

平成 21 年 4 月 13 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19890085  
 研究課題名（和文） 口腔扁平上皮癌における白金製剤感受性と浸潤能との関連  
 研究課題名（英文） Relation between CDDP sensitivity and invasion in oral squamous cell carcinoma  
 研究代表者  
 吉澤 邦夫（Yoshizawa Kunio）  
 金沢大学・附属病院・医員  
 研究者番号：60452108

研究成果の概要：口腔扁平上皮癌における白金製剤の細胞内輸送能とその感受性との関連を調べることを目的に、がん浸潤様式（山本・小浜分類の由来）の由来が明確な口腔扁平上皮癌 8 種および病理組織切片を用いて実験に供した。In vivo における高度浸潤癌では ATP7B 発現が強く、予後不良であり、in vitro では ATP7B 発現が CDDP 排出により細胞内 CDDP 蓄積量を減少させ、CDDP 抵抗性に関与していることが示唆された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,320,000	0	1,320,000
2008年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,670,000	405,000	3,075,000

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、白金製剤、シスプラチン (CDDP)、トランスポーター、ATP7B, siRNA,

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 難治性口腔扁平上皮癌は、高度ながん浸潤・転移を来し、抗がん剤への耐性化を獲得し、再発しやすい。この難治性因子は様々な遺伝子の発現変化により引き起こされると報告されている。これらのことから、がんの悪性化において浸潤、転移および薬剤耐性は個々に進行する面もあるが、一連の現象として遂行されている可能性が考えられる。また、一方で高度浸潤癌において抗がん剤の感受性が低いことが臨床学的検討からいわれていたが、実験的に裏付けた報告は見

受けられないという状況であった。

(2) 研究代表者をはじめいくつかのグループは、口腔扁平上皮癌においても高度浸潤癌では抗がん剤の効果が低いことを報告している。特に慢性に浸潤した腫瘍の制御の困難さに治療に携わるものは苦慮し、様々な治療法を用いて集学的治療が検討されている。しかし、がん浸潤性と抗がん剤感受性との関係を裏付けする実験学的検討はあまりされておらず、より効果のある集学的治療を確定するために、感受性を左右する臨床学的所見であるがん浸潤様式山本・小浜分類と感

受性を制御する因子との関係を明らかにすることが必要と考えられた。そこで、本研究にて高浸潤癌に対する白金製剤（シスプラチン）の治療効果を増強効果の開発が可能となるという着想に至った。

## 2. 研究の目的

(1) 近年、抗がん剤の耐性化のメカニズムが明らかになってきている。中でも、とくに白金製剤の耐性化については、白金製剤の細胞内蓄積量の低下に伴い、取り込みの低下、排出の促進そしてそれらに関わるトランスポーターの発現の変化などが報告されている。また、これらは転写因子により制御されているとするグループでは、転写因子を標的とした治療の可能性に関する研究報告を欧米の一流雑誌に多く発表された。その中でも、NF- $\kappa$ B を標的とした報告が注目されており、当施設ではがん浸潤に対する NF- $\kappa$ B が制御する悪性形質の発現について多くの報告をしてきた。また、NF- $\kappa$ B は、抗がん剤を排出させるのに働く MDR1 などを調節し、抗がん剤の感受性も制御するといわれている (Mabuchi et al., J Biol Chem 279, 2004)。

(2) 前述のごとく、がん浸潤と抗がん剤感受性とは、一つの転写因子にて制御されていることが示唆されていることから、これらの結びつきは深いと考えられる。研究代表者らは、臨床病態学的所見による治療法の選別を検討しており、がん浸潤様式山本・小浜分類に基づいたがん悪性化の系統的な研究を進めることとした。

(3) これまでの報告では、がん細胞が白金製剤の耐性化を得る過程で白金製剤の細胞内蓄積量の低下が認められていた。そして、その細胞内蓄積量の低下に関して、白金製剤の取り込みおよび排出に関わるトランスポーターの動態が大きく関わるとされている。これまでの研究成果からがん浸潤様式由来が明確な細胞株を用い、その白金製剤との感受性を比較検討し、さらに白金製剤感受性に関与する輸送系遺伝子形質発現を詳細に検討し、がん浸潤様式と様々な白金製剤感受性との関連を明らかにすることを目指した。

## 3. 研究の方法

(1) 口腔扁平上皮癌由来細胞株のシスプラチン (CDDP) 感受性比較 (浸潤様式別) : これまでのがん浸潤様式 (山本・小浜分類) に基づいた系統的な研究の中でその由来が明確な口腔扁平上皮癌細胞株 8 種を下記のごとく実験に供した。

①がん浸潤様式 3 型として 3 種 (HSC-2, HSC-4 および OSC-20 細胞)

②4C 型として 3 種 (OBC-01, OSC-19 および OTC-04)

③4D 型として徳島大学口腔顎顔面外科学の

長山勝教授から供与を受けた 2 種 (HOC313 および TSU)。

(2) 薬剤感受性試験 : in vitro における化学療法効果の判定は MTS assay (Promega) にて行った。96 穴マイクロプレートの各ウェルに  $3 \times 10^3$  個の口腔扁平上皮癌細胞を播種 24 時間後、薬剤 (白金製剤) の存在下で 72 時間培養しマイクロプレートリーダーにて吸光度 (490 nm) の測定を行った。各細胞における IC90, IC50 および IC10 を求め、浸潤様式別に比較検討した。

(3) CDDP の細胞内濃度 : 前述した各細胞液に培養液に  $10 \mu\text{g/ml}$  白金製剤を添加し白金製剤の細胞内への取り込みおよび排出を浸潤様式別に比較検討した。細胞の管理ならびに処理は当科研究室で行うものの、細胞内濃度測定には専用の施設が必要となるため、測定を (株) ナック (東京) に委託して行った。細胞内の白金製剤の濃度はその白金濃度を指標とした。

(4) RT-PCR 法およびリアルタイム PCR : 白金製剤の取り込みおよび排出に関連すると言われるトランスポーター mRNA 発現は RT-PCR 法にて検討した。検討するトランスポーターは、取り込みに関しては CTR1, 排出に関しては、ATP7A, ATP7B とした。

(5) Western blotting 法 : 白金製剤の取り込みおよび排出に関連すると言われる前述のトランスポーターのタンパク質発現を Western blotting 法にて検討した。尚、タンパク質の抽出は研究時間の節約から M-Per (PIERCE) を用いて行った。

(6) 免疫組織学的染色 : in vivo における ATP7B の局在および発現レベルを検討した。検出に使用した抗体は Western blotting 法にて使用した抗体と同一にした。材料としては金沢大学医学部附属病院歯科口腔外科を受診した口腔扁平上皮癌一次症例患者より得られた病理組織切片を対象とした。

(7) CDDP 耐性株の作製 : 前述の研究より求められた各細胞の IC90 を CDDP の添加開始濃度として、耐性株の作製を行った。そして増殖状態を確認しながら、徐々に CDDP の添加濃度を上げていき、CDDP 最終濃度は各無処置細胞での IC50 を目標とした。

(8) siRNA 導入 : トランスポーター遺伝子 mRNA を標的とした 21 塩基の siRNA を合成、精製し実験に供した。導入には HiperFect Transfection Reagent (QIAGEN) を使用した。siRNA 導入の至適条件を詳細に検討し、その抑制実験には CDDP の細胞内濃度、RT-PCR 法およびリアルタイム PCR、Western blotting 法を行った。また、抑制実験のコントロールとしては nonsense siRNA を用いた。internal control としては  $\beta$ -actin を統一して用いた。

(9) まとめ : 臨床学的には腫瘍組織細胞が白金製剤暴露により獲得耐性化する以前に、臨

床病理学的因子から白金製剤の効果予測できることが望ましい。そのため、本研究ではH19年度に白金製剤を暴露していない状態の浸潤様式別の由来細胞株を利用した上で自然耐性機序を解明し、H20年度にはその応用として白金製剤獲得耐性化における感受性機序について検討する手順とした。

平成19-20年度における研究計画は、当科研究室で実行可能と考えられた。RNA、タンパクレベルに応じた吸光度測定器また、細胞培養、各電器泳動等は現有の備品で実行可能であった。また、方法に対しては、これまでの実験手法であり、特別な手技は必要なかった。

#### 4. 研究成果

上記研究方法の番号付けに従って、実験結果を下記する。

(1) 細胞株を用いて、in vitro系でCDDP感受性の比較したところ、高度浸潤癌由来細胞株4D型(HOC313, TSU)では、CDDP感受性を低く認めた。

(2) 細胞培養中にCDDP暴露し、CDDP細胞内蓄積量を計測すると、高度浸潤癌由来細胞では、細胞に蓄積したCDDP量が低かった。この実験結果と上記(1)の結果から、細胞内に蓄積したCDDP量が低いほどCDDPの感受性が低いことを示唆しており、合理的に考えられた。

(3) CDDPの取り込みおよび排出に関わるトランスポーターとして知られているCTR1, ATP7Bのがん細胞における発現の比較検討を行った。CTR1, ATP7Bの発現を半定量RT-PCRおよびWestern blotting法を用いて、比較検討すると、CTR1の発現は有意な差を認めなかったが、一方ATP7Bの発現に関しては、高度浸潤癌由来細胞においてその発現が強く、低度浸潤癌由来細胞株でその発現が低く認められた。

(4) 口腔扁平上皮癌一次症例患者より得られた病理組織切片を対象として、CDDPの排出に関わるトランスポーターATP7Bの免疫染色を行い、臨床病理学的因子との相関を検討すると、高度浸潤癌症例群では、低度浸潤癌症例群に比べてCDDP排出に関わるとされているATP7Bの発現が強く認められた。

(1)~(4)の結果より、高度浸潤癌、低度浸潤癌に比べてCDDPを細胞外に排出するATP7Bが強く働き、CDDP細胞内蓄積量も減少した結果、CDDP低度感受性になったと考えられた。

(5) CDDP耐性株樹立し、RT-PCR法、Western blotting法を用いて細胞内の各トランスポーター発現を検討したところ、親株に比べてATP7Bが強く発現していることが判明した。

(6) ATP7BのsiRNA導入を行い、これまでの抑制実験を行った。ATP7B siRNA導入細胞株では、親株に比べてCDDP細胞内蓄積量も高く、CDDP感受性も高く認められた。

(5), (6)の結果より、CDDP耐性化にATP7B

が強く関与し、その機能であるCDDP排出能が強く働くことでCDDP耐性化機転を来していることが示唆された。また、抑制実験でもATP7Bの排出能を抑制することで、逆にCDDP感受性が高くなることから、CDDP細胞内排出能に関わるATP7BがCDDP耐性化、感受性に密接に関連することが判明した。

これらの研究成果は、結果成果が積み上がる毎に国内外にて学会発表したが、他の研究グループにおいても抗がん剤耐性における薬剤排出系の機能とメカニズムの解明について精進しており、その研究グループと有意義な議論を行い、新たな知見や研究手法を学べた。それにより、さらなる研究成果に結びついたものとする。また、これらの研究成果はとくに主要なものとして、*Oral Science International* 4(1)巻, 28-37, 2007, 査読有, *Oncology Reports*, 18巻, 987-991, 2007, 査読有などに投稿し、他の研究グループとの位置づけや本研究の内容を明らかにした。

得られた成果より、ATP7Bは口腔扁平上皮癌のCDDP感受性マーカーとして治療方針に寄与すると考える。今後は、ATP7Bの耐性メカニズムをさらに解明し、in vivoにおいて研究も進め、治療に応用できるように研究を進めるべきである。

#### 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 8 件)

①吉澤邦夫、能崎晋一、(他 5 名, 1 番目)、*Loss of maspin is a negative prognostic factor for invasion and metastasis in oral squamous cell carcinoma. Journal of Oral Pathology & Medicine*, in press, 2009, 査読有

②大原照比佐、川尻秀一、(他 8 名, 10 番目)、*Integrin expression levels correlate with invasion, metastasis and prognosis of oral squamous cell carcinoma, Pathology Oncology Research*, in press, 2009, 査読有

③加藤広祿、川尻秀一、(他 3 名, 3 番目)、*Apoptosis-associated markers and clinical outcome in human oral squamous cell carcinomas, Journal of Oral Pathology & Medicine*, 37(6)巻, 364-371, 2008, 査読有

④北原寛子、加藤広祿、(他 3 名, 4 番目) *E-cadherin の口腔扁平上皮癌の浸潤能への影響、日本口腔組織培養学会誌*, 17(1)巻, 23-24, 2008, 査読無

⑤北原寛子、川尻秀一、(他 5 名, 5 番目)、

Immunohistochemical expression of E-cadherin and  $\beta$ -catenin correlate with invasion, metastasis and prognosis of oral squamous cell carcinoma. Oral Surgery, 1 巻, 28-34, 2007, 査読有

⑥吉澤邦夫、能崎晋一、(他 5 名、1 番目)、Copper efflux transporter (ATP7B) contributes to the acquisition of cisplatin-resistance in human oral squamous cell lines. Oncology Reports, 18 巻, 987-991, 2007, 査読有

⑦吉澤邦夫、能崎晋一、(他 5 名、1 番目) Expression of copper efflux transporter (ATP7B) in the transport of cisplatin in cell lines derived from invasive oral squamous cell carcinoma, Oral Science International, 4(1)巻, 28-37, 2007, 査読有

⑧吉澤邦夫、能崎晋一、(他 2 名、1 番目) 口腔扁平上皮癌由来細胞株のシスプラチン (CDDP) 獲得体制化と CDDP 輸送能の関連. 日本口腔組織培養学会誌, 16(1)巻, 21-22, 2007 査読無

[学会発表] (計 4 件)

①吉澤邦夫、口腔扁平上皮癌由来細胞株における Maspin 発現と浸潤および予後との関連、第 27 回日本口腔腫瘍学会、2009. 1/30, 宇都宮市

②吉澤邦夫、Maspin expression as a biomarker in invasive oral squamous cell carcinoma, 3<sup>rd</sup> European Conference on Head and Neck Oncology, 2008. 5/9, ザグレブ (クロアチア)

③吉澤邦夫、口腔扁平上皮癌における Maspin 発現と浸潤様式および予後との関連、第 62 回日本口腔科学会総会、2008 4/17, 福岡市

④吉澤邦夫、口腔扁平上皮癌の Cisplatin(CDDP)耐性における ATP7B の発現意義、第 52 回日本口腔外科学会総会、2007. 9/29, 名古屋市

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

吉澤 邦夫 (YOSHIZAWA KUNIO)

金沢大学・附属病院・医員

研究者番号 60452108