

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462625

研究課題名(和文) 頭頸部がん治療における正確かつ迅速な抗がん薬感受性診断法の確立

研究課題名(英文) Establish the rapid diagnosis system for chemosensitivity on head and neck cancer treatment

研究代表者

小川 徹也(Ogawa, Tetsuya)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：40334940

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：頭頸部抗がん薬感受性診断法の確立のため、頭頸部癌細胞株を用いた研究を行った。シスプラチン感受性株と獲得耐性株、自然耐性株と5FU耐性株を使用し、iTRAQ法を用いたタンパクレベルからの網羅的解析を行い、さらにmRNAレベルからの解析をマイクロアレイ法を用い、両者の共通因子を探る方法で行った。その結果、シスプラチン耐性化因子としてS100A2、多剤耐性化因子としてBASP1を同定した。S100A2にsiRNA法を用い解析し、S100A2がシスプラチン耐性化因子である可能性を見出した。抗がん薬投与前に臨床検体でS100A2を染色することが、シスプラチン感受性診断法となる可能性があることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Cisplatin and 5FU are still mainstream chemotherapy drugs for head and neck carcinoma. We focused of protein and mRNA levels to gain higher precision result for identifying the chemoresistant factors. We used human HNSCC cell lines, cisplatin-sensitive, acquired cisplatin resistance, naturally cisplatin-resistant, and acquired 5-fluorouracil resistance. We performed proteomics analysis using iTRAQ and LC-ESI-MS/MS. We also did transcriptomics analysis using microarray. After integrating data, S100A2 a cisplatin-specific factor and BASP1 as multi-chemoresistance factor were identified. Functional analysis revealed expression S100A2 was reduced and recovered the cisplatin sensitivity.

This is a new frontier technique that will provide highly precise identifications as thinking of comprehensive analysis. Our findings indicate that these proteins can be used as criteria biomarkers for chemoresistance for head and neck cancer treatment.

研究分野：頭頸部癌

キーワード：抗がん薬感受性 タンパク解析 マイクロアレイ解析 機能解析

## 1. 研究開始当初の背景

頭頸部抗がん薬療法の中心はシスプラチンである。しかしながらその感受性には個人差があり、未だ真の耐性化因子は特定されていない。臨床医である我々は、個々の症例に対する最善の治療法選択のため、ケモセクションとしての導入化学療法を用い、抗がん薬の感受性を見ながら臨床治療を行っている。(院内倫理委員会承認済み)。しかしながら、抗がん薬投与により抗がん薬の感受性を知るということは、抗がん薬の感受性が低い症例にとっては、不利益かつ不経済と言える。今後もし、抗がん薬投与前の抗がん薬感受性判断を行うことができれば、頭頸部抗がん薬治療戦略に有用であると考えられる。これまで我々は、共同研究者西村らにより頭頸部癌細胞株を用いた質量分析法による網羅的解析により、CDDP耐性化因子と考えられるタンパクを同定してきた。この方法は新しい技術であるiTRAQ®, TripleTOFシステムを用いたタンパクレベルでの網羅的解析を用いて行われた。この結果の中にはGSTやXRCCなど、過去に抗がん薬耐性に関与すると報告のあったタンパクも含まれていた。しかしながら真の抗がん薬耐性化因子を同定するためには、これまでの研究手法であるセントラルドグマの観点からの最終産物であるタンパク解析結果のみならず、より精度の高い真の耐性化規定因子を知るために、mRNAの発現の差異についてマイクロアレイによる解析を行い、蛋白発現、遺伝子発現の解析を互いに組み合わせることで、より精度の高い耐性化因子を同定するべきであるとの判断に至った。それらを組み合わせることで得られた因子は、より精度の高い抗がん薬感受性規定因子の可能性が高い。さらに機能解析を行うことで、将来的に簡便に臨床応用の可能な因子同定を試みたいと考えたのが、本研究開始当初の背景である。

## 2. 研究の目的

上記で述べたように、より精度の高い頭頸部癌抗がん薬耐性化因子を探るため、頭頸部扁平上皮癌細胞株を用いる実験系を立ち上げる。それらを用いてiTRAQ®, TripleTOFシステムを用いたタンパクレベルでの網羅的解析を用いて施行する。さらに、マイクロアレイを用いて mRNA レベルにおける薬剤感受性規定遺伝子の検索をする。シスプラチン、あるいは5FU耐性細胞株を用い、既存市販マイクロアレイチップ(Agilent Technologies)を用い、mRNAレベルの網羅的解析を行う。これまでのタンパクレベルから得られた結果と、このマイクロアレイチップすなわち mRNA レベルからの網羅的解析結果と擦り合わせることで、更に精度高い抗がん薬感受性因子を選択することが出来る。このようにして真の頭頸部癌抗がん薬耐性化因子を探ることが本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

### 細胞株

解析には4つの細胞株を使用した。シスプラチン感受性株、繰り返し抗がん薬暴露をし得られる獲得耐性株、もともとシスプラチンに対し耐性を持っていた自然耐性株、また多剤耐性因子の可能性を考え、ほか抗がん薬耐性株、今回は5-FU耐性株、これらの同時比較を行った。

### iTRAQ法

タンパクレベルの解析に使用したiTRAQ法は、サンプルを個別に前処理し、それぞれの細胞株を区別するタグ付けとなるiTRAQ試薬をそれぞれのサンプルに標識、あとはサンプルを混合させ、一検体としてLC-MSで計測する(Philip L, 2004)。iTRAQで標識後、LC-MSで計測されるマススペクトルは、単一ピークとして検出され、さらに開裂させることで得られたマスマスペクトルをみると実際に

それぞれのタンパクの発現の割合がわかる。次いでペプチドの配列情報、質量からタンパク同定も同時に行うことができる。共著者の西村は薬剤処理した細胞よりタンパクを抽出し、iTRAQ試薬でラベルし、TripleTOFシステムでCDDP耐性に関わるMS、MS/MSのデータ解析を行い、候補タンパクを解析した(Nishimura K, BJC, 2014)。この解析で検出されたタンパクのうち、親株に対しシスプラチン耐性株、5-FU耐性株が共通して有意に高発現しているものが、多剤耐性因子に関わるタンパクである可能性がある。またシスプラチン耐性株のみに有意に高発現しているものは、シスプラチン特異的耐性に関与しているタンパクである可能性がある。

iTRAQによるデータは4つのcell lineの同時比較でありタンパク同定、定量の質が保証されている試験である。しかし、DNA、RNA、タンパクのセントラルドグマの観点から実際に原因遺伝子、mRNA、発現タンパクの整合性がとれるものでなくてはならない。そこで、さらに掛け合わせの実験として、トランスクリプトームであるマイクロアレイを行った。

## マイクロアレイ

多剤耐性因子に関して、コントロールである感受性株UM-SCC-23と耐性株である23R、81B、FU-Wに共通して発現の差が2-、5-、10-倍認められるものを調べることにした。

## プロテオミクスとトランスクリプトミクスの融合

上記の結果を互いに組み合わせることで、精度高い因子を同定する。

## siRNAを使用した機能解析

同定されたタンパクに対し、siRNAを使用して機能解析を行う。まずそれぞれの細胞株に候補タンパクの発現を減弱させるsiRNAを導入する。実際に発現が減弱することをウエ

スタンプロットで確認する。次に各細胞株を抗がん薬単独投与下で培養したもの、加えて、候補タンパクに対するsiRNAを導入したもの、すなわちその発現を抑えて培養したノックダウン群、これらの統計学的有意差を見ることで実際に感受性が再獲得されたか確認する。

## 4. 研究成果

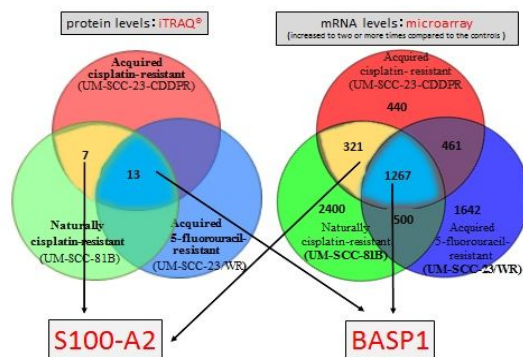
これまでの耐性化因子の同定方法は、我々の考えられうるシグナル関係に関連するタンパク解析、解毒酵素関連などを個別に調べることが多かった。しかしこれでは真の感受性規定因子を同定することは難しいかと思われる。

一方、実際の臨床検体を用いた検討では、抗がん薬の効果を客観的に示す方法が臨床結果のみなのでばらつきも多く、感受性群と耐性群の比較が難しいと考えられた。さらに個々の症例のタンパクの発現ばらつきもあり、詳細な検討は難しい。

そこで今回我々は、細胞株を用いた検討を行った。抗がん薬特にシスプラチン感受性の細胞株を選択し、これに繰り返し抗がん薬投与を行うことにより耐性株を作製した。しかしこの株は、いわゆる獲得耐性株であるので、真の耐性化因子を同定するには、獲得耐性のメカニズムのみを見る可能性もあり不向きである。よって、我々は自然耐性株についても選択し、使用することとした。さらに、シスプラチンのみならず5FUの耐性株を見出すことで、シスプラチンと5FU両者に関連する耐性化因子、この2つの多剤耐性化因子を同定するようにした。すなわち、感受性株、獲得耐性株、自然耐性株、5FU耐性株、4種を同時比較したわけである。

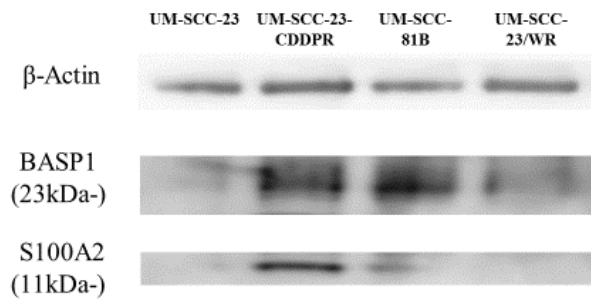
まず4つの異なる細胞株についてタンパクレベルからの網羅的解析を行うため、iTRAQ法とLC-ESI MS/MSを使用し、タンパクの網羅的解析を行った。その結果、候補因子はシス

プラチン特異的耐性化因子として7分子、多剤耐性因子として13分子同定された。しかしこの結果は、最終発現形であるタンパクの発現を確認するのみである。タンパクはセントラルドグマの観点からは最終産物であるため、精度の高い真の耐性化規定因子とは考えられる。しかしながら、数多くある候補タンパクから、真の因子を同定するためには、更なる情報を組み合わせ、候補を絞り込む必要があると考えた。よって今回、上記のタンパク解析と独立して、トランスクリプトーム解析を行うこととした。すなわち、mRNAレベルの解析としてマイクロアレイ解析を行い、さらにこの結果と、タンパク解析結果を組み合わせることで、真の耐性化因子を同定しようと試みたわけである。共通するタンパクと責任遺伝子で共通するものがあるならばそれは極めて精度の高い因子と考えられる。タンパク解析結果としての候補因子はシスプラチン特異的耐性化因子として7分子、多剤耐性因子として13分子まで絞られたが、マイクロアレイ解析の、5-10、10-倍のカットオフ値で得られた因子は、タンパク解析結果と共通するものはなかった。しかし、2-5倍のカットオフ値にした場合、最終的にシスプラチン特異的耐性化因子として1つ、多剤耐性因子として1つ共通するものを同定することが出来た。これがS100A2とBASP1である。

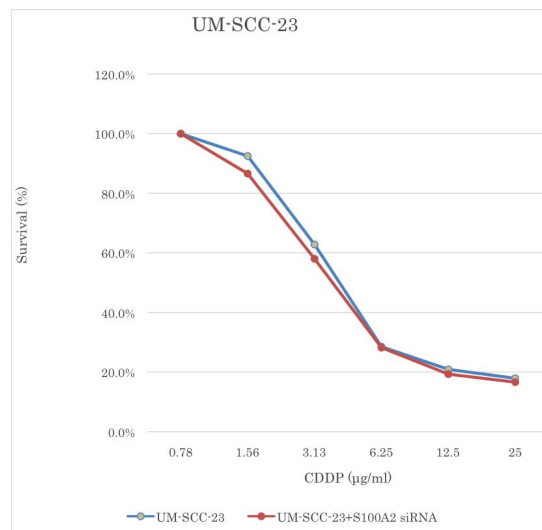


すなわちシスプラチン耐性化因子としてS100A2、多剤耐性化因子としてBASP1が同定できた。この結果は、これまでに報告のみられない、トランスクリプトームとプロテオーム

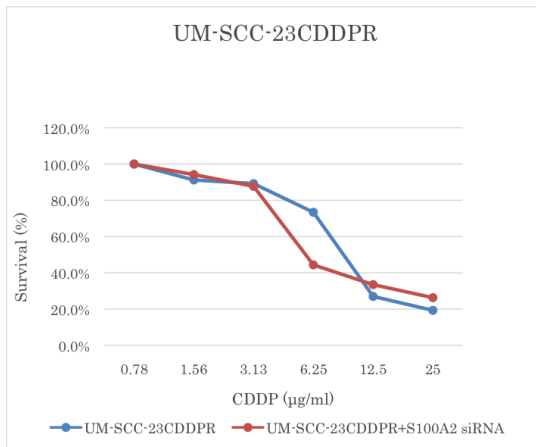
の両者から絞り出すことによって得られる、極めて精度高い因子と言える。さらに両者の実際の発現を、細胞株から抽出したタンパクで、ウエスタンブロッティングで見ると、S100A2は獲得耐性株と自然耐性株のみに発現し、BASP1はシスプラチン感受性株以外のすべてで発現していた。



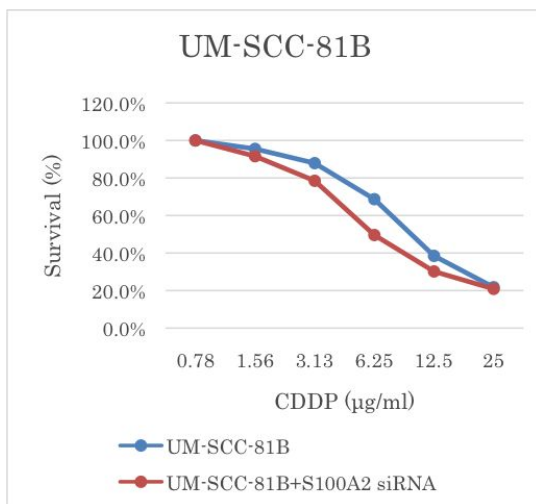
さらに頭頸部がんにおけるキードラッグであるためである、シスプラチンに焦点を当て、機能解析を行った。まずシスプラチン感受性株に関して、シスプラチン単独投与群、S100A2の発現を抑えたノックダウン群と比較したが優位な変化は認めなかった。



次にシスプラチン獲得耐性株に対し、siRNA法を用いて、S100A2の発現を抑えることシスプラチン単独投与群に対し、ノックダウン群では感受性が改善した。



また、シスプラチン自然耐性株に対しても同様の結果であった。



以上よりS100A2はシスプラチン耐性の特異的な規定因子であると確認できた。

S100A2の抗がん薬耐性の機序についてはS100A2の高発現は咽頭扁平上皮癌の局所制御率を上げる(Almadori et al, 2009)、S100A2がp53の変異の抑制に関わる(NE Buckley et al, 2014)、腫瘍細胞内ではS100A2の濃度分布が変化(Kumar et al, 2015)などの報告があるが、シスプラチンをはじめ抗がん剤耐性に関する報告はない。S100A2遺伝子が潜在的に癌抑制作用を示すという報告が散見されるが、癌増殖に関わるという報告もあり、まだ一定の見解を得られていない。S100A2の高発現がシスプラチン耐性を起こすという事実から耐性化に関わる複雑な機序が予想される。シスプラチンによる腫瘍細胞の死滅に

関してはp53を介したアポトーシスが中心であると考えられている。p53はDNA修復や細胞増殖停止、アポトーシスなどの細胞増殖サイクルの抑制を制御する機能をもつとされ、細胞が癌化したときアポトーシスを起させる。S100A2によるシスプラチンに対する感受性の改善については、シスプラチンの作用機序から、シスプラチンのDNAとの結合の障害、あるいは、結合により作られたDNA損傷の修復阻害が予想され、p53の機能との関わりも含めてさらなる解析が必要となると考えている。

S100A2は特に抗癌薬耐性を治療前に判断するバイオマーカー、さらには頭頸部扁平上皮癌の治療法選択因子となり得る。例えばシスプラチン特異的耐性因子であるS100A2が高発現している場合、シスプラチンによる抗腫瘍効果は期待できず、初期の患者の場合はシスプラチンによる導入化学療法よりも、手術・放射線根治治療を優先すること検討できることとなりうる。また、根治治療不能な再発症例に対しては、標準治療である5-FU、C-mab、シスプラチン3剤併用療法の効果が期待できないためPTX、C-mabの2剤併用療法などの選択、あるいはNivolumabなどの免疫チェックポイント阻害剤の選択を検討する。今後S100A2のさらなる機能解析、免疫染色での発現の確認などさらに研究を進めていく予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1 Ijichi K; Adachi M; Ogawa T; Hasegawa Y; Murakami S. Cell-cycle distribution and Thymidilate Synthetase (TS) expression correlate with 5-FU resistance in head and neck carcinoma cells. Anticancer Res 34:6:2907-11 2014

2 小川徹也; 永原國彦; 西村邦宏; 土屋吉正; 岡

本啓希;犬飼大輔;植田広海 . [大きく変わりつつある頭頸部癌化学療法] 導入化学療法と chemoselection JOHNS 30:8:963-6 2014

3 小川徹也;西村邦宏;岡本啓希;犬飼大輔;山中俊平;安井愛純;小川高生;植田広海 . [頭頸部悪性腫瘍の疑問に答える]治療選択 根治切除不能例に対して、導入化学療法後に手術を行う場合の注意点を教えてください JOHNS 33;9:1198-200 2017

4 小川徹也 . 頭頸部癌の抗がん薬感受性 導入化学療法、基礎的研究との関係 耳鼻咽喉科臨床 108:8:656-7 2015

など

[学会発表](計 9 件)

1 小川徹也 . 頭頸部腫瘍疾患に関する最新の医学的知見を現場の医師に広く普及 . 郡山耳鼻科勉強会 2014.9.18 郡山

2 小川徹也 . 頭頸部がんの多彩な個性を探る : 実地臨床から基礎研究への回帰 (導入化学療法、ゲノム、トランスクリプトーム、プロテオーム解析を用いて). 琉球医学会特別講演会 2014.1.14 沖縄

3 Inukai D;Nishimura K;Okamoto T;Tsuchiya Y;Ijichi K;Ueda H;Ogawa T. Identification of chemoresistance factors for head and neck carcinoma by analysis with iTRAQR and Microarray. 13<sup>th</sup> Japan-Taiwan Conference on Otolaryngology-Head and Neck Surgery December 3, 2015 Tokyo

4 Inukai D;Ogawa T;Nishimura K;Tsuchiya Y;Okamoto H;Ueda H;Carol R

Bradford;Thomas E Carey. Indentification of chemoresistance factors for head nad neck carcinoma by analysis with iTRAQ® and Microarray. 21th IFOS World Congress 2017.6.24 Paris

5 Ogawa T. H&N-Symposium2 Identification of chemoresistance factors for head and neck carcinoma by analysis with iTRAQ® and microarray. 17<sup>th</sup> KOREA-JAPAN Joint Meeting of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery Abstract Book 2018.4.6 Korea

など

6 . 研究組織

(1)研究代表者

小川 徹也 (OGAWA, Tetsuya)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号 : 40334940

(2)研究分担者

吉川 和宏 (YOSHIKAWA, Kazuhiro)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号 : 60109759