様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成　21 年　4 月 14 日現在

研究種目：若手研究（B）
研究期間：2007-2008
課題番号：19791222
研究課題名（和文）　頭頸部癌における補助化学療法のオーダーメイド化に関する検討

研究課題名（英文）　Customizing Adjuvant Chemotherapy in Head and Neck Cancer

研究代表者
花井　信広（HANAI NOBUHIRO）
愛知県がんセンター（研究所）発がん制御研究部・研究員
研究者番号：80381797

研究成果の概要：頭頸部癌細胞株を用い抗癌剤（5-FU）感受性規定因子としての mRNA 発現と MTT assay 法による抗癌剤感受性との相関を検討した。相関が有意であったものは LIG3 および TK1 であった。さらにオーダーメイド化学療法を臨床に直結した形で実践するため、手術検体を用い、in vitro 感受性試験として HDRA 法を行った。頭頸部がん領域における TS-1 の感受性試験はこれまで報告されておらず、その実験方法を確立した。TS-1 の腫瘍阻止率は平均 60.29 で 5-FU 単剤では平均 52.09 であった。ギメラシル（CDHP）による感受性の増強効果は平均約 15.8%であった。本法は術後補助治療や再発時の薬剤選択の指標となり、臨床的に大きな意義を持つものである。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2007 年度	2,000,000	0	2,000,000
2008 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総　計	2,600,000	180,000	2,780,000

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
キーワード：頭頸部外科

１．研究開始当初の背景

(1) フッ化ピリミジン系薬剤（5-FU,UFT,TS-1 など）は頭頸部がん臨床においても幅広く用いられている。特に後２者は内服製剤であり、癌治療後の補助療法に用いやすい薬剤である。

(2) 有効例への投与は頭頸部癌の予後向上に寄与する戦略となりうる。しかし無効例については副作用と医療経済面からも不利益な投与となるため、これを回避する必要がある。

(3) これまで頭頸部がん領域において TS-1 の感受性試験については報告がない。

(4) フッ化ピリミジン系薬剤を補助化学療法として使用する場合、単剤投与で行うことが一般的であるため、オーダーメイド抗癌剤療法をもっとも単純な形で実践可能である。近年、他癌種におけるこれらの術後補助療法としての有用性が randomized study において証明されつつあり（Kato H, et al.: New Engl J

Med 350: 1713-1721, 2004., Noguchi S, et al.: J clin Oncol 23(10): 2172-2184, 2005）、重要性は今後さらに増すものと考える。

(5) 5-FU はその 85%がその分解酵素である DPYD によって分解されるため、DPYD（DPD: dihydropyrimidine dehydrogenase）と 5-FU 感受性との相関を示した報告は他にも多く見られる。これに対し 5-FU の代謝酵素である TYMS(TS: thymidylate synthase)においても、獲得耐性を含め感受性との関連を示した報告が見られる。しかしながら DPYD の方が有意に相関するという報告が多数を占める。これは TYMS が細胞死を誘導するためには 5-FU の代謝産物である FdUMP と 5,10CH2-THF との 3 量体を形成する必要があるからであり、葉酸代謝系との比を考慮に入れる必要があるからだと考えられる。

(6) また本研究者は 5-FU 抗癌剤感受性因子を抽出する目的で頭頸部癌細胞株を用いた focused DNA array（既知の抗癌剤関連因子（52 種）をターゲットとして配列したもの）を行った。MTT assay による抗癌剤感受性（IC50）との順位相関解析を用いた検討で有意な相関を認めたものは、FPGS, MRP1, LIG3, PARP, p53, SOD1, UCK2 の遺伝子であった。

２．研究の目的

(1) 頭頸部癌細胞株を用いた realtime RT-PCR により抗癌剤（5-FU）感受性規定候補因子となりうる mRNA 発現と MTT assay による抗癌剤感受性との相関を検討する。以前の研究で得られた focused DNA alley の結果からフッ化ピリミジン系薬剤の感受性予測因子の候補（FPGS, MRP1, LIG3, PARP, p53, SOD1, UCK2）が同定されたが、この中から抗癌剤感受性と相関のある因子を同定する。

(2) 同様に頭頸部癌細胞株を用いて 5-FU の抗癌剤感受性を求め、DPYD, FPGS 以外の 5FU 代謝関連遺伝子（DHFR, DPYS, DUT, ECGF1, FDXR, GGH, MTHFR, NFKB1, NME1, NME2, RRM1, RRM2, TK1, TNFSF6, TP53, TYMS, UMPH2, UMPH2, UMPK, UMPS, UNG, UP, UPB）について網羅的に検討を行う。

(3) フッ化ピリミジン系薬剤としては従来の 5-FU に加え、近年、実地臨床で使用されている TS-1 も注目される。これは DPYD 阻害剤であるギメラシル（CDHP）との合剤であり、分解酵素である DPYD を拮抗阻害することによって、効果を高めた薬剤である。本薬剤の抗癌剤感受性予測に関する検討は、特に頭頸部がん領域においては未だほとんど報告されていない。オーダーメイド療法としての補助療法の薬剤選択にかかわる重要な問題であり、この TS-1 を用いた抗癌剤感受性試験についての方法を検討する。

(4) 抗癌剤の感受性を手術検体にて測定し、術後補助治療や再発時の薬剤選択の指標とすることは、オーダーメイド抗癌剤療法をもっとも単純な形で実践可能である。本研究の最大の目的は実地臨床への応用が可能な TS-1 を含んだ抗癌剤感受性試験を確立することである。

３．研究の方法

(1) Focused DNA arrayで得られた5-FU抗癌剤感受性規定因子の候補（FPGS, MRP1, LIG3, PARP, p53, SOD1, UCK2）についてrealtime RT-PCR（Comparative Ct法, 内部標準GAPDH）を行い抗癌剤感受性との相関を検討した。

抗癌剤感受性は5-FU, 72時間接触による MTT assayによって得られたIC50をその指標とした。細胞株はUM-SCC-6, 10B, 14A, 17B, 23, 81B, KON, SAT, HSQ-89の９種類を用いた。

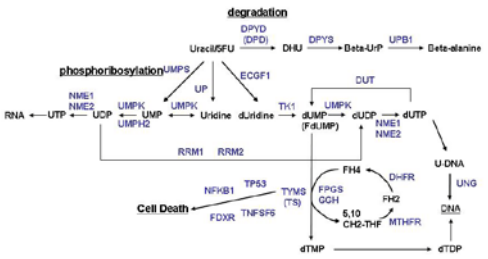
①MTT assay

各細胞 2×10^3Cells/Wel1. 100μl（Medium: DMEM）とする。濃度希釈系列の5-FU・100μLに72時間接触の後、MTT試薬（30μL）に3時間反応させる。生成FormazanにDMSO150μL加え溶解し、プレートリーダーで吸光度測定（波長 540nm/Reference630nm）、IC50を算出する。

②Realtime RT-PCR

Total RNA抽出の後、cDNAを合成、ABI prism 7900 HTを用いRealtime PCR（TaqMan Probe法）を行う。発現量比の算定にはComparative Ct法（内部標準はGAPDH）を用いる。統計解析はSpearman rank correlation testを用いる。

(2) 5-FU代謝経路にかかわる遺伝子（DHFR, DPYD, DPYS, DUT, ECGF1, FDXR, GGH, MTHFR, NFKB1, NME1, NME2, RRM1, RRM2, TK1, TNFSF6, TYMS, UMPH, UMPH2, UMPK, UMPS, UNG, UP, UPB)についても上記(1)と同様の方法で検討を行った。realtime RT-PCRによるmRNA発現と5FU抗癌剤感受性との相関について検討した。



(3) 頭頸部がん領域におけるTS-1の感受性試験についてはこれまでに例がなく、まず実験方法を決定した。TS-1は5-FUの作用をCDHPにて増強させる薬剤であり、CDHP単独または5-FU+CDHPでHDRA法を行う方法の２通りが考えられる。これに関する予備実験として実際にHDRA法を行った。

(4) 実際に手術で摘出された検体を用いて、TS-1、5-FUのみならず、CDDP、TXTの感受性についても同時に測定を行った。HDRA法は細切した臨床検体をゼルフォーム上に留置し、20%FBS+RPMIに薬剤を加え、7日間培養する。その後、MTTとcollagenaseを加えてMTTアッセイを行った。
TS-1については5-FU+CDHPでHDRAを行い、5-FU単剤との比較によりCDHPによる増強作用を判定するという方法をとった（研究成果4-(3)参照）。各薬剤、コントロールとも4検体分測定し、その平均値をデータとして用いた。各薬剤の濃度は5-FU, CDHP, CDDP, TXTでそれぞれ120, 240, 20, 100μg/mlとした。

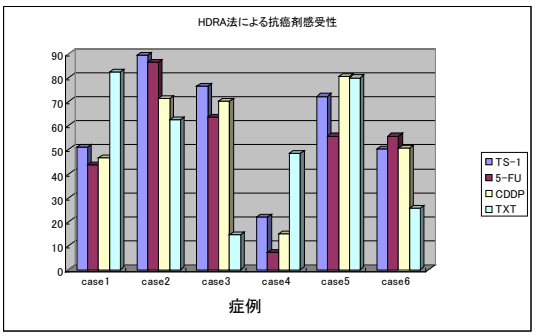
４．研究成果

(1) 抗癌剤感受性、つまりMTT assayによって得られたIC50はUM-SCC-6, 10B, 14A, 17B, 23, 81B, KON, SAT, HSQ-89において、各々0.925, 3.058, 2.782, 5.175, 0.930, 0.650, 7.319, 13.546, 1.600（μg/ml）であった。
　5-FU感受性規定因子の候補中、相関を認めたのはLIG3(P<0.039, 相関係数0.692)であった。当初注目していた葉酸代謝経路に関係するFPGSにおいては、その相関は見られなかった。

(2) 5-FU代謝経路にかかわる遺伝子（DHFR, DPYS, DUT, ECGF1, FDXR, GGH, MTHFR, NFKB1, NME1, NME2, RRM1, RRM2, TK1, TNFSF6, TP53, TYMS, UMPH2, UMPH2, UMPK, UMPS, UNG, UP, UPB）発現の検討においてmRNA発現と5-FU抗癌剤感受性との相関を認めたものはTK1(P<0.022, 相関係数0.743)であった。ただしこれらの因子のみから抗癌剤感受性の正確な予測と臨床応用は困難と考えられた。

(3) 頭頸部領域において実際の臨床検体を用いる場合にはHDRA法が行いやすく、充分施行可能と考えられた。TS-1の感受性試験としてはa) CDHP単独、b) 5-FU+CDHPでHDRAを行う方法の２通りが考えられる。
　予備実験としてCDHP単独でHDRAを行ったところ、CDHPのI.I.(Inhibition Index)は-56.5から23.8%と比較的低値であるだけでなく、マイナス、つまり増殖してしまうケースも見られたため実験系として不適当と考えられた。よって5-FU+CDHPにてHDRAを行い、5-FU単剤と比較することによりCDHPによる5-FUの増強作用を判定することとした。
　CDHPの濃度はTS-1の臨床薬理データ（Hirata et al. CCR 1999）によると、AUCで5-FUの約２倍であることから、感受性試験でも同様の条件(5-FUに対してCDHPの濃度を２倍に設定)とした。

(4) TS-1、5-FU、CDDP、TXTの感受性について臨床検体を用いて測定を行った。
　実験方法が確立してから現在まで実際の臨床検体6症例の測定を行ったため、これら6症例で検討した。個々の症例で薬剤毎の感受性は大きく異なり、オーダーメイド療法の必要性を再認識する結果となった。5-FU+CDHPのI.I.は60.29（平均）で5-FU単剤のI.I.は52.09（平均）であった。CDHPによる感受性の増強効果は約15.8%（平均）であった。
　概ね5-FU単剤よりもTS-1の感受性のほうが勝ったが、症例6のように感受性がほぼ同等（逆転している、あるいはCDHPによる増強作用が明らかに認められない）症例も存在した。
　また頭頸部がん一般にCDDPや5-FUの感受性は比較的良いとされるが、症例4のようにこれらの薬剤の感受性が通常よりも低く、TXTの感受性が著明に高いという症例も存在した。
　これらの結果からも、抗癌剤感受性試験で得られた情報は実際の薬剤選択において有力な手掛かりとなるであろうことが推察された。



現在、この方法で安定した結果が得られており、実地臨床への応用が可能であると考えている。

In vitro 抗癌剤感受性は実際の生体における反応によく相関することが知られており、なかでも特に効果のない抗癌剤を見極めるのに有効であると考えられている。

効果の期待できない抗癌剤を用いることは、治療成績を低下させ、副作用、医療経済面からも不利益をもたらす。したがって、抗癌剤の感受性を治療前に判定できれば、適切な治療法の選択に役立ち、更には治療成績の向上にもつながる。

また手術の際にはがん組織を得やすいため、今後も手術で得られたがん組織を積極的にHDRA法によって検査することで、術後の補助治療や再発した際の抗癌剤治療の選択に役立つのではないかと考える。

今後、症例数を重ね、検討後に発表を予定している。本研究の方法で得られる結果は上述のように、臨床的に大きな意義を持つものである。

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）

① Hasegawa Y, Goto M, Hanai N, et al. Prediction of chemosensitivity using multigene analysis in head and neck squamous cell carcinoma. Oncology 73(1-2): 104-111. 2007. 査読有

②花井信広ほか、頭頸部扁平上皮癌に対するDocetaxelとCisplatin併用化学療法の第Ⅱ相試験、癌と化学療法36、掲載予定、2009、査読有

〔学会発表〕（計　１件）

①花井信広、頭頸部扁平上皮癌に対するDocetaxelとCisplatin併用化学療法の第Ⅱ相試験、第25回東海頭頸部腫瘍研究会、2008. 1.24. 名古屋

６．研究組織
(1)研究代表者
花井　信広（HANAI NOBUHIRO）
愛知県がんセンター（研究所）発がん制御研究部・研究員
研究者番号：80381797

(2)研究分担者
該当なし

(3)連携研究者
該当なし