

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25462912

研究課題名(和文) PTP4A1の抗癌剤耐性分子メカニズムの解明と新たな内因性耐性遺伝子の同定

研究課題名(英文) Analysis of cisplatin resistance of PTP4A1 and identification of new endogenous resistance gene to cisplatin

研究代表者

北村 哲也 (Kitamura, Tetsuya)

北海道大学・歯学研究科・助教

研究者番号：00451451

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、口腔癌によく用いられる抗癌剤シスプラチンの効果を事前に予測するため、耐性遺伝子の検索を行ってきた。今回新たに樹立したシスプラチン耐性株と感受性株を用いて以下の実験を行った。PTP4A1は以前に同定した耐性遺伝子であるが、今回樹立した耐性株および感受性株のPTP4A1 mRNAの発現に有意な差は認められなかった。

またJNK阻害剤は耐性株特異的に殺細胞効果を示し、耐性株では感受性株に比べJNKの活性が非常に高かった。このことからJNKの活性化が、シスプラチン耐性に関与している可能性が考えられ、またJNK阻害剤を併用すると耐性癌でも効果を期待できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have explored cisplatin resistance genes to predict the efficacy of chemotherapy for oral cancer. In this experiments we established resistance and sensitive cell lines. Since PTP4A1 has been identified as resistance gene before by us, we analyzed PTP4A1 mRNA expression in both cell lines. But there was no difference between resistance and sensitive cell lines. We found JNK inhibitor caused cell death especially in resistance cell lines. JNK activity was more increased in resistance cell lines compared to sensitive. These results indicated JNK activity was related to cisplatin resistance and combination of cisplatin and JNK inhibitor can eliminate cancer tissue which have tolerance to cisplatin.

研究分野：口腔病理学

キーワード：シスプラチン耐性

## 1. 研究開始当初の背景

口腔は咀嚼、嚥下、発音、構音など日常生活を営む上で非常に重要な器官であることから、口腔に癌が発生するとその機能に重大な支障を引き起こす。口腔癌は根治性の観点から広範囲な外科的切除が標準治療とされ、口腔機能のみならず審美性にも少なからず影響を及ぼす。近年では、化学療法を行い癌を縮小あるいは消失させて口腔の機能温存を期待する放射線化学療法を併用する症例が増加している。シスプラチンは口腔扁平上皮癌に対する抗癌剤として広く使用されている抗癌剤であるが、シスプラチンに抵抗性を示す癌が存在し、期待した効果を得られない場合も少なくない。その効果を化学療法前に予測することは難しく、その予測が可能であれば抗癌剤による治療の可否を決定できる。我々は、術前に化学療法の予測を可能とすることを目的とし、スプラチン耐性遺伝子の検索を行ってきた。

抗癌剤には2種類存在することが知られている。一つは獲得性耐性遺伝子で、癌細胞が抗癌剤に晒されたときに反応性に発現が上昇する遺伝子である。もう一方は内因性耐性遺伝子で、癌細胞内で本質的に発現が高く、それによって耐性に寄与する遺伝子である。これまで行われてきた耐性研究は、培養細胞に抗癌剤を暴露させ耐性株として樹立し、親株との遺伝子発現を比較検討する研究がほとんどである。このような研究は獲得性耐性遺伝子をターゲットにした研究であり、同定された遺伝子群は、抗癌剤に晒されていない腫瘍では発現が低いと考えられることから、化学療法前にその効果を予測するには不適切である。そこで我々は内因性耐性遺伝子のみを同定できる方法を考え、これまでに幾つかの耐性遺伝子を同定してきた。その方法とは、口腔癌細胞株 HSC-3 細胞からシングル・セルクローニング法を用いて数種類の細胞株を樹立し、それぞれのシスプラチン抵抗性を調べる方法である。実際樹立された細胞株間でシスプラチン抵抗性は異なり、耐性細胞株と感受性細胞株を得ることが出来た。これらと比較検討し、我々は PTP41 とオステオポンチンを耐性遺伝子として同定した。

## 2. 研究の目的

### (1) 細胞株の樹立

以前、我々が用いた細胞株は HSC-3 細胞のみから検索し、上記耐性遺伝子を同定したが、口腔癌普遍的な耐性遺伝子かどうかは不明なままであった。また上記2つの遺伝子を含め計400の遺伝子が候補となったが、そこから絞り込むのが困難であった。そこで、他の口腔癌細胞株を用いて耐性株と感受性株を樹立し、同様の検索を行い重複する遺伝子を検索すれば、さらに信頼できる口腔癌普遍的な遺伝子を検索できると考えた。そこで、口腔癌細胞株 HSC-4 を用いてシングル・セルクローニングクローニングを行い耐性株

と感受性株を樹立することを目的とした。

### (2) オステオポンチンの臨床的検討

以前に耐性遺伝子として同定したオステオポンチンの組織内発現とシスプラチン抵抗性との関連について検討し、実際にオステオポンチンがシスプラチン耐性の予測因子となりうるか検討した。

### (3) PTP4A1 の生物学的機能の検討

以前に耐性遺伝子として同定した PTP4A1 はその機能が殆ど知られておらず、実際どのようにシスプラチン抵抗性に関与するのか知られていない。そこで PTP4A1 について分子生物学的に検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) シングル・セルクローニング

口腔癌細胞株 SAS 細胞を 10cm ディッシュに 1000 個播種した。数日培養後に更に 1/10 に希釈し 1 週間培養した。各コロニーにコロニーリングを設置し、96well plate に播種した。その後培養を継続し細胞株を樹立した。

### (2) MTS assay

96well plate に細胞を 3000 個播種し、24 時間後にシスプラチン (Phizer 株式会社, Japan) を 0, 0.3, 0.5, 1.2, 2.5, 5.0, 10.0, 20.0 $\mu$ g/ml の濃度で 48 時間作用させた。CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay kit (Promega) を用いて MTS assay を行った。

### (3) Western blotting 法

培養細胞は PBS で洗浄後 NP-40 Lysis Buffer (150 mM NaCl, 1% NP-40, 50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 50 mM NaF, 5 mM  $\beta$ -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 gel electrophoresis (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 JNK (Cell Signaling Technology), 抗 p-JNK (Cell Signaling Technology) を, 二次抗体には HRP 標識抗マウス 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。

### (4) リアルタイム RT-PCR 法

培養細胞あるいは腫瘍組織から RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて total RNA を抽出し, 逆転写酵素 (Toyobo, Japan) を用いて cDNA を合成した。

リアルタイム PCR は, SYBR<sup>®</sup>Green Real time PCR Master Mix-plus (Toyobo, Japan) を用い, C1000<sup>™</sup> Thermal Cycler (BIO RAD, CA) にて増幅産物を定量および解析を行った。内部標準には GAPDH を用い, その相対比を比較検討し

た。

#### (5) 症例

恵佑会札幌病院歯科口腔外科を受診した顎口腔扁平上皮癌一次例に対し、シスプラチンを用いた動注化学療法または静注化学療法に放射線を同時併用した化学放射線同時療法(Concomitant Chemoradiotherapy：以下、動注例はIA CCRT、静注例はIV CCRTと略)を施行し、生検組織にて遺伝子検索が可能であった37症例を対象とした。CCRTのプロトコールは放射線照射療法(1回1.8~2.5 Gy、週4~5回)と、シスプラチン化学療法(IA CCRTの場合は1回40~100mg/m<sup>2</sup>、週1回、IV CCRTの場合は1回5mg/m<sup>2</sup>、週5日)を同時に行い、これらを4週にわたって行った。原則として放射線総量が40Gy前後に到達した時点でRECISTガイドラインに準じて原発巣を評価した。完全奏効と判断された症例はさらに2週間CCRTを追加した(IV CCRTの場合は放射線療法のみ)。CCRTを完遂した後再びRECISTガイドラインに準じて原発巣を評価し、完全奏効と判断された症例は経過観察を行った。化学療法はシスプラチンのみを使用し、他の薬剤との併用は行わなかった。またRECISTガイドラインに準じた評価で部分奏効、進行、安定と判断された症例は外科的切除に移行した。本研究では原発巣に対するCCRTの効果を検討した。放射線量、シスプラチン総投与量の如何に関わらず、外科的切除された組織で病理組織学的に癌が認められなかった症例と、経過観察中に原発巣に再発を認められない症例を著効群とし、外科的切除された組織に病理組織学的に癌を認めた症例及び、経過観察中に再発を認めた症例を無効群とした。

### 4. 研究成果

#### (1) 細胞株の樹立

口腔癌細胞株SAS細胞からシングル・セルクローニングを行い21種類の細胞株を樹立した。それらの細胞株のシスプラチン耐性を調べるため、様々な濃度のシスプラチンを48時間作用させMTS assayを行った。その結果、細胞株間でそれぞれシスプラチン抵抗性は異なった(図1、代表的な4つの細胞株を示す)。SAS-1, 4を耐性株、SAS-5, 20を感受性株とした。

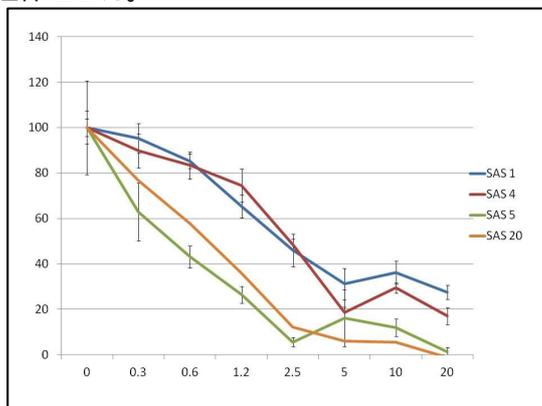


図1.各種細胞株のシスプラチン抵抗性SAS-1, 4を耐性株、SAS-5, 20を感受性株とした。

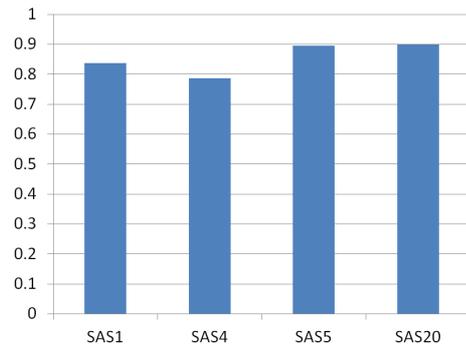


図2.各種細胞株におけるPTP4A1 mRNA発現量をリアルタイムPCRにて検討したが、有意な差は認められなかった。

これらの細胞株を用いてPTP4A1 mRNAの発現を検討した。しかしそれぞれの細胞株でのPTP4A1の発現量に有意な差は認められなかった(図2)。

次に、これらの細胞株を用いて、各種阻害剤を用いて実験を行った。JNK阻害剤、MEK阻害剤、NF-kB阻害剤、Rapamycin、AKT阻害剤、EGFR阻害剤を用いて実験を行ったところ、JNK阻害剤のみが、感受性株に比べ耐性株に対して特異的に殺細胞効果を示した(図3)。

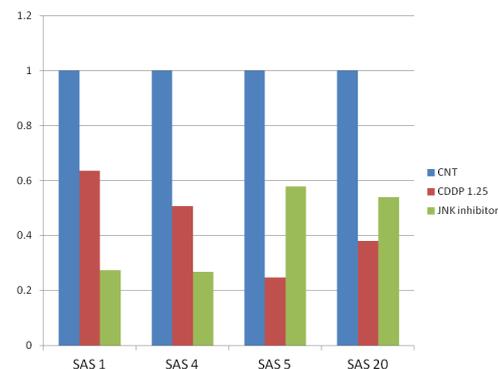


図3. JNK阻害剤は感受性株SAS-5,20に比べ、耐性細胞株SAS-1,4で殺細胞効果を示した。

JNK阻害剤がシスプラチン耐性と関連がみられたため、耐性細胞および感受性細胞のJNKの活性化をウェスタンブロッティングにて検索した。その結果、耐性細胞株SAS-4は感受性細胞株SAS-5はJNKの活性が高かった。これらの結果はJNKの活性化がシスプラチン

抵抗性と関連し、その活性を阻害すればシスプラチン抵抗性を減弱する可能性が示された。

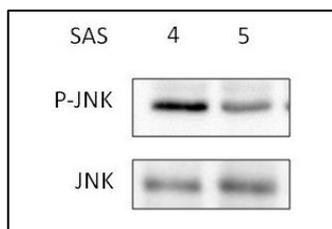


図4. 耐性細胞 (SAS-4) は感受性株細胞 (SAS-5) に比べ JNK の活性が高かった

### (2) オステオポンチンの組織内発現とシスプラチン抵抗性との関連について検討

我々は以前にシスプラチン耐性遺伝子としてオステオポンチン遺伝子を同定した。そこで、実際に扁平上皮癌患者の生検組織から mRNA を抽出し、オステオポンチンの発現とシスプラチン感受性の関連性について検討を行った。全 37 症例のオステオポンチン発現量は 0.15~5.66 で、ROC 曲線解析より、カットオフ値を 1.54 と設定した。オステオポンチン mRNA 発現量がカットオフ値以下の症例をオステオポンチン低発現群 (n=27) カットオフ値以上の症例をオステオポンチン高発現群 (n=10) とした。CCRT によって癌が消失した症例はすべてオステオポンチン低発現群に属し、オステオポンチン高発現群はすべて無効群に属した。それぞれの臨床項目に対し統計処理を行ったところ、オステオポンチン高発現群では低発現群に比べ、有意に CCRT が奏効しないことが明らかとなった(表 1)。

|                      | OPN low expression | OPN high expression | p value |
|----------------------|--------------------|---------------------|---------|
| Age median (yr)      | 61.7               | 63                  | 0.453   |
| (range)              | 29~74              | 26~83               |         |
| Gender Male          | 25                 | 5                   | 0.009   |
| Female               | 2                  | 5                   |         |
| Region Buccal mucosa | 2                  | 2                   | 0.676   |
| Floor of the mouth   | 1                  | 0                   |         |
| Lower gingiva        | 3                  | 1                   |         |
| Maxillary sinus      | 1                  | 0                   |         |
| Oropharynx           | 3                  | 0                   |         |
| Tongue               | 11                 | 3                   |         |
| Upper gingiva        | 6                  | 4                   |         |
| stage II             | 3                  | 2                   | >0.9999 |
| III                  | 3                  | 0                   |         |
| IV                   | 21                 | 8                   |         |
| T 2                  | 8                  | 2                   | 0.473   |
| 3                    | 2                  | 0                   |         |
| 4                    | 17                 | 8                   |         |
| N 0                  | 9                  | 5                   | 0.073   |
| 1                    | 4                  | 1                   |         |
| 2a,b,c               | 14                 | 4                   |         |
| CCRT responsibility  |                    |                     |         |
| CR                   | 14                 | 0                   | 0.006   |
| non-CR               | 13                 | 10                  |         |

表1. オステオポンチン mRNA 高発現と低発現群の比較  
オステオポンチン mRNA 発現は、CCRT の効果及び性差とに有意な相関がみられた

### (3) PTP4A1 の生物学的機能の検討

これまでに PTP4A1 を遺伝子導入した細胞はシスプラチンに抵抗性を示し、siRNA での発現を減少させた細胞ではシスプラチン

感受性が上昇することを示してきた。今回 PTP4A1 を遺伝子導入した SAS 細胞は、コントロール細胞に比べ、増殖活性が上昇することが明らかになった。これは PTP4A1 高発現腫瘍が多角的に悪性化に関与していることが示唆された(図 5)。

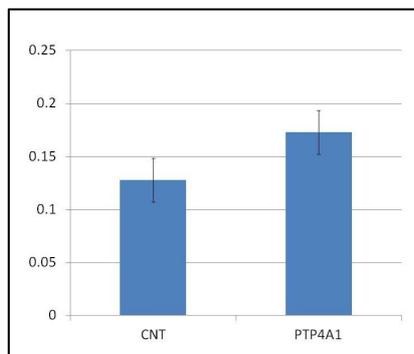


図5. PTP4A1 導入細胞では細胞の増殖活性が上昇した。

## 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)

Kitamura T., Higashino F., Yanagawa-Matsuda A., Ueda M., Kashiwao K., Okada T., Ohiro Y., and Shindoh M., Identification of marker genes required to predict oral cancer cells with intrinsic resistance to cisplatin., 査読有、Oncology Letters 2017 in press.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5103919/>

Habiba U, Hida K, Kitamura T, Matsuda AY, Higashino F, Ito YM, Ohiro Y, Totsuka Y, Shindoh M., ALDH1 and podoplanin expression patterns predict the risk of malignant transformation in oral leukoplakia., 査読有、Oncol Lett. 2017 Jan;13(1):321-328.  
doi: 10.3892/ol.2016.5379.

Habiba U, Kitamura T, Yanagawa-Matsuda A, Higashino F, Hida K, Totsuka Y, Shindoh M., HuR and podoplanin expression is associated with a high risk of malignant transformation in patients with oral preneoplastic lesions., 査読有、Oncol Lett. 2016 Nov;12(5):3199-3207. Epub 2016 Aug 29.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5103919/>

Kajita M, Sugimura K, Ohoka A, Burden J, Sukanuma H, Ikegawa M, Shimada T, Kitamura T, Shindoh M, Ishikawa S, Yamamoto S, Saitoh S, Yako Y, Takahashi R, Okajima T, Kikuta J, Maijima Y, Ishii M, Tada M,

Fujita Y., Filamin acts as a key regulator in epithelial defence against transformed cells.

査読有、Nat Commun. 2014 Jul 31;5:4428. doi: 10.1038/ncomms5428.

Habiba U, Kitamura T, Yanagawa-Matsuda A, Hida K, Higashino F, Ohiro Y, Totsuka Y, Shindoh M., Cytoplasmic expression of HuR may be a valuable diagnostic tool for determining the potential for malignant transformation of oral verrucous borderline lesions.,

Oncol Rep. 2014 Apr;31(4):1547-54. doi: 10.3892/or.2014.3017.

Imamachi K, Higashino F, Kitamura T, Kakuguchi W, Yanagawa-Matsuda A, Ishikawa M, Kitagawa Y, Totsuka Y, Shindoh M., pp32r1 controls the decay of the RNA-binding protein HuR., 査読有、Oncol Rep. 2014 Mar;31(3):1103-8.

doi: 10.3892/or.2013.2956.

Nagamine K, Kitamura T, Yanagawa-Matsuda A, Ohiro Y, Tei K, Hida K, Higashino F, Totsuka Y, Shindoh M., Expression of parathyroid hormone-related protein confers malignant potential to mucoepidermoid carcinoma., 査読有、Oncol Rep. 2013 Jun;29(6):2114-8. doi: 10.3892/or.2013.2393. Epub 2013 Apr 8.

〔学会発表〕(計 8 件)

Tetsuya Kitamura, Keita Kashiwao, Tomoyuki Okada, Aya Yanagana-Matsuda, Michihiro Ueda, Fumihiro Higashino, Masanobu Shindoh, Predicting the chemo-sensitivity for cisplatin in oral squamous cell carcinoma, American Association for Dental Research, 2016年3月15日~19日、Los angeles convention center, Los Angeles, (America)

東野史裕、三河洋平、北村哲也、松田彩、鄭朱蒙、進藤正信、mRNA安定化機構を利用した腫瘍溶解アデノウイルス、第74回日本がん学会学術総会、2015年10月10日、名古屋国際会議場(愛知県、名古屋市)

松田彩、北村哲也、東野史裕、黒嶋雄志、鄭朱蒙、ウンマハビバ、進藤正信、アデノウイルス感染によるHuRの挙動はウイルス複製と関連する、第104回日本病理学会、2015年5月2日、名古屋国際会議場(愛知県、名古屋市)

Tetsuya Kitamura, Keita Kashiwao, Tomoyuki Okada, Aya Yanagana-Matsuda, Fumihiro Higashino, Masanobu Shindoh, Identification of intrinsic cisplatin resistance genes, 92th International Association for Dental Research, 2014年06月29日、Cape town (South africa)

北村哲也、松田彩、東野史裕、進藤正信、5

型アデノウイルスによるStress granules 形成阻害、第68回NPO法人日本口腔科学会学術集会、2014年05月09日、京王プラザホテル(東京都、新宿区)

北村哲也、松田彩、鄭朱蒙 パトリック、東野史裕、進藤正信、アデノウイルスによる宿主細胞のストレス応答機構の制御、第103回日本病理学会、2014年04月25日、広島国際会議場(広島県、広島市)

北村哲也、松田彩、柳川彩、Umma Habiba、黒嶋雄志、東野史裕、進藤正信、アデノウイルス感染によるStress granules 形成阻害、臨床口腔病理学会、2013年08月30日、日本大学歯学部(東京都、千代田区)

北村哲也、松田彩、岡田知之、柏尾啓太、大廣洋一、上田倫弘、東野史裕、進藤正信、口腔がんにおけるシスプラチン内因性耐性遺伝子の検索、日本口腔科学会、2013年05月24日、栃木県総合文化センター(栃木県、宇都宮市)

〔図書〕(計1件)

北村哲也、医学書院、検査と臨床、2016、3

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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：0045451

### (2) 研究分担者

東野史裕 (HIGASHINO, Fumihiro)  
北海道大学大学院・歯学研究科・准教授  
研究者番号：50301891

松田彩 (MATSUDA, Aya)  
北海道大学大学院・歯学研究科・特別研究員  
研究者番号：60514312

### (3) 研究協力者

上田倫弘 (UEDA, Michihiro)  
北海道がんセンター