

機関番号：11301
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21791588
 研究課題名（和文） マイクロアレイを用いたシスプラチン耐性に関わるマイクロRNA
 発現異常解析
 研究課題名（英文） Identification of responsible miRNAs associated with an acquired
 resistance for cis-diamminedichloroplatinum by microarray
 analyses in human head and neck squamous cell carcinoma
 研究代表者 小川 武則（TAKENORI OGAWA）
 東北大学・病院・助教
 研究者番号：50375060

研究成果の概要（和文）：

本研究はシスプラチン耐性化機序の解明を目的とし、以下の研究成果であった。

- （1）頭頸部扁平上皮癌細胞株において、52 個のシスプラチン感受性予測遺伝子を同定した。
- （2）IGF2 (insulin like growth factor2) がシスプラチン獲得耐性に関与していることを発見した。
- （3）マイクロ RNA アレイ解析を行い、シスプラチン耐性関与マイクロ RNA を 93 個同定し、その内、miR34a が頭頸部癌におけるシスプラチン化学療法の予後因子となりうることを発見した。

研究成果の概要（英文）：

The identification of the resistance-related microRNA clusters was conducted between RPMI2650CR and RPMI2650 using microRNA microarray. Furthermore, clinical study showed that miR34a could be a strong prognostic biomarker of CDDP treated sinonasal squamous cell carcinomas.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,900,000 円	570,000 円	2,470,000 円
2010 年度	1,300,000 円	390,000 円	1,690,000 円
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000 円	960,000 円	4,160,000 円

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：癌、マイクロアレイ、薬剤反応性

1. 研究開始当初の背景

頭頸部癌治療は生命予後の改善と共に、咀嚼嚥下機能、発声機能、視聴覚、嗅覚、味覚などの感覚機能、顔貌容姿等の機能温存が非常に重要であり、機能温存治療としての非呪術治療が重要な地位を占める。頭頸部癌化学療法においてシスプラチンは世界標準といえる中心的薬剤であるが、その効果は個々の症例で異なっており、オーダーメイド医療の実現が切望されている。

現在までシスプラチン耐性因子として遺伝子発現を網羅的に検討した研究は少ない。申請者は、cDNA マイクロアレイを用いて耐性機構を研究しているが、近年、蛋白翻訳量の調節機構としてマイクロ RNA の存在が明らかとなり、癌細胞の薬剤応答性にも重要な働きを持っていると予測される。

2. 研究の目的

本研究はシスプラチン耐性化機序の解明の為、マイクロ RNA アレイにて網羅的なマイクロ RNA の検討、発現制御による将来の頭頸部癌征圧を目標とした研究を行う。具体的目標としては、頭頸部癌細胞株、また申請者が人為的に作成したシスプラチン耐性変異株において、マイクロ RNA アレイを施行し、CDDP 耐性獲得機序として、網羅的 mRNA 発現のほかにマイクロ RNA の関与も含めた総合的な検討を行い、さらには RNA 発現の制御を行ったうえでの CDDP 耐性解除の研究を行い、シスプラチン耐性解除による頭頸部癌征圧を目指すことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) Microarray (Whole Human Genome オリゴ DNA マイクロアレイ キット, Human miRNA マイクロアレイ キット)

頭頸部扁平上皮癌の CDDP 耐性変異株と各々の親株につき、マイクロアレイにて遺伝子発現、マイクロ RNA 発現の測定を行う。また、結果により得られた CDDP 耐性遺伝子につき、以下の実験を行う。

(2) Real time PCR

(3) Immunoblotting

特異的抗ヒト抗体で ECL Detection Reagent と LAS 1000 Plus with a Science Lab 99 Image Gauge にて可視化する。

(4) 耐性関与遺伝子導入による CDDP 耐性化実験

発現ベクターを lipofection 法にて遺伝子導入、MTT assay にて CDDP IC50 の算出を行う。

(5) RNAi を用いた CDDP 獲得耐性解除化の検討

候補遺伝子における RNAi は、siRNA を購入し、Oligofectamine (Invitrogen) にて細胞内に導入する。

(6) 耐性関与 miRNA 導入による CDDP 耐性化実験

miRNA precursor, inhibitor を導入後、MTT assay にて CDDP IC50 の算出を行う。

(7) 尚、CDDP による薬剤応答性は MTT assay による CDDP IC50 の算出と Flow cytometry にて行う。

(8) 臨床検体(生検、手術検体)からの RNA 抽出と Real time PCR

4. 研究成果

本研究はシスプラチン耐性化機序の解明の為、頭頸部扁平上皮癌シスプラチン耐性変異株の作成の上、以下の如くの研究の成果であった。

(1) 頭頸部扁平上皮癌 10 種類についてのシスプラチン応答性の解析と cDNA マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析を行

い、52 個のシスプラチン感受性予測遺伝子を同定した。

(2) シスプラチン獲得耐性変異株を作成し、これらの網羅的遺伝子発現解析を行い、IGF2 (insulin like growth factor2) がシスプラチン獲得耐性に関与していることを初めて報告した。

(3) マイクロ RNA アレイ解析を行い、2 倍以上の発現比をもって変化しているマイクロ RNA を 93 個同定し、その内、特徴的な発現変化を認めた、miR34a、miR124 を解析した。まず、定量 PCR 法にて、マイクロアレイデータを検証し、差がないことを確認した。次に、マイクロ RNA 導入を行い、シスプラチン応答性の変化を確認した。さらに、臨床検体を用い、miR34a の発現変化とシスプラチン化学療法の効果、予後を検討した。これらの研究結果より、miR34a は頭頸部癌におけるシスプラチン化学療法の予後因子となりうることを発見した。

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 8 件)

1. Ogawa T, Matsuura K, Shiga K, Tateda M, Katagiri K, Kato K, Saijo S, Kobayashi T. Surgical treatment is recommended for advanced oral squamous cell carcinoma. *Tohoku J Exp Med*. 査読有、223-1 巻、2011 年、17-25

2. Ogawa T, Furukawa T, Shiga K, Hashimoto S, Ogawa K, Kobayashi T, Horii A. A cDNA microarray analysis identifies 52 genes associated with CDDP susceptibility in head and neck squamous

cell carcinoma cell lines. *EAORL*. 査読有 267-1 巻、2010 年、123-129

3. Ogawa T, Matsuura K, Kato K, Sariishi T, Goto T, Matsumoto K, Saijo S. Survival of a free jejunal graft after the resection of its nutrient vessels. *ANL*. 査読有、37-1 巻、2010 年、125-128

4. Ogawa T, Ogawa K, Shiga K, Furukawa T, Nagase H, Hashimoto S, Kobayashi T, Horii A. Upregulation of IGF2 (insulin-like growth factor 2) is associated with an acquired resistance for cis-diamminedichloroplatinum in human head and neck squamous cell carcinoma. *EAORL*. 査読有 267-10 巻、2010 年、1599-1606

5. 小川武則, 志賀清人, 鈴木貴博, 加藤健吾, 小林俊光 中咽頭癌 133 例の臨床統計 耳鼻咽喉科展望 査読無、53 巻、2010 年、16-17

6. 小川武則, 志賀清人, 浅田行紀, 加藤健吾, 松浦一登, 西條茂, 小林俊光 早期中咽頭癌(T1、T2)の治療 中咽頭癌に対する化学放射線治療 耳鼻と臨床、査読無、56 巻、2010 年、12-20

7. 佐藤宏樹, 小川武則, 志賀清人, 大島猛史, 小林俊光 耳前部より総頸動脈分岐間を通り、下咽頭に穿通した杵創の 1 例 頭頸部外科、査読有、20-2 巻、2010 年、135-139

8. 松浦一登, 野口哲也, 片桐克則, 今井隆之, 石田英一, 角田梨紗子, 浅田行紀, 小川武則, 加藤健吾, 西條茂 ダブル・スコープ法による内視鏡的咽頭手術 (ELPS) につ

いて頭頸部癌、査読有、36-4 巻、2010 年、
466-472

〔学会発表〕（計 5 件）

国際学会

1. Takenori Ogawa, Kiyoto Shiga, Sho Hashimoto, Toshimitsu Kobayashi, Akira Horii
Identification of responsible genes associated with an acquired resistance for cis-diamminedichloroplatinum by microarray analyses of mRNA and miRNA in human head and neck squamous cell carcinoma. IFHNOS2010. 2010.6.16. Seoul

2. 小川武則

中咽頭癌に対する化学放射線治療、第 15 回頭頸部癌化学療法研究会、2010 年 3 月 6 日、福岡

3. 小川武則

中咽頭癌 133 例の臨床統計、第 15 回北日本癌治療研究会、2009 年 10 月 24 日、仙台

4. 野口直哉、小川武則

放射線性頸動脈狭窄を有する下咽頭癌の遊離空腸再建例、第 138 回宮城県地方部会、2009 年 9 月 5 日、仙台

5. 小川武則、志賀清人他

頭蓋底浸潤した鼻副鼻腔癌に対する TPF 同時併用化学放射線治療の治療効果、第 21 回頭蓋底外科学会、2009 年 7 月 3 日、福岡

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.orl.med.tohoku.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小川 武則 (OGAWA TAKENORI)

東北大学・病院・助教

研究者番号：50375060

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：