

## 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25年 5月17日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592237

研究課題名（和文）独創的なアプローチによる真のシスプラチン耐性遺伝子の検索

研究課題名（英文）Original approach to obtain intrinsic resistance genes to cisplatin

研究代表者

大廣 洋一（OHIRO YOICHI）

北海道大学・大学院歯学研究科・講師

研究者番号：40301915

研究成果の概要（和文）：

口腔がんのシスプラチン耐性遺伝子の候補であるオステオポンチンに関して以下の知見が得られた。オステオポンチンを強制発現させた口腔癌細胞株はシスプラチンに抵抗性を示した。逆にオステオポンチンの発現を抑制した細胞ではシスプラチンに感受性を示した。オステオポンチンは AKT の活性を亢進することで、シスプラチンによるアポトーシスに抵抗性を示すことが明らかとなった。オステオポンチンはシスプラチン耐性を術前に予測できるマーカーとなりうるということが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

This study investigated the relationship between cisplatin resistance and osteopontin which is candidate gene responsible for drug resistance. Oral squamous cell carcinoma cells transfected with osteopontin were increased in resistance to cisplatin treatment and in activity of AKT. Knockdown of osteopontin chemosensitized cancer cells to cisplatin. The resistance mechanism of osteopontin was depend on AKT activation. These results suggest that osteopontin expression in oral cancer could be a useful predictable marker for the response to cisplatin.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：抗癌剤耐性

## 1. 研究開始当初の背景

我が国での死因別死亡率はがんが第一位を占めており、なおも増加傾向がみられる。頭頸部癌も年々増加しているがんの一つである。頭頸部癌の治療は、根治性と機能保持という相反するテーマを両立させる必要が

ある。口腔は摂食、嚥下、呼吸、構音および発音など生活の基本となる機能を具備している器官であるが、外科的処置により、程度の多寡はあるもののこれらの機能は障害される。さらに審美性も損なわれることから、心理的障害も誘発することも特筆すべき点

である。従って特に顎顔面領域の腫瘍においては、抗癌剤による化学療法や放射線治療などの非観血的治療の確立が重要である。

しかしある種の癌は抗癌剤に抵抗性をもち、それらに抗癌剤を用いることは、外科的治療の時期を遅らせるだけでなく、ときに重篤な副作用を惹起させる可能性がある。よって抗癌剤適応の可否を事前に診断できればその意義は甚大であると考えられる。現在のところそれを可能にする確固たるマーカーは未だ見つかっていない。

耐性遺伝子には二種類存在することに留意する必要がある。ひとつは内因性耐性遺伝子で、耐性を示す癌細胞が本質的に発現を亢進し耐性に寄与する遺伝子である。もう一方は獲得性耐性遺伝子で、もともと細胞内での発現は低い、抗癌剤に暴露された際に反応性に発現を上昇させ、耐性に寄与する遺伝子である。我々の目的である、術前に感受性を予測するマーカーを得るためには、内因性耐性遺伝子を同定することが必須となる。従来の抗癌剤研究では、まず親株に抗癌剤処理を行なって、生き残った細胞から耐性株を樹立する。そして親株に比べ耐性株で強く発現しているものを耐性遺伝子として同定してきた。しかしながら、この方法で導かれた耐性遺伝子は内因性なのか獲得性なのかを区別することができない。実際、これまで同定されてきた数々の耐性遺伝子の発現と、腫瘍の抗癌剤感受性と間に相関がみられないという報告が散見される。それらの耐性遺伝子が獲得性耐性遺伝子であるならば、これらの報告は説明可能である。

そのためには獲得性ではなく内因性耐性遺伝子を同定する必要がある。われわれは薬剤投与による耐性細胞の樹立はせず、シングルセルクローニングによって数種類の細胞株を樹立した。その樹立した細胞株を用いて、シスプラチンの感受性を評価し、もう一方でそれら細胞株の遺伝子発現をマイクロアレイによって検索した。樹立した細胞株はシスプラチンに対する抵抗性が微妙に異なった。内因性耐性遺伝子は、その発現量とシスプラチンに対する抵抗性が正の相関を示すと考えられることから、耐性を示す細胞ほど多く発現している遺伝子を検索した。

## 2. 研究の目的

我々の目的は口腔がんの抗癌剤、特にシスプラチン感受性の有無を化学療法前に予測するマーカーとなる内因性耐性遺伝子を検索することである。またその分子メカニズムを解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 腫瘍細胞および培養条件

ヒト口腔扁平上皮癌細胞である HSC-3 細胞、

SAS 細胞および樹立した HSC-3-8 を耐性株として、HSC-3-10 を感受性株として用いた。各細胞は、37°C、5%CO<sub>2</sub>-気相下において 10% 牛胎仔血清 (FBS) を加えた培地中で通法に従い培養した。培地は Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Sigma) を用いた。なお HSC-3 細胞、SAS 細胞は理化学研究所 (Tsukuba, Japan) から分与された。

### (2) Western blotting 法

それぞれの細胞培養液中に CDDP 単独あるいは CDDP と 50mM の PI3-K 阻害剤 (Calbiochem, USA) を加え、PBS で洗浄後、NP-40 Lysis Buffer (150 mM NaCl, 1% NP-40, 50 mM Tris-HCl [pH 7.4], 50 mM NaF, 5mM  $\beta$ -glycerophosphate, 1 mM sodium orthovanadate, Protease inhibitor (sigma, MO, USA), 10% glycerol) にて可溶化、遠心後上清を細胞抽出液とした。細胞抽出液は SDS-polyacrylamide gelelectrophoresis (SDS-PAGE) にて展開後、polyvinylidene difluoride (PVDF) メンブレン (Millipore, MA, USA) に転写した。一次抗体として、抗 Cleaved PARP, 抗 p-AKT (Cell Signaling Technology), 抗  $\beta$ -actin (Santa Cruz Biotechnology) 抗体を用い、二次抗体には HRP 標識抗ラビット IgG 抗体 (Pierce, IL, USA) を用い、SuperSignal West Femto detection kit (Pierce, IL, USA) にて検出を行った。

### (3) 細胞増殖アッセイ (MTS アッセイ)

CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (PROMEGA) を用いて MTS assay を行った。HSC-3-8, 10 細胞を 96 穴に 3000 個/well 播種し 24 時間培養後、CDDP 5  $\mu$ g/ml で処理し、0, 1, 2 日後に MTS reagent を添加し 2 時間反応させ、Benchmark microplate reader (Bio-Rad Laboratories) を用いて 490nm で吸光度を測定した。

## 4. 研究成果

多くの腫瘍において AKT による生存促進メカニズムが亢進していることが知られている。我々が樹立した細胞株を用いて AKT の活性を Western blotting で調べた。

CDDP 未処理の耐性株 HSC-3-8 および感受性株 HSC-3-10 では AKT の活性に差異は認めなかった。しかし CDDP 処理によって HSC-3-10 では AKT の活性は低下したものの、HSC-3-8 では AKT の活性が強く維持されていた (図 1)。

次に CDDP に対する抵抗性を調べるため、HSC-3-10 と HSC-3-8 に CDDP を加え、1 日後および 2 日後に MTS アッセイを行った。HSC-3-8 は HSC-3-10 に比べ CDDP に対して抵抗性を示した (図 2 a)。しかし AKT の上流に位置する PI3K の阻害剤である LY294002 をシスプラチンと併用したところ、HSC-3-8 の

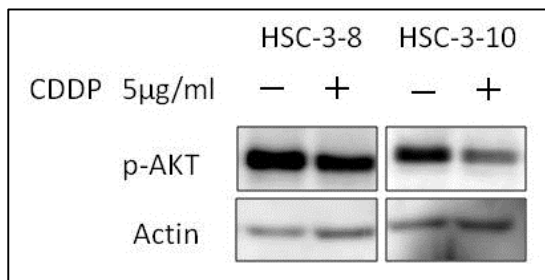


図1 耐性株 HSC-3-8 と感受性株 HSC-3-10 における AKT の活性。HSC-3-8 ではシスプラチンによる AKT 活性減少が HSC-3-10 に比べ少なかった

CDDP 抵抗性は消失し、HSC-3-10 と同レベルの感受性を示した (図2 b)。

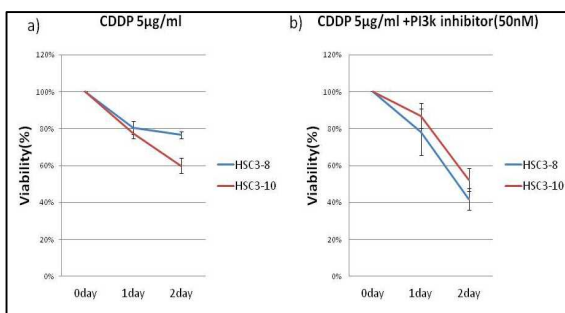


図2 耐性株と感受性株のシスプラチン抵抗性と PI3K 阻害剤の効果。耐性株 HSC-3-8 は HSC-3-10 に比べシスプラチン抵抗性を示したが、PI3K 阻害剤を併用するとその抵抗性が消失した。

これらのことから耐性細胞では AKT が活性化することにより耐性を示していることが明らかとなった。

マイクロアレイの結果より検索した内因性耐性遺伝子の候補のうち、AKT の活性との関係が示唆されているオステオポンチンについて、シスプラチン耐性との関係性について研究を進めた。

はじめに、オステオポンチンの発現量とシスプラチン抵抗性との関係を調べるため、HSC-3 オステオポンチンを強制発現した (図3 a)。オステオポンチン強制発現した細胞ではシスプラチンに抵抗性を示した。逆にオステオポンチンの発現を siRNA にて knockdown したところ、シスプラチンに対する抵抗性が減弱した (図3 b)。

これらの分子メカニズムを調べるため SAS 細胞を用いて AKT の活性と活性型 PARP の発現を調べた。SAS 細胞にオステオポンチン発現ベクターまたはコントロールベクターを遺伝子導入し、3 μg/ml のシスプラチンを 18 時間作用させた。

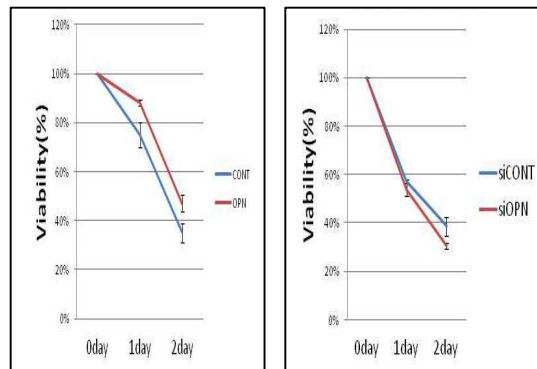


図3 オステオポンチンとシスプラチン抵抗性。HSC-3 細胞にオステオポンチンを強制発現させた細胞ではシスプラチンに抵抗性を示し、knockdown した細胞では感受性を示した。

オステオポンチンを強制発現させた細胞ではコントロールに比べ活性型 PARP の発現が抑制され、AKT の活性が上昇していた (図4 a)。さらにシスプラチン処理前に PI-3K 阻害剤 LY294002 を 3 時間前処置したところ、オステオポンチンによって抑制された PARP の活性が、コントロールと同程度になった (図4 b)。

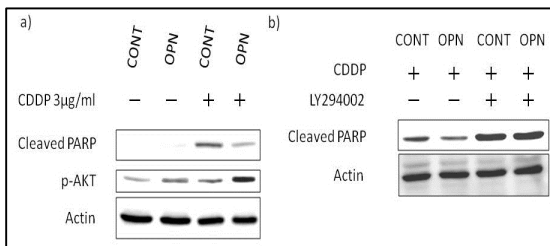


図4 オステオポンチンのシスプラチン耐性分子メカニズム。オステオポンチンは AKT 依存的にシスプラチンに抵抗性を示し、アポトーシスに抵抗性を示す。

以上のことより、次のことが明らかとなった。

- 1) シングルセルクローニング法を利用した方法によってシスプラチン内因性耐性遺伝子を同定することが可能であった。
- 2) 樹立した細胞株では、AKT の活性がシスプラチン抵抗性に重要であることが示唆された。
- 3) オステオポンチンを強制発現した細胞ではシスプラチンに対して抵抗性を示した。逆にオステオポンチンを knockdown した細胞ではシスプラチンに対して感受性を示した。
- 4) オステオポンチンの発現によってシスプラチンによる PARP の活性が阻害され、AKT の活性が増加した。また PI3K 阻害剤を併用するとオステオポンチンの発現による PARP の

活性阻害が消失した。

これらのことから、シスプラチン内因性耐性遺伝子であるオステオポンチンは、術前のシスプラチン耐性マーカーとなりうること、さらに化学療法による有効性を改善するためのターゲット遺伝子の一つであることが示唆された。

#### 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7件)

- ① Expression of parathyroid hormone-related protein confers malignant potential to mucoepidermoid carcinoma. Nagamine K, Kitamura T, (7名4番目) Oncol Rep. 2013 Jun;29(6):2114-8. 査読有り doi:10.3892/or.2013.2393.
- ② 大廣洋一, 栗林和代, 足利雄一, 小野貢伸, 鄭漢忠, 北村哲也, 進藤正信: 最新の歯学; 口腔癌治療における術前化学療法併用放射線治療の現状. 北海道歯学会雑誌, 33(2):192-195, 2013. 査読無し
- ③ 佐藤(栗林)和代, 小野貢伸, 足利雄一, 大廣洋一 (6名4番目): 多発性肺転移を伴った巨大な下顎エナメル上皮癌の1例. 査読有り, 日口外誌 58(3):137-141, 2012.
- ④ E1A expression might be controlled by miR-214 in cells with low adenovirus productivity. Yanagawa-Matsuda A, Kitamura T, 他4名, Virus Res. 2012 Dec;170(1-2):85-90. 査読有り doi:10.1016/j.virusres.2012.09.001.
- ⑤ Viral-mediated stabilization of AU-rich element containing mRNA contributes to cell transformation. Kuroshima T, Aoyagi M, Yasuda M, Kitamura T, 他6名, Oncogene. 2011 Jun 30;30(26):2912-20. 査読有り doi:10.1038/onc.2011.14.

[学会発表] (計7件)

- ① Ohiro Y, Histopathological response of concurrent preoperative chemoradiotherapy with Docetaxel and Cisplatin for Oral Squamous Cell Carcinoma. Congress of The European Association for Cranio-Maxillofacial Surgery, 11-15 Sep 2012. Valamar

Lacroma Dubrovnik Hotel (Croatia)

- ② Ohiro Y, The pattern of residual tumors after concurrent chemoradiotherapy in advanced lower gingival carcinoma. Annual Congress of ROC Association of Oral and Maxillofacial Surgeons, 12-13 March 2011, National Defence Medical College, (Taiwan)
- ③ Ohiro Y, The pattern of residual tumors after concurrent chemoradiotherapy in advanced lower gingival carcinoma. Asian Congress on Oral & Maxillofacial Surgery. 25-28 Nov 2010. Kuala Lumpur Convention Center, (Malaysia)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

大廣 洋一 (OHIRO YOICHI)  
北海道大学・大学院歯学研究科・講師  
研究者番号: 40301915

##### (2) 研究分担者

戸塚 靖則 (TOTSUKA YASUNORI)  
北海道大学・名誉教授  
研究者番号: 00109456  
北村 哲也 (KITAMURA TETSUYA)  
北海道大学・大学院歯学研究科・助教  
研究者番号: 00451451  
進藤 正信 (SHINDOH MASANOBU)  
北海道大学・大学院歯学研究科・教授  
研究者番号: 20162802

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: