

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 18日現在

機関番号：16101
研究種目：若手研究（B）
研究期間：2011～2012
課題番号：23792351
研究課題名（和文） Docetaxel 耐性口腔扁平上皮癌の樹立と耐性化機構の解析
研究課題名（英文） Analysis of the establishment and the resistance mechanism of the Docetaxel-resistant oral squamous cell carcinoma
研究代表者
高丸 菜都美（TAKAMARU NATSUMI）
徳島大学・病院・助教
研究者番号：40513031

研究成果の概要（和文）：当教室において樹立した培養ヒト口腔扁平上皮癌細胞株である B88 細胞と CAL27 細胞株(ATCC より購入)を用いた。本研究で使用する 癌細胞が DOC で細胞増殖が抑制されることを確認し、両細胞を DOC 1,10,100,1000pg/ml と順次、濃度をあげて培養し、DOC に耐性を示す細胞株を樹立する。両細胞は DOC の濃度をあげて処理し、親細胞より DOC 耐性を示す癌細胞は樹立しつつある。

研究成果の概要（英文）：We used B88 cell and CAL27 cell line which were the culture human oral squamous cell carcinoma cell line which we established in our classroom.

Cancer cells to use in this study confirmed that a cell proliferation was inhibited by DOC and we gave DOC 1,10,100,1000pg/ml and sequential level and cultured both cells and manufactured cell line indicating the resistance in DOC.

Both cells raise the density of DOC and treat it, and the cancer cells indicating the DOC resistance are establishing it than parent cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

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：耐性株

1. 研究開始当初の背景
 抗癌剤による化学療法の大きな問題点として、癌細胞の抗癌剤耐性の獲得がある。最近、抗癌剤耐性化の機序の解明やその耐性を予

測する因子、すなわちバイオマーカーの研究が注目されている。口腔扁平上皮癌においては、5-fluorouracil(5-FU)や cisplatin(CDDP)に対する抗癌剤耐性が、各々の 5-FU の代謝

関連酵素活性の異常や excision repair cross-complementation group 1 の発現上昇によって引き起こされることが報告されている(J Proteome Res.7: 4784-91, 2008, Int J Oncol. 36: 1277-84, 2010)。すなわち、5-FU や CDDP など古くから使用されている抗癌剤の耐性化の機序は少しずつ明らかにしている。しかし、開発からの期間が短い DOC は、口腔癌に対して高い抗腫瘍効果を示すことが報告されている(*Clin Cancer Res.* 15: 4228-4233, 2009)が、口腔癌の DOC に対する耐性化機構についてはほとんど報告がない。また、DOC に対して耐性を示す口腔癌細胞モデルも樹立されていない。そこで、申請者は、口腔癌に対する化学療法の治療効果を向上させるために、DOC に対する耐性化機構の解明に着目した。最近、薬剤耐性や癌の発生との関連が注目されている micro(mi)RNA は、18~25 塩基からなる低分子 RNA であり、標的 mRNA の 3' 非翻訳領域に結合し、タンパク質発現を制御している。すなわち、miRNA は mRNA を切断しないで翻訳を調節することで、mRNA 量は変化させず、タンパク質量のみを減少させる。よって、今までのように mRNA 発現だけを解析して生命現象を判断することが難しく、網羅的な遺伝子解析のみでは薬剤耐性化の機序の解明は不十分であると考えられる。最近、miRNA の発現異常と薬剤耐性あるいは癌の発生との関連が注目されているが、miRNA の機能に関しては依然解明されていないことが多い。また、癌から放出された miRNA は 1 滴の血液からでも測定が可能であるこ

とから、血液中の miRNA の測定が今後、癌の診断、感受性試験、予後の検討に有効な手段になると考えられる。以上のことより、DOC 耐性機序の本質を解明するためには mRNA だけでなく miRNA マイクロアレイ解析を行うことが必要であると考えられる。

DOC に対する耐性化では、乳癌細胞で、耐性化と ribophorin II の発現上昇が関与していると報告され(Nature Medicine 14: 939-948, 2008)、さらに Cytochrome P450 3A4 や β -tubulin の関与も報告されている(Cancer Sci. 97: 813-820, 2006)。一方で、抗癌剤耐性獲得には図 1 のような様々な因子が関わっていると考えられているが、口腔癌では DOC に対する耐性化機構の報告例がなく、その機序の解明には網羅的な解析が必要であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、口腔扁平上皮癌細胞を用いて、まず DOC 感受性の癌細胞から抵抗性の癌細胞を樹立する。両細胞間の mRNA と miRNA の発現変化を網羅的にマイクロアレイで解析し、耐性化に関わる標的遺伝子と miRNA を同定する。さらに、同定された遺伝子と miRNA が薬剤耐性のバイオマーカーになりうるか否かについて臨床サンプルを用いて検討する。また、同定された遺伝子と miRNA が、薬剤耐性を示す癌に対して感受性回復のために用いる核酸医薬の標的となることが期待される。したがって、本研究では、DOC 耐性化機構の解明に着目し、標的遺伝子と miRNA とその機能を明らかにすることを目

的とする。

3. 研究の方法

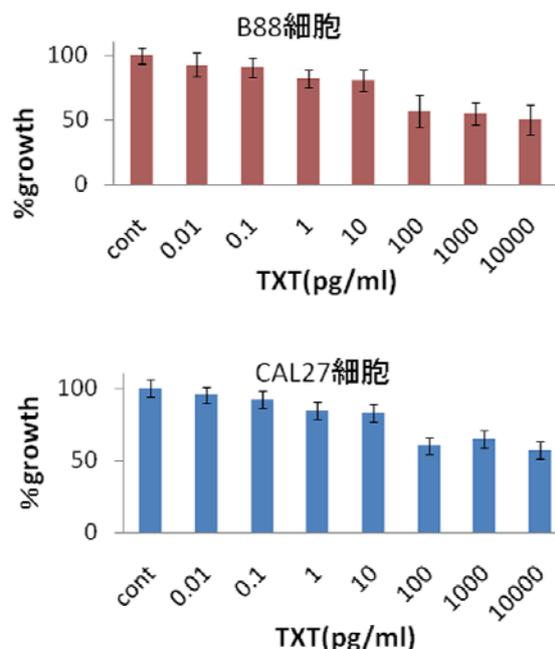
本研究においては図2のような計画で以下の項目を明らかにする。

- (1) ヒト口腔扁平上皮癌細胞を *in vitro* にて DOC で処理し、DOC 耐性癌細胞を樹立する。
- (2) DOC 耐性癌細胞の特性として、DOC 以外の抗癌剤 CDDP、5-FU, peplomycin(PEP), bleomycin (BLM) に対して交差耐性を示すかを明らかにする。
- (3) DOC 感受性癌細胞と耐性癌細胞を用いて、mRNA と miRNA の網羅的にマイクロアレイ解析から DOC 耐性に関与している標的遺伝子と miRNA を同定する。
- (4) (3) で発見した標的遺伝子と miRNA の発現を誘導あるいは抑制することによって、
 - (i) DOC 耐性が解除され、DOC に対する感受性が回復するか *in vitro* で確認し、
 - (ii) 癌細胞を移植したヌードマウスを用いて *in vivo* で同様に確認する。
- (5) DOC 感受性あるいは抵抗性を示したヒト口腔癌組織を用いて、両組織間での標的遺伝子と miRNA の発現比較を行い、DOC 抵抗性との関連性について検討する。

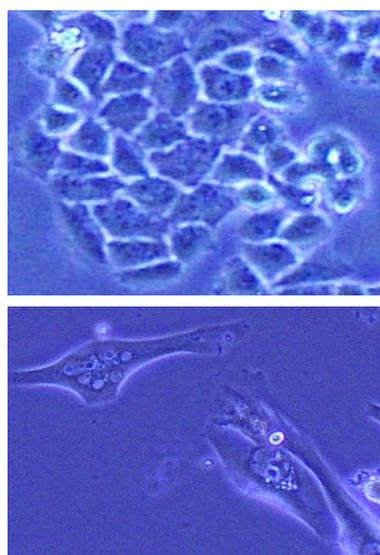
4. 研究成果

本研究には当教室において樹立した培養ヒト口腔扁平上皮癌細胞株である B88 細胞と CAL27 細胞株 (ATCC より購入) を用いた。本研究で使用する癌細胞が DOC で細胞増殖が抑制されることは確認していた(図1)。図1のような結果より、両細胞を DOC 50, 75, 100, 125 ng/ml と順次、濃度をあげて培養し、DOC 耐性の細胞株を樹立した。すでに両細

胞は DOC の濃度をあげて処理し、親細胞より DOC 耐性を示す癌細胞は樹立できた。両 *in vitro* での DOC の細胞増殖は MTT assay を用いて検討した。MTT assay による生細胞数は micirplate reader Model 550 (Bio Rad) を用いて 540 nm の吸光度で測定した。



1 ng/ml で半年間培養した細胞で、親株と比較し、耐性を示す傾向を得、明らかな細胞形態の変化も観察された (上: 親株, 下: 耐性株)。



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0件)

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高丸 菜都美 (TAKAMARU NATSUMI)

徳島大学・病院・助教

研究者番号：40513031

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：