

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 1 日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791790

研究課題名(和文) 頭頸部癌におけるシスプラチン耐性機序と新規治療標的分子の解明

研究課題名(英文) Elucidation of cisplatin resistance mechanisms and a novel therapeutic target molecule in the head and neck cancer

研究代表者

能美 希 (Nomi, Nozomi)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：40468020

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：シスプラチンは頭頸部癌化学療法[key drug]であるが抗癌剤耐性獲得が治療の妨げとなることがしばしばある。今回われわれは頭頸部癌においてLamin A/Cの発現とシスプラチン耐性機序との関連を検討した。まず異なる3種の細胞株でシスプラチン耐性株を樹立したところ、耐性株では野生株と比較してLamin A/Cは強発現していた。またLamin A/Cの発現と関連してシスプラチンおよびカルボプラチンの感受性に変化が見られ、Lamin A/Cの発現と白金製剤の感受性との関連が示唆された。さらにLamin A/C強制発現株ではactinの発現が増強し、頭頸部癌の浸潤・転移にも関連する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Cisplatin is a key drug for head and neck cancer. However, acquired anticancer drug resistance is an obstacle to treatment. We have examined the relationship between cisplatin resistance mechanisms and expression of Lamin A/C in head and neck cancer. We established cisplatin-resistant cell lines in the three head and neck cancer. Lamin A/C was strongly expressed in resistant strains compared to the wild strain. We revealed the correlations between the sensitivity of cisplatin and carboplatin and the expression of Lamin A/C. We also showed relationship between the expression of actin and Lamin A/C expressions, which suggested that the expression of Lamin A/C might contribute the invasion and metastasis in head and neck cancer.

研究分野：耳鼻咽喉科

科研費の分科・細目：頭頸部外科

キーワード：頭頸部癌 化学療法 薬剤耐性 分子標的治療

1. 研究開始当初の背景

癌化学療法は頭頸部癌治療において重要な位置を占めている。近年、世界的に各種癌において新規分子標的治療薬の開発に注目が集まる中、頭頸部癌においてはまだ cetuximab 以外の新規分子標的治療薬は臨床応用の段階までは至っておらず、シスプラチンが頭頸部癌化学療法の key drug であることに異論はない。しかし実際の臨床の場ではその治療効果には限界や個人差があり、抗癌剤耐性獲得が治療の妨げとなることがしばしばある。シスプラチンの主な作用機序は DNA 架橋を形成し、DNA 複製や細胞分裂を阻害し、ATR, p53, JNK, p73 などと関連してアポトーシスを誘導することである。シスプラチン感受性および耐性化の機序に関わる分子についての研究は、これまで多くの研究者により模索されてきたが、現在まで臨床的に有用と思われる治療標的分子は解明されていない。

Lamin A/C は V 型中間系フィラメントに属し、分化・成熟した細胞に存在し、nuclear lamina を形成したり、核質においてクロマチンと結合してネットワークを形成したりしている。細胞骨格の維持や DNA 複製、転写、DNA 修復などにも関与し、生体内の恒常性維持に関与している。Lamin A/C は DNA に直接結合することができるほか、Rb, MyoD, Smad などに結合し、Rb/E2F, Rb/MyoD, Wnt/ β -catenin, TGF- β /Smad などの経路にも関与することも知られている。Lamin A/C をコードする LMNA gene の変異は Emery-Dreifuss 型筋ジストロフィーや Hutchinson-Gilford progeria syndrome といった laminopathy と総称される疾患の病因として広く知られている。近年になり、白血病、悪性リンパ腫、肺小細胞癌、大腸癌など悪性腫瘍でも Lamin A/C は発現していることが報告され、臨床検体の免疫組織学的染色でその発現の程度と予後との関連が示唆されているが、Lamin A/C の悪性腫瘍における機能については未解明な部分が多い。

2. 研究の目的

われわれはこれまでにシスプラチン耐性機序に関わる新たな標的分子を解明するためにシスプラチン耐性株を異なる数種の頭頸部癌細胞株で樹立した。これまでの予備実験では、IMC-3 (ヒト上顎洞扁平上皮癌) とその耐性株を用い、Lamin A/C がシスプラチン耐性株で野生株と比較して強発現していることを real-time RT-PCR 法および Western-blot 法により確認した。さらに Lamin A/C がヒト正常リンパ球と比較して頭頸部癌ではいずれも差こそあれ強発現

する傾向にあり、real-time RT-PCR では数十倍から数百倍発現が亢進していることが明らかとなった。また、in vitro で Lamin A/C 発現ベクターおよび siRNA を導入し、発現ベクター導入群ではシスプラチン耐性の増加を、また siRNA 導入群ではシスプラチン感受性の増加を認めることを確認している。本研究では、頭頸部癌において Lamin A/C がどのような経路を介してシスプラチン耐性機序に関与するか、頭頸部癌においてどのような機能を有しているか、また将来的に新たな治療標的分子となりうるか解明することを目的とした。

3. 研究の方法

IMC-3 (ヒト上顎洞扁平上皮癌)、SAS (ヒト舌扁平上皮癌)、T3M-1 (ヒト口腔扁平上皮癌) でシスプラチン耐性株 (cisplatin-resistant; CR) を樹立した。いずれも有意な薬剤耐性の獲得が得られたことを MTT assay にて確認した。

Lamin A/C の発現についての検討

異なる頭頸部癌細胞株で Lamin A/C の発現の比較を行った。また、野生株と耐性株についてもその発現の比較を行った。Lamin A/C の発現については RT-PCR, real-time RT-PCR 法, Western-blot 法, 蛍光免疫染色法にて検討した。また、Lamin A/C siRNA, Lamin A/C 発現ベクターの導入効率の判定には Western-blot 法を行った。

薬剤感受性の検討

薬剤感受性は MTT assay を用いて検討した。薬剤添加後 48 時間で MTT assay を施行し細胞数の変化で検討を行った。Lamin A/C siRNA ならびに Lamin A/C 発現ベクターを作成し、野生株および耐性株にトランスフェクション後 24 時間で薬剤添加を行い、同様にその 48 時間後に MTT assay を行い、薬剤感受性の変化について検討した。シスプラチンの濃度は 0, 0.1, 1, 2mg/ml, カルボプラチンの濃度は 0, 10, 100, 200mg/ml, ペブレオマイシンの濃度は 0, 5, 50, 100mg/ml, 5-FU の濃度は 0, 50, 500, 1000mg/ml とした。

アポトーシスの判定

MTT assay で確認したシスプラチン添加後の細胞数の変化がアポトーシスによる減少かを確認するために、シスプラチン添加後 48 時間の細胞を回収し、PI, Annexin V で染色した後、フローサイトメトリーで検討を行った。Lamin A/C siRNA 導入後の細胞についてもトランスフェクション後 24 時間でシスプラチン添加を行い、48 時間後に染色を行い検討した。

細胞形態の観察

細胞株に Lamin A/C 発現ベクターあるいはコントロールベクターを導入したのち、蛍光免疫染色を行い、細胞形態の変化を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。細胞核は DAPI、アクチンは phalloidin で染色した。

4. 研究成果

Lamin A/C の発現についての検討

頭頸部癌細胞株で Lamin A/C の発現を比較検討すると、いずれの細胞株でも Lamin A/C は mRNA レベルおよびタンパクレベルで発現がみられたが、その程度には差がみられた。このうち 3 種の細胞株においてシスプラチン耐性株を樹立して検討を行うと、いずれの細胞株でも cisplatin 耐性株では野生株と比較して Lamin A/C は強発現していた。このうち有効なトランスフェクションが得られたのは、IMC-3 および SAS とそれらの耐性株であった。

薬剤感受性の検討

いずれの細胞株においても、野生株と比較してシスプラチン耐性株では cisplatin と同様に白金製剤である carboplatin にも耐性を示した。IMC-3 および SAS とそれらの耐性株に Lamin A/C 発現ベクターおよび siRNA を導入し、薬剤感受性の変化を検討すると、Lamin A/C の発現と関連して cisplatin および carboplatin の感受性に変化が見られ、強制発現株では platinum 製剤の感受性の低下が、knockdown 株では白金製剤の感受性の増加が見られた。白金製剤とは異なる作用機序をもつ 5-FU、ペブレオマイシンなどでは Lamin A/C の発現量と感受性に関連を認めなかった。この結果より、Lamin A/C が白金製剤の感受性と関連する分子である可能性が示唆された。

アポトーシスの判定

シスプラチン添加後 48 時間の細胞を PI, Annexin V で蛍光染色し、フローサイトメトリーで解析を行ったところ、耐性株では PI, Annexin V 陽性細胞は野生株と比較して減少していたが、Lamin A/C siRNA 導入後は有意に PI, Annexin V 陽性細胞が増加していた。この結果、Lamin A/C の発現はシスプラチンにより誘導される頭頸部癌のアポトーシスに関連することが明らかとなった。

細胞形態の観察

細胞形態の変化を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。野生株と耐性株を比較すると細胞核の形態の変化は明らかではなかったが、耐性株では actin の発現が増強し、細胞膜からの filopodia や lamellipodia の形成が増加する傾向があった。また、Lamin A/C 発現ベクターならびにコントロールベ

クター導入後に同様に細胞形態の変化について観察を行うと、Lamin A/C 強制発現株ではアクチンフィラメント伸長が野生株と比較して増強していた。

この結果より Lamin A/C は白金製剤の感受性のみならず、頭頸部癌の浸潤・転移にも関連する可能性が示唆された。

今回の結果より、頭頸部癌において Lamin A/C は白金製剤の耐性獲得機序との関連が示唆され、将来的には治療標的分子の候補ならびに治療効果予測因子として多方向から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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

能美 希, 児玉 悟, 杉本千鶴, 高林哲司, 岡本昌之, 伊藤有未, 鈴木 弟, 藤枝重治, 鈴木正志: 頭頸部癌におけるシスプラチン耐性獲得機序における Lamin A/C の検討. 第 32 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会, 2013.2.6-8, 徳島市

〔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

6 . 研究組織

(1)研究代表者

能美 希 (NOZOMI NOMI)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：40468020

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：