

平成22年5月31日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19592300

研究課題名（和文）：口腔癌のDNA損傷応答システムの解析に基づく新規治療法の開発

研究課題名（英文）：Development of novel treatment for oral cancer due to analysis of DNA repair system

研究代表者：尾崎 登喜雄（OSAKI TOKIO）

高知大学・名誉教授

研究者番号：70031995

研究成果の概要（和文）：Hsp90阻害剤である17-AAGは、Rad51が関与する相同組み換えによるDNA損傷応答システムを阻害することにより口腔扁平上皮癌細胞の $\gamma$ 線に対する感受性を増強することが明らかとなり、今後、17-AAGと放射線療法との併用は口腔扁平上皮癌に対する有効な治療法となりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：An inhibitor of heat shock protein 90, 17-AAG, inhibits homologous recombination mechanism to repair DNA damage in oral squamous cell carcinoma cells via the inhibition of Rad51 expression. The combination of 17-AAG with ionizing irradiation seems to be a useful strategy for oral cancer treatment.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：口腔扁平上皮癌, DNA損傷, 放射線, Rad51, 17-AAG, アポトーシス

## 1. 研究開始当初の背景

近年、口腔癌に対する治療戦略は大きな変革を遂げ、外科的切除を常に第一選択とするのではなく、抗癌剤や放射線によるネオアジュバント療法の導入や超選択的動注化学療法と放射線療法などを組み合わせることにより根治的治療を目指すなど、患者のQuality of lifeを重視したものとなってき

た。しかしながら、縮小術が適応となる、あるいは、手術を回避できる症例は限られており、化学・放射線療法の治療効果の向上に向けての検討がまだまだ必要である。これらの治療効果を高めるためには、抗癌剤や放射線の癌細胞に対する作用、つまり、抗癌剤や放射線による癌細胞のDNA障害・アポトーシス誘導についてのより詳細な解析が求められ、

その結果をもとにした新しい治療戦略を構築する必要がある。

抗癌剤や放射線は癌細胞に活性酸素 (ROS) 産生を誘導し、産生された ROS はその強力な酸化作用により蛋白や脂質のみならず核酸に対しても傷害を与え、塩基のメチル化、酸化、加水分解、ヌクレオチドの挿入あるいは欠失、二本鎖の切断などを引き起こし、癌細胞を死に至らしめる。しかし、癌細胞の DNA 修復機能が強ければ、抗癌剤や放射線の作用が十分に発揮されず、効果も不十分となると想定される。したがって、抗癌剤や放射線の効果をさらに増強させるためには、癌細胞の DNA 修復機構を抑制することが重要と考えられる。

## 2. 研究の目的

口腔扁平上皮癌 (OSC) 細胞の抗癌剤および放射線に対する感受性と DNA の損傷応答に関わる分子の発現レベルとの関係を検討し、OSC 細胞の抗癌剤および放射線に対する感受性と強く相関する DNA 損傷応答システムの分子を明らかにする。さらに、その候補分子発現のシグナル伝達を解析し、そのシグナル伝達を効果的に抑制する手段を検討することにより、DNA 損傷応答システムを破壊させる方法を明らかにすることとした。

## 3. 研究の方法

$\gamma$  線感受性の OSC 細胞株 (OSC-2 および OSC-3 細胞) および  $\gamma$  線抵抗性の OSC 細胞株 (OSC-4 および OSC-5 細胞) を、17-AAG (10  $\mu$ g/mL) で 1 時間前処理した後、 $\gamma$  線照射 (30Gy) を行い、 $\gamma$  線に対する感受性に及ぼす 17-AAG の影響を Flow cytometry 法および Comet assay にて検討した。これとともに、17-AAG 前処理後に  $\gamma$  線照射を行った各 OSC 細胞株における Rad51 の発現、STAT5、cAbl および BRCA2 のリン酸化レベル、さらには、Rad51 と BRCA1/2 あるいは p53 との会合を、ウエスタンブロット法および免疫沈降法にて検討した。

## 4. 研究成果

OSC-2 および OSC-5 細胞を  $\gamma$  線で処理すると前者では 50.9% の細胞が、後者では 11.4% の細胞がアポトーシスに陥った (Fig. 1)。両細胞を  $\gamma$  線で処理する前に 17-AAG で前処理しておく、OSC-2 細胞では 67.3% の細胞が、OSC-5 細胞では 27.7% の細胞がアポトーシスに陥り、17-AAG は放射線感受性および抵抗性いずれの OSC 細胞においても  $\gamma$  線に対する感受性を増強した。

両 OSC 細胞を  $\gamma$  線で処理するといずれの細胞においても DNA 二重鎖切断が認められたが、OSC-2 細胞のコメットテールは OSC-5 細胞のものに比べ長く、より強く DNA 二重鎖切断が

生じていた (Fig. 2)。OSC-2 細胞を 17-AAG で前処理すると DNA 二重鎖切断が有意に増強したが、OSC-5 細胞を 17-AAG で前処理しても DNA 二重鎖切断の増強はわずかであった。

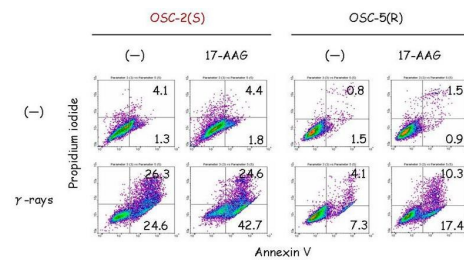


Fig. 1. Enhancement of apoptosis by 17-AAG in  $\gamma$ -irradiated OSC cell lines.

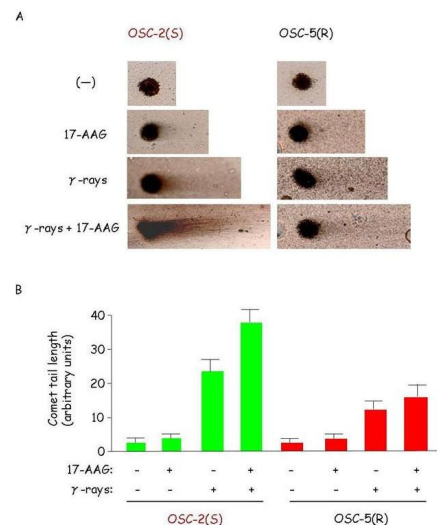


Fig. 2. Enhancement of  $\gamma$ -irradiation-induced DNA double strand breaks in OSC cells by 17-AAG.

Rad51 は  $\gamma$  線感受性の OSC-2 および OSC-3 細胞では弱く、 $\gamma$  線抵抗性の OSC-4 および OSC-5 細胞では強く発現されていたが、いずれの細胞においても  $\gamma$  線照射によりその発現に有意な変化は認められなかった (Fig. 3)。STAT-5、cAbl および BRCA2 はいずれの細胞においても  $\gamma$  線照射によりリン酸化が認められたが、 $\gamma$  線抵抗性の OSC-4 および OSC-5 細胞ではより強くリン酸化が生じていた。OSC 細胞を 17-AAG で前処理すると、 $\gamma$  線照射による STAT-5、cAbl および BRCA2 のリン酸化はいずれの細胞においても抑制された。

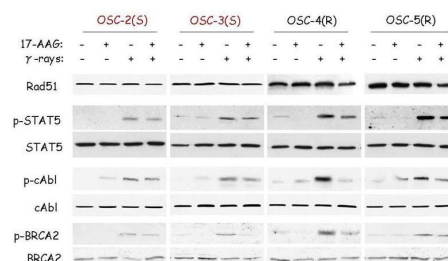


Fig. 3. Influence of 17-AAG on expression of Rad51 and phosphorylation of cAbl, STAT5 and BRCA2 in  $\gamma$ -irradiated OSC cells.

OSC 細胞を  $\gamma$  線で処理することによりいずれの細胞においても Rad51 と BRCA1/2 あるいは p53 との会合が認められたが、 $\gamma$  線抵抗性の OSC-4 および OSC-5 細胞では  $\gamma$  線感受性の OSC-2 および OSC-3 細胞よりもより強く認められ、17-AAG で前処理しておくことそれらの会合は抑制された (Fig. 4).

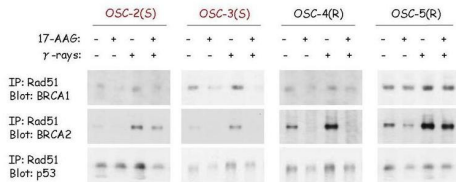


Fig. 4. Influence of 17-AAG on interaction between Rad51 and BRCA1/BRCA2/p53 in  $\gamma$ -irradiated OSC cells.

以上より、17-AAG は  $\gamma$  線感受性のみならず  $\gamma$  線抵抗性の株化口腔扁平上皮癌細胞の  $\gamma$  線に対する感受性を増強することが明らかとなり、その機序として①「cAbl のリン酸化  $\rightarrow$  STAT5 のリン酸化  $\rightarrow$  Rad51 の発現誘導」の抑制、②Rad51 の核への移行に重要な「Rad51 と p53 あるいは BRCA1/2 との会合」の抑制による相同組み換えによる DNA 損傷応答システムの障害が示唆された。これらのことより、口腔扁平上皮癌において 17-AAG と放射線療法との併用は治療効果の増強をもたらすものと考えられる。

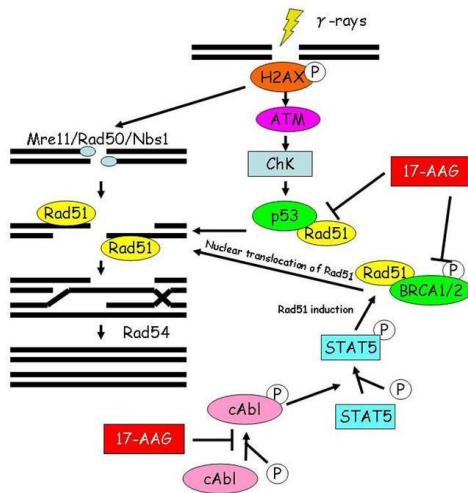


Fig. 5. Mechanism of inhibition of homologous recombination repair system in OSC cells by 17-AAG.

## 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 6 件)

1. Yoshihisa Tateishi, Yukihiro Tatemoto, Seiji Ohno, Keiko Morishita, Eisaku Ueta, Tetsuya Yamamoto: Combined

evaluation of dihydropyrimidine dehydrogenase and thymidine phosphorylate mRNA levels in tumor predicts the histopathological effect of 5-fluorouracil-based chemoradiotherapy. *Cancer Letters* 274:187-193, 2009.

2. Tateishi Y, Sasabe E, Ueta E, Yamamoto T: Ionizing irradiation induces apoptotic damage of salivary gland acinar cells via NADPH oxidase 1-dependent superoxide generation. *Biochem Biophys Res Commun* 366:301-307, 2008.

3. Ueta E, Sasabe E, Yang Z, Osaki T, Yamamoto T: Enhancement of apoptotic damage of squamous cell carcinoma cells by inhibition of the mitochondrial DNA repairing system. *Cancer Sci* 99:2230-2237, 2008.

4. Yumei Wang, Xinzhi Huang, Hui Cang, Fei Gao, Tetsuya Yamamoto, Tokio Osaki, Jing Yi: The endogenous reactive oxygen species promote NF- $\kappa$ B activation by targeting on activation of NF- $\kappa$ B-inducing kinase in oral squamous carcinoma cells. *Free Radical Research* 41(9): 963-971, 2007.

5. Yamamoto T, Digumarthi H, Aranbayeva Z, Wataha J, Lewis J, Messer R, Qin H, Dickinson D, Osaki T, Schuster GS, Hsu S: EGCG-targeted p57/KIP2 reduces tumorigenicity of oral carcinoma cells: Role of c-Jun N-terminal kinase. *Toxicol Appl Pharmacol* 224(3): 318-325, 2007.

6. Sasabe E, Zhou X, Li D, Oku N, Yamamoto T, Osaki T: The involvement of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in the susceptibility to  $\gamma$ -rays and chemotherapeutic drugs of oral squamous cell carcinoma cells. *Int J Cancer* 120(2): 268-77, 2007.

[学会発表] (計 4 件)

1. 植田栄作, 笹部衣里, 立石善久, 山本哲也: 口腔扁平上皮癌細胞における相同組み換えによる DNA 損傷応答システムに及ぼす Hsp90 阻害剤 17-AAG の影響について. 第 27 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会 (2009 年 1 月, 宇都宮)
2. 植田栄作, 立石善久, 佐竹秀太, 本田博之, 山本哲也: 口腔扁平上皮癌細胞における DNA 損傷応答システムを標的とした治療法に関する基礎的検討. 第 62 回日本口腔科学会学術集会 (2008 年 4 月, 福岡)

3. 植田栄作, 鎌谷宇明, 笹部衣里, 山本哲也: P1-3K/Akt シグナル抑制による口腔扁平上皮癌細胞の $\gamma$ 線に対する感受性増強機序の解析. 第61回NPO 法人日本口腔科学会学術集会 (2007年4月, 神戸市)
4. 立石善久, 鎌谷宇明, 笹部衣里, 山本哲也: 口腔扁平上皮癌の化学放射線免疫療法に対する感受性におけるMFG-E8(Lactadherin)の関わり. 第61回NPO 法人日本口腔科学会学術集会 (2007年4月, 神戸市)

[図書] (計1件)

尾崎登喜雄編集・監修, 株式会社飛鳥出版室, 口腔内科学, 2008年, 462頁

[その他]

ホームページ:

[http://www.kochi-ms.ac.jp/~fm\\_dntst/index.htm](http://www.kochi-ms.ac.jp/~fm_dntst/index.htm)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

尾崎 登喜雄 (OSAKI TOKIO)

高知大学・名誉教授

研究者番号: 70031995

### (2) 研究分担者

山本 哲也 (YAMAMOTO TETSUYA)

高知大学・教育研究部医療学系・教授

研究者番号: 00200824

植田 栄作 (UETA EISAKU)

高知大学・教育研究部医療学系・講師

研究者番号: 10203431

鎌谷 宇明 (KAMATANI TAKAAKI)

高知大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 00315003

笹部 衣里 (SASABE ERI)

高知大学・教育研究部医療学系・助教

研究者番号: 40363288

佐竹 秀太 (SATAKE HIDETAKA)

高知大学・教育研究部医療学系・助教

研究者番号: 10304685

立石 善久 (TATEISHI YOSHIHISA)

高知大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 20372732