

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月28日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21592555

研究課題名（和文） 口腔癌化学放射線療法の新規効果予測因子の同定とその発現に基づいた個別化医療の構築

研究課題名（英文） Identification of new predictive factors for chemo-radiation against oral cancers and setting of individualized medicine based on their expressions

研究代表者

原田 耕志 (HARADA KOJI)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：60253217

研究成果の概要（和文）：抗癌剤または放射線耐性口腔癌細胞株を作製した。5-FU 耐性および非耐性株間で特異的な変動を示す遺伝子群をマイクロアレイ解析にて検索し、GDF15 等候補遺伝子を同定した。候補遺伝子の発現抑制につながる薬剤を検討したところ、トリフルオロチミジンを見出した。5-FU 系抗癌剤をベースとした化学療法後の再発症例に対してトリフルオロチミジンをベースとした治療法は一つの選択肢になると考えられた。

研究成果の概要（英文）：We established anticancer drug-resistant or radiation-resistant oral cancer cell lines. The specific fluctuating genes between a 5-FU-resistant cell line and a non 5-FU-resistant cell line were identified through microarray analysis, and we identified candidate genes including GDF15. We found a trifluorothymidine by investigating the agent can suppress the candidate gene expression. These finding suggested that trifluorothymidine based chemotherapy may be one of options for recurrent cases after 5-FU based chemotherapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011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：口腔癌、化学放射線療法、効果予測、耐性株

1. 研究開始当初の背景

口腔癌治療においては、生存率の向上が求

められると同時に機能温存と審美性の保持が他の悪性腫瘍以上に要求されることから化学

療法の役割は非常に大きいですが、化学療法単独では進行例での治療は困難であり、放射線を併用した化学放射線療法が主たる治療法となっている。ただし、治療効果の向上や副作用の軽減を目指し抗癌剤の改良・開発が続けられているため、実際には、経口抗癌剤投与だけで腫瘍が消失するケースを経験する。また5-FU系抗癌剤の効果予測因子 TS, DPD, TP, OPRT を駆使しても口腔癌に対する治療効果を完全には予測できていない。そこで、乳癌に対する分子標的薬ハーセプチンの効果予測因子HER2に匹敵するような新規効果予測因子の同定が急務と考えられた。

2. 研究の目的

(1) マイクロアレイ解析に加え、パスウェイ解析とプロテオミクス解析を用いて、口腔癌細胞株と抗癌剤あるいは放射線耐性口腔癌細胞株間に特異的発現変動する遺伝子・蛋白を検索することにより、それぞれの効果予測因子の同定を第一の目的とする。

(2) 同定した効果予測因子の発現を指標として感受性予測を行い、適切な薬剤・治療法を選択できる個別化医療の構築を第二の目的とする。

3. 研究の方法

(1) 抗癌剤あるいは放射線耐性口腔癌細胞株を作製する。

(2) マイクロアレイ解析により、口腔癌細胞株と抗癌剤あるいは放射線耐性口腔癌細胞株間で特異的な発現変動を示す遺伝子群を検索し、口腔癌に対する抗癌剤あるいは放射線の特異的な効果予測因子の同定を行う。

(3) 抗癌剤あるいは放射線を用いて治療を行ってきた口腔癌患者の治療前生検材料を用いて、上記により得られた効果予測因子としての候補遺伝子が、治療効果の予測につながるか否かを検討する。

(4) 上記により有用性が示唆された効果予測因子の発現を制御し得る薬剤を探索する。

4. 研究成果

(1) 口腔癌細胞株 (HSC2, HSC3, HSC4) を用いて、5-フルオロウラシル(5-FU)、タキソテル (TXT)、シスプラチン (CDDP) で処理

を継続し、5-FU 8.0 μ g/ml まで、TXT 105 ng/ml まで、CDDP 12.0 μ g/ml まで耐性を示す耐性株を作製できた。同様に、放射線を 2Gy から徐々に線量を上げながら継代培養を続けることで 10Gy の放射線量に耐性を示す放射線耐性口腔癌細胞株を作製した。ただし HSC3 は抗癌剤および放射線感受性が高く、耐性を示し難かった。

(2) 口腔癌細胞株 (HSC2) の 5-FU 耐性株 HSC2/FU は、5-FU 8 μ g/ml 以下の濃度では耐性を示し、形態的に紡錘形であった。また HSC2/FU はヌードマウスに移植したところ、HSC2 を移植した場合と比較して造腫瘍性が増強した(図 1)。さらに HSC2/FU において、各クローン間で 5-FU 耐性に差異が生じていることを見出し、最も 5-FU 耐性を示すクローン HSC2/FU-high と耐性を示さない HSC2/FU-low を分離樹立した(図 2)。これらのクローン間において特異的な変動を示す遺伝子群をマイクロアレイ解析にて検索し、GDF15 等の候補遺伝子を同定した。また放射線耐性株 HSC2/RT は、10.0Gy の放射線量に耐性を示しており、HSC2/RT と HSC2 間において特異的な変動を示す遺伝子群をマイクロアレイ解析にて検索し、ALDH1 等を同定し、その他重要と考えられる候補遺伝子も同定した。

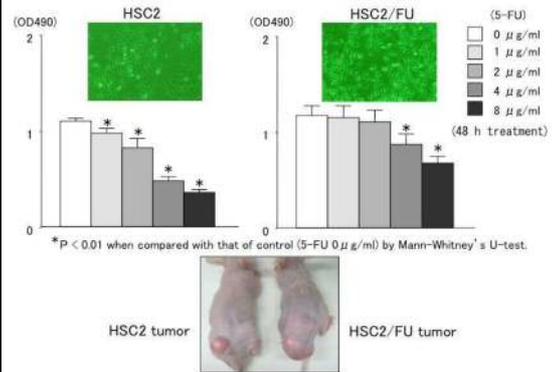


図1 5-FU耐性口腔扁平上皮癌細胞株とヌードマウス腫瘍

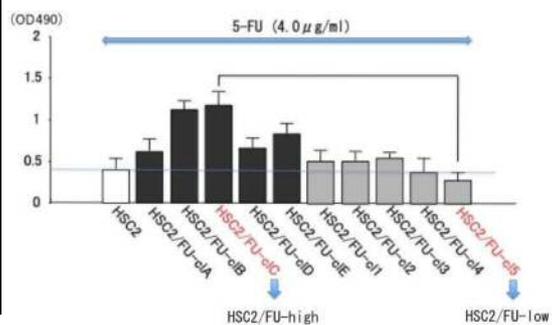


図2 5-FU耐性口腔扁平上皮癌細胞株のクローン間での耐性の差異

(3) TS-1 と Docetaxel 併用化学療法を施行した口腔扁平上皮癌患者 40 例における GDF15 の発現と治療効果との関連性を検索したところ、奏効例 36 例中 26 例で高発現を示し、非奏効例 4 例中全例で低発現を示し、有意差が認められた。また放射線化学療法を施行した口腔扁平上皮癌患者 30 例における ALDH1 の発現は、奏効群と比較して非奏効群において有意に高かった。

(4) 5-FU 耐性に関わる可能性のある GDF15 等の発現抑制につながる薬剤を検討したところ、トリフルオロチミジンを見出し、これは HSC2/FU-high に対して細胞増殖抑制効果を発現し、さらにヌードマウス 5-FU 耐性腫瘍に対しても抗腫瘍効果を発現した(図 3)。しかしながら、放射線耐性に関わる可能性のある ALDH1 等の発現抑制につながる薬剤を検討したところ、顕著な抑制につながる薬剤は見出せなかった。

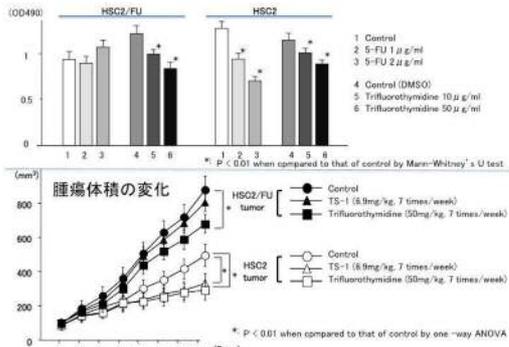


図3 5-FU耐性口腔扁平上皮癌に対するトリフルオロチミジンの効果

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 12 件)

① Toyoko Harada, Koji Harada, Yoshiya Ueyama. Enhancement of tumor radioresponse by combined treatment with Cepharranthine is accompanied by inhibition of DNA damage repair and induction of apoptosis in oral squamous cell carcinoma. Int J Oncol. in press. (2012) 査読あり

② 原田豊子、原田耕志、上山吉哉. 口腔扁平上皮癌における分子標的薬 Bortezomib と TS-1 の併用効果についての基礎的研究. 頭頸部癌. 2011 年 37 巻 536-541 頁, 査読あり.

③ Takamitsu Mano, Kunio Ishikawa, Koji Harada, Hirotsugu Umeda, Yoshiya Ueyama. Comparison of apatite-coated titanium prepared by blast coating and flame spray methods—evaluation using simulated body fluid and initial histological study. Dent Mater J. 2011; 30: 431-437. Epub 2011 Jul 21. 査読あり

④ Lateef E. Aljorani, Agnes Bankfalvi, Frank A. Carey, Koji Harada, Go Ohe, Sarah J. Jones, Ian R. Ellis, Seth L. Schor, Ana M. Schor. Migration-stimulating factor as a novel biomarker in salivary gland tumours. J Oral Pathol Med. 2011 Apr 11. Epub. 査読あり

⑤ 原田耕志. 口扁平上皮癌に対する経口抗癌剤 TS-1 を用いたメトロノミックケモセラピーの有用性とそのメカニズムの解析. 学術の森. 2011 年 4 巻 109-117 頁, 査読あり.

⑥ Koji Harada, Yasutaka Itashiki, Takanori Takenawa, Yoshiya Ueyama. Effects of lentinan alone and in combination with fluoropyrimidine anticancer agent on growth of human oral squamous cell carcinoma in vitro and in vivo. Int J Oncol. 2010; 37: 623-631. 査読あり

⑦ Koji Harada, Tarannum Ferdous, Yasutaka Itashiki, Michiyo Takii, Takamitsu Mano, Yoshihide Mori, Yoshiya Ueyama. Cepharranthine inhibits angiogenesis and tumorigenicity of human oral squamous cell carcinoma cells by suppressing expression of vascular endothelial growth factor and interleukin-8. Int J Oncol. 2009; 35: 1025-1035. 査読あり

⑧ Koji Harada, Tarannum Ferdous, Yasutaka Itashiki, Michiyo Takii, Takamitsu Mano, Yoshihide Mori, Yoshiya Ueyama. Effects of cepharranthine alone and in combination with fluoropyrimidine anticancer agent, S-1, on tumor growth of human oral squamous cell carcinoma xenografts in nude mice. Anticancer Res. 2009; 29: 1263-70. 査読あり

⑨ Yoshiya Ueyama, Masaki Okafuji, Koji Harada, Takamitsu Mano, Mariko Mihara, Kenichiro Uchida, Daijyu Horinaga, Noriko Wada. Clinical phase I trial of S-1 in the

combination with DOC using super-selective intra-arterial infusion with oral cancer. Gan To Kagaku Ryoho. 2009; 36: 395-399. 査読あり

〔学会発表〕(計 14 件)

① 原田耕志. 口腔癌に対するフッ化ピリミジン系経口抗癌剤を用いた新たな治療戦略. 日本口腔科学会総会, 2012. 5. 18. 広島国際会議場, 広島.

② Koji Harada, Toyoko Harada, Yasutaka Itashiki, Takanori Takenawa, Yoshiya Ueyama. Efficacy of metronomic chemotherapy with S-1 in human oral squamous cell carcinoma cells. The Third World Congress of the International Academy of Oral Oncology. 2011. 7. 17. the Copthorne Waterfront centre, Singapore, Singapore.

③ Koji Harada, Kenichiro Uchida, Yoshiya Ueyama. Cepharanthine enhances radiosensitivity through the inhibition of DNA double-strand break repair in oral cancer cells. 日本癌学会, 2010. 9. 23, 国立京都国際会館, 京都.

④ Koji Harada, Yasutaka Itashiki, Michiyo Takii, Yuriko Suwa, Takamitsu Mano, Yoshihide Mori, Yoshiya Ueyama. Effect of S-1 component Gimeracil on DNA double-strand break repair system. the Second World Congress of the International Academy of Oral Oncology, 11th July, 2009, Sheraton Centre, Toronto, Canada.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原田 耕志 (HARADA KOJI)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号 : 60253217