

機関番号：11101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791586

研究課題名（和文） TS 遺伝子抑制による頭頸部腺様嚢胞癌の抗癌剤感受性の獲得

研究課題名（英文） Effect of inhibition targeting TS gene for chemotherapy sensitivity in head and neck adenoid cystic carcinoma

研究代表者

白崎 隆 (SHIRASAKI TAKASHI)

弘前大学・大学院医学研究科・客員研究員

研究者番号：20419980

研究成果の概要（和文）：頭頸部腺様嚢胞癌は5-FUに抵抗性である。5-FUの標的であるチミジル酸合成酵素（thymidylate synthase, 以下TS）発現遺伝子を抑制することによって5-FUへの感受性が高まるか、また、TS抑制の効果は、*in vivo*でも*in vitro*同様に得られるのかを検討した。5-FUへの感受性の変化は認められなかったが、TS抑制の抗腫瘍効果は、*in vivo*でも*in vitro*同様に得られた。

研究成果の概要（英文）：Adenoid cystic carcinoma (ACC) is resistant to 5-FU treatment. We investigated whether reductive expression of the TS gene improves chemo-sensitivity for 5-FU, it as well as the *in vivo* effect of TS inhibition. Results showed that TS gene inhibition did not improve chemo-sensitivity while it was effective in *in vivo* experiments.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,400,000	720,000	3,120,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：TS遺伝子、頭頸部癌、抗癌剤

1. 研究開始当初の背景

チミジル酸合成酵素（thymidylate synthase, 以下TS）は、DNA合成においてチミジンの生合成を触媒する重要な酵素である。5-FUは頭頸部癌の診療において頻用されている抗悪性腫瘍剤であり、TSを阻害することによってDNA合成を阻害し、抗腫瘍効果を発揮する。これまで、胃癌や大腸癌でTSの発現の意義が数多く報告されており、頭頸部

領域でも扁平上皮癌における意義は報告されている。これまでの多くの報告では、TSの発現が高ければ5-FUへ抵抗性で予後不良、逆にTSの発現が低ければ5-FUへの感受性が高く予後良好であるというものである。

扁平上皮癌は抗癌化学療法によく反応するため、放射線治療と併用することによって治癒を期待でき、外科的治療を回避することができる。頭頸部において外科的治療を行う

ことは美容上の問題や、嚥下障害や発声障害などの大きな機能障害を生み出すため、外科的治療を回避する意義は他臓器の癌に比べ極めて大きい。

一方、頭頸部腺様嚢胞癌は抗癌化学療法に抵抗性であるため、外科的治療が標準的な治療法である。頭頸部の腺様嚢胞癌を対象に TS の発現を解析することによって、抗悪性腫瘍剤への抵抗性の獲得のメカニズムを解明し、頭頸部腺様嚢胞癌の診療に寄与することを目指している。

2. 研究の目的

予備的な実験として、頭頸部腺様嚢胞癌由来細胞株 ACC3 において、TS 遺伝子の siRNA 導入による TSmRNA の knock down に成功している。(図 1) また、TS の knock down によって cell viability が有意に抑制されること(図 2)、アポトーシス関連分子である p53、p21、caspase-3 の発現が亢進していることをウェスタンブロット法で確認した。(図 2) また、フローサイトメトリーによって細胞周期を解析すると、TS の knock down によって S 期停止が起こることを確認した。(図 3)

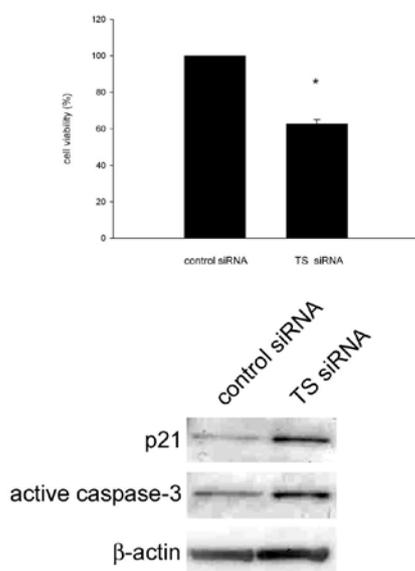


図 1

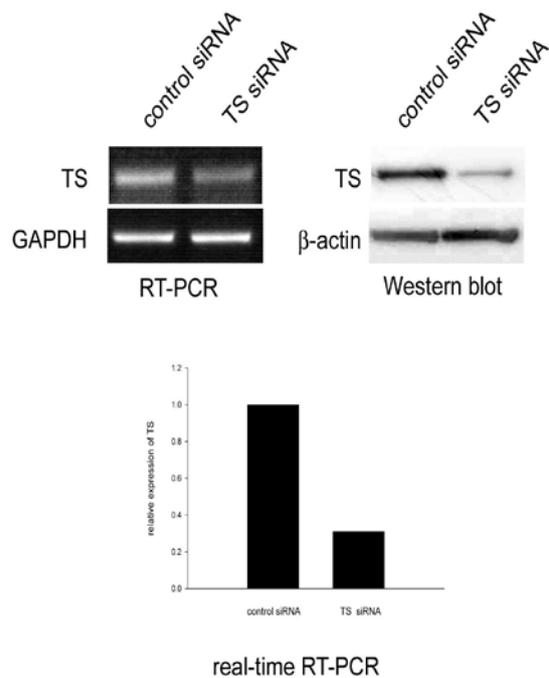


図 2

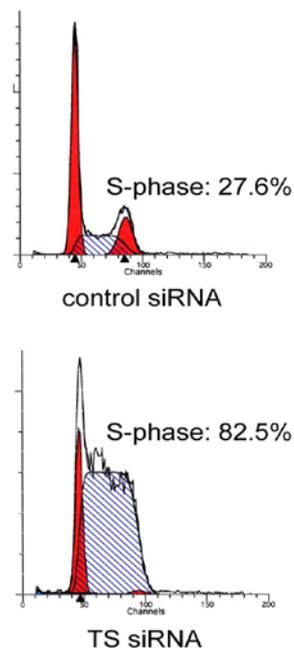


図 3

本研究においては、

(1) なぜアポトーシスが誘導されているのに subG1 期ではなく S 期での停止なのか。

(2) *in vivo* で検討し、*in vitro* 同様に TS knock down による抗腫瘍効果が得られるのか。

(3) siRNA による knock down の効果は TS のみに特異的なのか。

(4) TS を knock down した状態に 5-FU を作用させた場合に、抗腫瘍効果の上乗せが可能か。以上を明らかにしたい。

本研究によって、TS を knock down した状態に 5-FU を作用させた場合、抗腫瘍効果の上乗せが可能であるという結果が得られれば、腺様嚢胞癌であっても TS を knock down することによって 5-FU に感受性を獲得し、外科的治療を回避し、化学療法で治癒しうる可能性が出てくるといえる。

3. 研究の方法

(1) 頭頸部腺様嚢胞癌由来細胞株に対して siRNA を用いて TS 遺伝子の発現を knock down させ、その RNA サンプルを用いて cDNA マイクロアレイを行い、TS knock down の効果は本当に TS のみに特異的なのかを明らかにする。また、細胞周期調節因子やアポトーシス関連因子の遺伝子発現の変化もこれによって明らかになり、なぜアポトーシスが誘導されているのに subG1 期ではなく S 期での停止なのかを明らかにする手がかりとなる。

(2) ノードマウスにヒト頭頸部腺様嚢胞癌由来細胞株を皮下注射し、xenograft model を作成し、アテロコラーゲンと混合した siRNA を作成した腫瘍に局注する。腫瘍体積を経時的に計測し、コントロールと比較することで、*in vivo* で、その抗腫瘍効果を検討する。さらに、腫瘍をマウスから切除し、TUNEL 法によってアポトーシスを解析する。

(3) 以上と同様の研究を、5-FU をさらに作用させた上で行う。すなわち頭頸部腺様嚢胞癌由来細胞株において、TS 遺伝子の siRNA 導入による TSmRNA の knock down を行い、その上で 5-FU を作用させる。抗腫瘍効果を

siRNA 単独群、5-FU 単独群、siRNA+5-FU 群と比較し、腺様嚢胞癌であっても TS を knock down させることによって 5-FU に感受性を獲得することを明らかにしたい。

4. 研究成果

頭頸部腺様嚢胞癌由来細胞株に対して siRNA を用いて TS 遺伝子の発現を knock down させ、その RNA サンプルを用いて cDNA マイクロアレイを行った。siRNA 導入によって TS 遺伝子をもっとも抑制されていた。細胞周期調節因子やアポトーシス関連因子の遺伝子発現の変化も認められたが、なぜアポトーシスが誘導されているのに subG1 期ではなく S 期での停止なのかを明らかにするまでには至らなかった。

また、ノードマウスに頭頸部腺様嚢胞癌由来細胞株を生着させた上で、TS を標的とする siRNA を腫瘍に局注したところ、TS を抑制した群では、腫瘍体積の増加が抑制されており、有意に腫瘍の増殖を抑制することが *in vivo* でも示された。また、TUNEL 法による解析では、TS を抑制した群では、有意にアポトーシスが誘導されていることが判明した。

頭頸部腺様嚢胞癌由来細胞株において、TS 遺伝子の siRNA 導入による TSmRNA の knock down を行い、その上で 5-FU を作用させた。cell viability を siRNA 単独群、5-FU 単独群、siRNA+5-FU 群で比較したが、siRNA 単独群、5-FU 単独群と、siRNA+5-FU 群では有意差が認められなかった。

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 1 件)

- ① Takashi Shirasaki, Shin-ichiro Maruya, Hiroki Mizukami, Seiji Kakehata, Hidekachi Kurotaki, Soroku Yagihashi and Hideichi Shinkawa, Effects of small interfering RNA targeting thymidylate synthase on survival of ACC3 cells from

salivary adenoid cystic carcinoma、BMC
Cancer、査読あり、2008年、8：348.

〔学会発表〕（計1件）

- ① 白崎 隆、siRNAを用いたTS knock down の
唾液腺腺様嚢胞癌細胞への影響、第110
回日本耳鼻咽喉科学会総会、2009年5月
15日、東京

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白崎 隆 (SHIRASAKI TAKASHI)

弘前大学・大学院医学研究科・客員研究員

研究者番号：20419980