

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：17401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890174

研究課題名(和文) 口腔扁平上皮癌における薬剤耐性機構の解明と新規治療薬の開発

研究課題名(英文) Development of novel therapeutics and elucidation of drug resistance mechanisms in oral squamous cell carcinoma

研究代表者

永田 将士(NAGATA, MASASHI)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師

研究者番号：10635791

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：われわれは口腔扁平上皮がん(OSCC)細胞株を用い、CDDP耐性株を樹立した後、その解析結果にてOSCCのCDDP耐性におけるアポトーシス阻害タンパクであるcIAP2の重要性を提示した。また、われわれは以前OSCCにおいてcIAP2の発現が5-FU耐性をもたらし、5-FU感受性因子ならびに予後因子となることを報告した。これらのことはcIAP2が多剤耐性の標的因子となる可能性を示している。難治性のOSCC患者においてcIAP2を標的とし、その発現を抑制することにより、化学放射線療法の効果を増強させ、生存率を改善することが可能になるかもしれない。この結果は現在論文として執筆中である。

研究成果の概要(英文)：After establishment of CDDP-resistant oral squamous cell carcinoma(OSCC) cell line, we have presented the importance of cIAP2 is an apoptosis inhibitory protein in CDDP resistance of OSCC in the analysis result. Further, we have reported that it is a prognostic factor and,5-FU-sensitive factor expression cIAP2 leads to 5-FU resistance in OSCC previously. These things indicate the possibility of cIAP2 is the target factor of multi-drug resistance. By targeting cIAP2 in OSCC patients refractory to suppress the expression, it may be possible to enhance the effect of chemo-radiation therapy and improve survival. This result is in the middle of writing paper as currently.

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：口腔癌 薬剤耐性 アポトーシス 新規治療薬

1. 研究開始当初の背景

(1) 口腔癌の現状と薬剤耐性について

口腔扁平上皮癌 (OSCC) では、cisplatin (CDDP) を含む白金製剤と代謝拮抗剤である 5-FU 系抗がん剤が汎用されている。当科では、OSCC の進行例に対する治療方針として、2003 年より 5-FU 系抗がん剤である TS-1® の 2 週間内服と放射線 30Gy 照射による術前の化学放射線療法を採用してきた。しかしながら、OSCC の進行例や再発例では予後は不良であり、その原因の一つとしては、進行例や再発例の多くは 5-FU を用いた化学療法に耐性を示すことが挙げられる。一方、多くの腫瘍が 5-FU に感受性を示すものの、持続的な薬剤への暴露により耐性が獲得されたと考えられている。このような症例では、薬剤が遺伝子発現に変化を引き起こし、異常となったシグナル経路を介して耐性を獲得させると考えられている。

(2) 5-FU 耐性機構の解明

申請者は OSCC の 5-FU 抵抗性に関連する新規の分子を探索するために、2 年以上かけ 5-FU 耐性 OSCC 細胞株を樹立した。その後、親株と耐性株に対して行なった DNA マイクロアレイ解析の結果をもとに、アポトーシス阻害因子である cIAP2 に着目し、OSCC の 5-FU 耐性における cIAP2 の機能解析を行った。IAP family は caspase の活性化を阻害することにより、アポトーシス阻害因子として働くことが知られている。申請者の樹立した耐性株に対しても cIAP2 による caspase-9 阻害が、5-FU によるアポトーシスを阻害し、耐性を獲得していることを解明した。また、5-FU 系抗がん剤を使用した術前放射線化学療法を施行した OSCC 患者において、cIAP2 発現は治療効果と有意な相関を認め、cIAP2 高発現患者群は有意に予後不良であり、cIAP2 の発現は予後因子となりうることを報告した (Nagata et al. BJC 2011)。

(3) 5-FU と CDDP に対する OSCC の交差耐性機構の解明

申請者は、樹立した 5-FU 耐性株および親株を用いた、CDDP 投与後の生存分析により、CDDP との交差耐性を確認している。交差耐性は臨床では頻りにみられる現象であり、初回治療時に抗がん剤を使用し、再発を認めた症例の予後不良に強く結びついている。他領域の癌では 5-FU と CDDP の交差耐性は実験レベルにてすでに報告があるが、口腔癌ではいまだ報告がない。

2. 研究の目的

(1) 複数の 5-FU 耐性株を用いた薬剤耐性因子の探索

以前の研究で使用した細胞株は 1 種類のみであり、他の樹立株については検討を行っていない。そこで、本研究では他の耐性株を用い、IAP family の 5-FU との関連、ならびに新規の 5-FU 耐性因子を探索する

(2) 5-FU と並び、世界的に頻用されてい

る CDDP に対しても、OSCC 細胞株での耐性株樹立に成功している。これらの細胞を用い、CDDP 耐性因子の検索を行う。

(3) 本研究では、CDDP 耐性因子の確認を行うとともに、IAP Family の交差耐性への関与を検討する。また、IAP 発現抑制による CDDP 耐性の解除の検討を行う。

3. 研究の方法

(1) 当科にて樹立した 5-FU 耐性 OSCC 細胞株である、SAS/FR2 と Ca9-22/FR2 とその親株をマイクロアレイ解析し、十分な発現量をもち、有意に発現が変化している因子を抽出した。その因子のなかで、2 つの細胞株で同様に発現の変化を認めたもので、抗がん剤耐性機構に関係している因子を選んだ。その結果得られた候補因子にたいし、実際の発現解析を行った。

(2) 当科で樹立した CDDP 耐性株を用い、マイクロアレイ解析し、有意な発現量および発現の変化をみとめた因子に関して、CDDP 耐性との関連性を検討した。また、その因子に対し、抑制実験をおこない、CDDP 耐性の解除が可能であるかを検討した。

(3) 5-FU 耐性株の CDDP 耐性に関して、IAP Family の交差耐性への関与を検討した。また、IAP 発現抑制による CDDP への交差耐性の解除の検討をした。

4. 研究成果

(1) 複数の 5-FU 耐性株を用いた新規耐性因子の同定

DNA マイクロアレイ解析結果による 5-FU 耐性 OSCC 細胞株における Fibronectin の上昇

当科で樹立した 5-FU 耐性株を 2 種とそれぞれの親株に対し、DNA マイクロアレイ解析を行った結果、細胞外マトリックス関連遺伝子の Fibronectin (FN) が顕著に発現上昇していることを見出した。FN の遺伝子レベル、タンパクレベルでの発現を Real-Time PCR 法とウェスタンブロット法で観察したところ、DNA マイクロアレイの解析結果と一致していた。

5-FU 耐性 OSCC 細胞株における FN の分泌上昇

5-FU 耐性 OSCC 細胞株において発現上昇している FN が、細胞外に分泌されているかを確認するために、耐性株および親株において培養液中に分泌される FN の量を 5-FU 非存在下で ELISA 法を用いて経時的に計測した (図 1)。耐性株と親株の間で細胞増殖活性そのものには変化が無かったことから、親株と比較すると 5-FU 耐性 OSCC 細胞において有意に FN の分泌が増加していることが分かった。これらの結果は、5-FU 耐性 OSCC 細胞が自身を 5-FU による殺細胞効果から守るために、腫瘍微小環境を構築する可能性が示唆された。

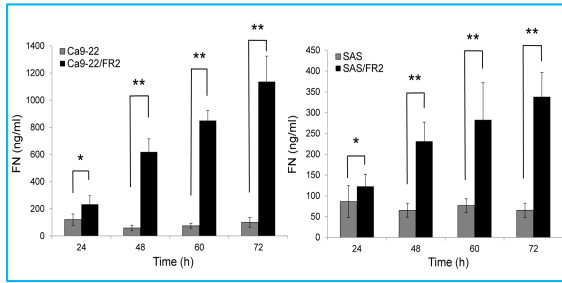


図1. 5-FU 耐性株と親株における FN の分泌量グラフ

以上の結果は共同研究者の中川が報告している (Nakagawa et al., IJO 44(4),2014)

(2) OSCC における CDDP 耐性機構の解明

OSCC 細胞株を用いた CDDP 耐性株の樹立
CDDP を添加した培地にて SAS 細胞 (ヒト舌 SCC 細胞株) を培養し、徐々に濃度を上昇させ、2 年以上培養をおこない耐性株作成した (SAS/CR)。その結果、増殖速度には変化は認められないものの、CDDP への耐性度は IC50 で 7 倍以上になった (図 2)。

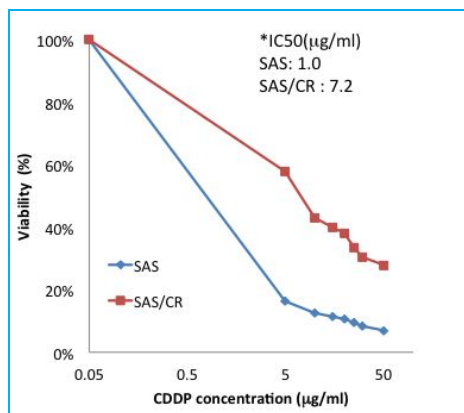


図 2 : 親株と CDDP 耐性株における、CDDP 感受性曲線

CDDP 耐性株における cIAP2 (cellular Inhibitor apoptotic protein 2) の過剰発現

樹立した CDDP 耐性株と親株の細胞から mRNA を回収し、マイクロアレイ解析をおこない、網羅的に遺伝子発現の変化を確認した。その中から耐性に関わる (CDDP 分解因子、薬物輸送因子、抗アポトーシス因子、DNA 分解因子) 4 つの機構にしぼりこんで評価をおこなったところ、抗アポトーシス因子の 1 つである cIAP2 が有意に上昇していた。これまで過去の報告されている CDDP の排泄をおこなう MRP2、MRP5 や CDDP 分解因子である GST には有意な変化は認めなかった。また、タンパクレベルでの発現上昇も確認した。

CDDP 投与によるアポトーシスと、耐性株におけるアポトーシス回避

親株と耐性株において CDDP 投与後のアポトーシス耐性能の差を確認するため、CDDP 刺激による caspase-3、-8、-9 活性を分析した。CDDP を 2.0 µg/ml 添加した培地にて培養を行い、60 時間後に測定した結果、親株は耐性株に比べ内因経路アポトーシス因子である caspase-9 の活性が有意に上昇していた。次に、TUNEL 法にて実際のアポトーシス細胞の測定を行なった結果、2.0 µg/ml の CDDP を 72 時間投与した時点での TUNEL 染色結果は、著明に親株において陽性細胞が多く、耐性株における cIAP2 の高発現は caspase 活性阻害によりアポトーシスを抑制し、CDDP 耐性をおこしていることが示唆された。

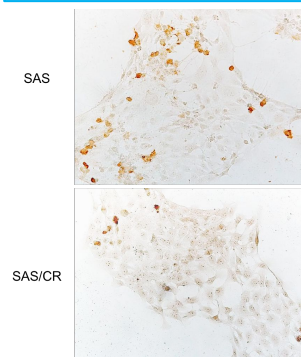
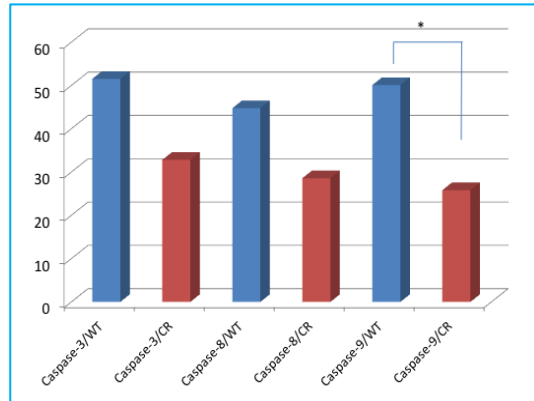


図 3 : 親株 (SAS) と CDDP 耐性株 (SAS/CR) の CDDP 投与刺激によるカスパーゼ活性 (左) および TUNEL 法 (右) によるアポトーシス解析

siRNA を用いた cIAP2 の発現抑制と CDDP 耐性度の変化
cIAP2 の発現抑制時の CDDP 耐性度を評価するために、siRNA を用いて、SAS/CR での cIAP2 発現抑制実験を行なった。cIAP2 の発現を十分に抑制させるため、10 nmol/L の siRNA を導入し、mRNA レベルにおいて 70% 程度の抑制を確認した。cIAP2 siRNA およびコントロール siRNA を導入した後に CDDP を投与した結果、cIAP2 を抑制した細胞の CDDP 感受性はコントロールに比べ有意に上昇していた。(図 4)。これらの結果により、cIAP2 は OSCC の CDDP 耐性度に影響を与える重要な因子であることが示唆された。

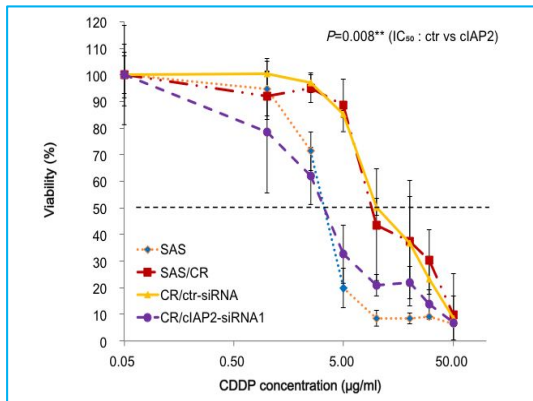


図4：CDDP 耐性株に対する RNA 干渉による cIAP2 の抑制後の CDDP 生存曲線

以上の結果は、2013 年の頭頸部癌学会および癌学会にて報告し、論文執筆中である。

(3) 5-FU 耐性株における CDDP への交差耐性メカニズム解析

5-FU 耐性株における CDDP への交差耐性以前樹立した 5-FU 耐性株における CDDP の感受性を確認した。CDDP を添加した培養液にて 3 日間、親株と 5-FU 耐性株をそれぞれ培養した結果、IC50 にて 3.3 倍の耐性を認められた (図 5)。

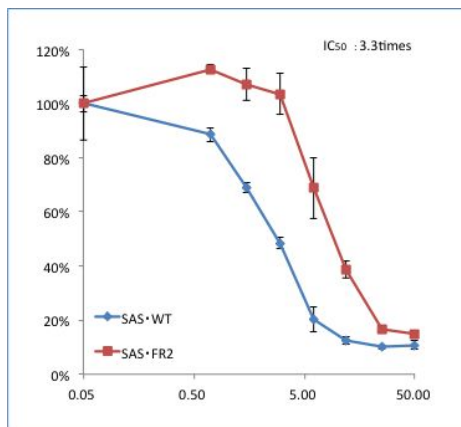


図5：5-FU 耐性 OSCC 細胞株と親株に対する CDDP 感受性曲線

5-FU 耐性 OSCC 細胞株に対する CDDP 投与時のアポトーシス解析

親株と 5-FU 耐性株において CDDP 投与後のアポトーシス耐性能の差を確認するため、CDDP 刺激による caspase-3、-8、-9 活性を分析した。CDDP を 2.0 µg/ml 添加した培地にて培養を行い、60 時間後にて測定した結果、親株は耐性株に比べアポトーシス因子である caspase-3、-9 の活性が有意に上昇していた。次に、TUNEL 法にて実際のアポトーシス細胞の測定を行なった結果、2.0 µg/ml の CDDP を 72 時間投与した時点での TUNEL 染色結果は、著明に親株において陽性細胞が多く、耐性株における cIAP2 の高発現は Caspase 活性阻害によりアポトーシスを抑制し、CDDP 耐

性をおこしていることが示唆された。

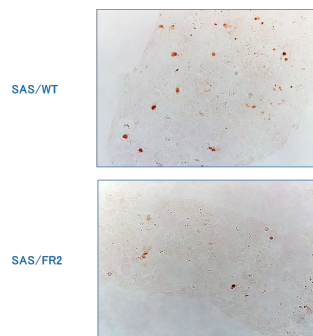
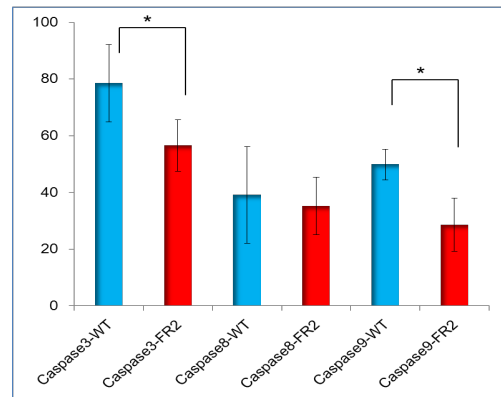


図6：親株(SAS/WT)と5-FU 耐性株(SAS/FR2)の CDDP 投与刺激によるカスパーゼ活性および TUNEL 法によるアポトーシス解析

siRNA を用いた cIAP2 の発現抑制と CDDP 耐性度の変化

cIAP2 の発現抑制時の CDDP 耐性度を評価するために、siRNA を用いて、SAS/FR2 での cIAP2 発現抑制実験を行なった。cIAP2 の発現を十分に抑制させるため、10 nmol/L の siRNA を導入し、mRNA レベルにおいて発現抑制を確認した。cIAP2 siRNA およびコントロール siRNA を導入した後に CDDP を投与した結果、cIAP2 を抑制した細胞の CDDP 感受性はコントロールに比べ有意に上昇していた。(図 7)。これらの結果により、cIAP2 は OSCC の CDDP への交差耐性に影響を与える重要な因子であることが示唆された。

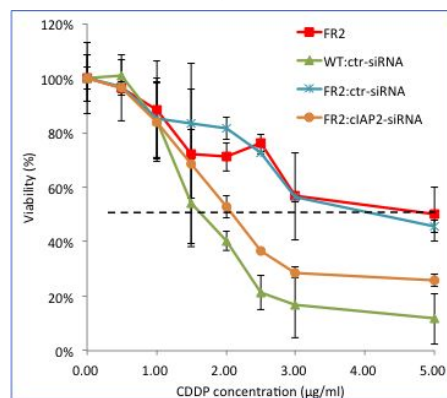


図7：5-FU 耐性株に対する RNA 干渉による cIAP2 の抑制後の CDDP 生存曲線
以上の結果は 2012 年の癌学会にて報告しており、現在論文執筆中である。

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 2 件)

Kawahara K, Nakayama H, Nagata M, Yoshida R, Hirose A, Tanaka T, Nakagawa Y, Matsuoka Y, Kojima T, Takamune Y, Yoshitake Y, Hiraki A, Shinohara M.

A low dicer expression is associated with resistance to 5-FU-based chemoradiotherapy and a shorter overall survival in patients with oral squamous cell carcinoma.

Journal of Oral Pathology and Medicine, 2014 May 43(3) p350-356

Nakagawa Y, Nakayama H, Nagata M, Yoshida R, Kawahara K, Hirose A, Tanaka T, Yuno A, Matsuoka Y, Kojima T, Yoshitake Y, Hiraki A, Shinohara M

Overexpression of fibronectin confers cell adhesion-mediated drug resistance (CAM-DR) against 5-FU in oral squamous cell carcinoma cells.

International Journal of Oncology, 2014 April 44(4), p1376-1384

[学会発表](計 3 件)

Masashi Nagata, Hideki Nakayama, Takuya Tanaka, Ryoji Yoshida, Yoshihiro Nakagawa, Kenta Kawahara, Yoshihiro Yoshitake, Akimitsu Hiraki, Masanori Shinohara

Increased cIAP2 produces cisplatin resistance in a human oral squamous cell carcinoma cell line

第 72 回日本癌学会学術総会・2013 年 10 月 3 日・パシフィコ横浜

永田将士、中山秀樹、吉田遼司、川原健太、中川純泰、藤家稔久、田中拓也、吉武義泰、平木昭光、篠原正徳

ヒト口腔扁平上皮癌細胞株を用いた CDDP 耐性株の樹立と cIAP2 の役割

第 37 回頭頸部癌学会・2013 年 6 月 12 日・京王プラザホテル・東京

Masashi Nagata, Hideki Nakayama, Takuya Tanaka, Ryoji Yoshida, Yoshihiro Nakagawa, Kenta Kawahara, Yoshihiro Yoshitake, Kazutoshi Ota, Akimitsu Hiraki, Masanori Shinohara

The possible role of cIAP2 in cross-resistance to cisplatin in 5-FU-resistant oral squamous cell carcinoma

第 71 回日本癌学会学術総会・2012 年 9 月 19 日・ロイトン札幌

[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

永田 将士 (NAGATA Masashi)

熊本大学・医学部附属病院 歯科口腔外科

非常勤診療医師

研究者番号: 10635791

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: