S1368-8375(14)00047-5. doi:

10.1016/j.oraloncology.2014.02.011. (査読あり)

2, Nomura K, Ogawa T, Sugawara M, Honkura Y, Oshima H, Arakawa K, Oshima T, Katori Y.

Association between septal deviation and sinonasal papilloma.

Tohoku J Exp Med. 2013;231(4):315-9. (査読あり)

3, Bishop JA, Ogawa T, Stelow EB, Moskaluk CA, Koch WM, Pai SI, Westra WH.

Human papillomavirus-related carcinoma with adenoid cystic-like features: a peculiar variant of head and neck cancer restricted to the sinonasal tract.

Am J Surg Pathol. 2013 Jun;37(6):836-44. (査読あり)

4, Shao C, Tan M, Bishop JA, Liu J, Bai W, Gaykalova DA, Ogawa T, Vikani AR, Agrawal Y, Li RJ, Kim MS, Westra WH, Sidransky D, Califano JA, Ha PK.

Suprabasin is hypomethylated and associated with metastasis in salivary adenoid cystic carcinoma. *PLoS One.* 2012;7(11):e48582.

(査読あり)

5, Bishop JA, Guo TW, Smith DF, Wang H, Ogawa T, Pai SI, Westra WH.

Human Papillomavirus-related Carcinomas of the Sinonasal Tract. *Am J Surg Pathol.* 2013 Feb;37(2):185-92. (査読あり)

6, Joseph AW, Ogawa T, Bishop JA, Lyford-Pike S, Chang X, Phelps TH, Westra WH, Pai SI. Molecular etiology of second primary tumors in contralateral tonsils of human papillomavirus-associated index tonsillar carcinomas. *Oral Oncol.* 2013 Mar;49(3):244-8. (査読あり)

7, Shiga K, Ogawa T, Katagiri K, Yoshida F, Tateda M, Matsuura K, Kobayashi T.

Differences between oral cancer and cancers of the pharynx and larynx on a molecular level. *Oncol Lett.* 2012 Jan;3(1):238-243. (査読あり)

8, Ogawa T, Saiki Y, Shiga K, Chen N, Fukushima S, Sunamura M, Nagase H, Hashimoto S, Matsuura K, Saijo S, Kobayashi T, Horii A. miR-34a is downregulated in cis-diamminedichloroplatinum treated sinonasal squamous cell carcinoma patients with poor prognosis. *Cancer Sci.* 2012 Sep;103(9):1737-43. (査読あり)

9, Ogawa T, Suzuki T, Sakamoto M, Watanabe M, Tateda Y, Oshima T, Kato K, Sagai S, Kobayashi T, Shiga K. Correct diagnosis of warthin tumor in the parotid gland with dynamic MRI. *Tohoku J Exp Med.* 2012;227(1):53-7. (査読あり)

10, Shiga K, Ogawa T, Kobayashi T, Ueda S, Kondo A, Nanba A, Kuwashima S, Asada Y, Suzuki S, Nagahashi T, Takahashi M, Suzuki M, Ishida A, Watanabe K, Harabuchi Y, Himi T, Sinkawa H, Sato H, Saijo S, Fukuda S, Tanaka K, Ishikawa K, Omori K, Aoyagi M, Hashimoto S. Malignant melanoma of the head and neck: A multi-institutional retrospective analysis of cases in Northern Japan. *Head Neck.* 2012 Nov;34(11):1537-41 (査読あり)

11, Ogawa T, Liggett TE, Melnikov AA, Monitto CL, Kusuke D, Shiga K, Kobayashi T, Horii A, Chatterjee A, Levenson VV, Koch WM, Sidransky D, Chang X. Methylation of death-associated protein kinase is associated with cetuximab and erlotinib resistance. *Cell Cycle.* 2012 Apr 15;11(8):1656-63. (査読あり)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

小川 武則 (OGAWA, TAKENORI)
東北大学・病院・講師

研究者番号 : 50375060