

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463123

研究課題名(和文) 難治性口腔癌に対するヘッジホッグシグナルを応用した治療戦略

研究課題名(英文) Chemotherapeutic strategy for recurrence of oral cancer inhibiting Hedgehog signaling

研究代表者

野口 一馬 (Noguchi, Kazuma)

兵庫医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50309473

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)：本研究の目的は幹細胞性の維持と薬剤耐性に関する口腔扁平上皮癌の腫瘍内微小環境における関与と抗腫剤耐性を解明する事である。まず口腔癌の治療で頻用されるシスプラチンを培養細胞中に添加してシスプラチン耐性細胞を作成した。耐性細胞の多くがATP7Bの過剰発現による耐性獲得であったが、OSC-19耐性細胞はATP7Bの関与はなかった。より詳細な観察から癌化・幹細胞の維持に関するHippo pathwayの耐性細胞内でのYAPの高発現と核内移行が確認できた。またsiRNA処理によりシスプラチンの感受性が回復したことからOSC-19のシスプラチン耐性獲得にはHippo pathwayの関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Although CDDP are used widely to treat oral squamous cell carcinoma (OSCC), many patients display acquired resistance. We investigated the correlation between YAP expression and the sensitivity to CDDP. At first, we established three CDDP resistant cell lines, and examined the expression levels of ATP7B, which are typically considered as the mechanism of CDDP resistance, and Hippo pathway related protein. We examined immunocytochemically the cellular localization of YAP. Expression levels of YAP were no significant difference between parental and resistant cell, but expression level of phosphorylated YAP of resistant cells was clearly decreased. Furthermore, translocation from cytoplasm to nucleus of YAP were observed compared with parental cells. In addition, using siRNA treatment, we analyzed the change of sensitivity to CDDP. By knockdown of YAP using siRNA, sensitivity of CDDP was significantly increased. We concluded that YAP overexpression is correlated with CDDP resistance.

研究分野：口腔腫瘍学

キーワード：口腔癌 がん化学療法 シスプラチン 獲得耐性 ヒッポシグナル YAP

## 1. 研究開始当初の背景

(1)本研究の目的は幹細胞性の維持と薬物運搬に関与するヘッジホッグシグナル伝達系の口腔扁平上皮癌の抗癌剤耐性機構と腫瘍内微小環境における関与を解明することである。抗癌剤耐性克服はがん化学療法において非常に重要であり、シスプラチンと分子標的薬であるセツキシマブの耐性細胞を作成し、ヘッジホッグシグナルの関与と耐性克服を検討する。

(2)さらに臨床検体を用いた口腔扁平上皮癌組織内における Hh シグナルの関与、特に Gli の発現と Y-K 分類・分化度・組織内浸潤の程度を解析する。

## 2. 研究の目的

(1) 癌化学療法は外科療法、放射線療法と並び、癌治療における重要な位置を占める。癌化学療法は局所の癌のみならず、全身性・転移性のがんにも効果を発揮するが、その治療成績はまだ十分とは言えない。その原因として組織を構成する癌細胞の不均一性により抗癌剤に対する感受性が異なるため、同じ血中濃度あるいは組織内濃度が得られていても抗癌剤の効果にばらつきが生じ、結果として再発に至る。抗癌剤の治療成績を向上させるには、薬剤応答および抗腫瘍効果発現の過程における多様性がどのような要因に基づくかを明らかにし、その機序に基づいた薬剤の使用が必要である。このような現状の中で、抗癌剤に対する腫瘍細胞の耐性化の研究は薬剤輸送に関与する ABC トランスポーターの発現や DNA 損傷を修復する遺伝子活性など、それぞれのチェックポイントでの耐性機構の解析は進んでいるが、耐性化の克服には至っていない。

(2) シスプラチン(以下 CDDP)は口腔扁平上皮癌に対する key drug として頻用されているが、耐性の獲得が問題視される。そこで、口腔扁平上皮癌細胞株を用いて CDDP 耐性細胞を作成後、組織の大きさを制御する Hippo

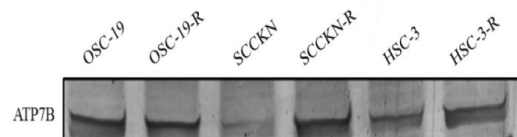
pathway に着目し、その中心を担う YAP 発現と CDDP 耐性との関連について解析した。

## 3. 研究の方法

口腔扁平上皮癌細胞株 SCCKN、OSC-19、HSC-3 について CDDP 耐性細胞株を樹立した。樹立した CDDP 耐性細胞は親株と比較して 5 倍以上の耐性度があることを確認し、以下の検討を行った。Hippo pathway の関与が考えられた OSC-19 について、遺伝子発現を Western Blot 法と免疫蛍光染色を用いて解析した。さらに YAP の siRNA である siYAP を CDDP 耐性細胞内に導入し CDDP 感受性の変化を検討した。

## 4. 研究成果

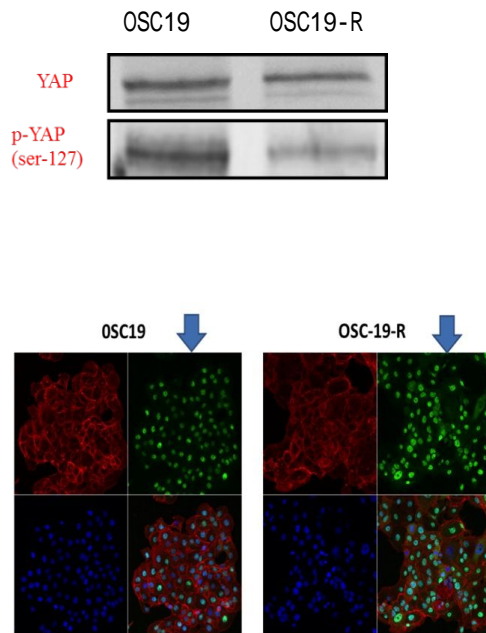
(1) SCCKN と HSC-3 に由来する CDDP 耐性細胞 (SCCKN-R、HSC-3-R) では、既に耐性機序として知られる薬剤排出に関与する ABC transporter である ATP7B の高発現を認めた。しかしながら OSC-19 の CDDP 耐性細胞は ATP7B の発現は確認できなかった。



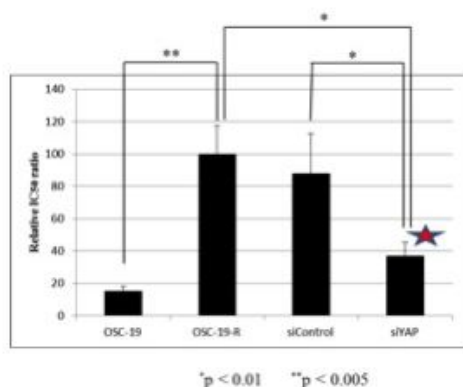
(2) OSC-19 由来の CDDP 耐性細胞 (OSC-19-R) では、親株と比較しやや大きい細胞が多く確認でき、Hippo pathway の関与が示唆された。同時にヘッジホッグシグナルの異常を検討したが、異常は確認できなかった。そこで、OSC-19 由来の耐性細胞 (OSC-19-R) について Hippo pathway を詳細に検討することとした。

(3)そこで OSC-19 および OSC-19-R おいて YAP 発現を Western Blot 法を用いて検討した

結果、有意差を認めなかったが、OSC-19-Rにおいてphospho-YAP発現が著明に低下していた。さらに核内にYAPが移行していることが示唆された。さらに免疫蛍光染色においても、OSC-19-RでYAPが核内に高発現していた



(4) さらにYAPのsiRNAであるsiYAPをCDDP耐性細胞内に導入しCDDP感受性の変化を検討した結果、CDDP感受性は親株と動揺ではないものの、感受性が改善した。



## 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 5件)

Yoshikawa K, Noguchi K, Nakano Y,

Hashimoto-Tamaoki T and Kishimoto H. The Hippo Pathway transcriptional co-activator, YAP, confers resistance to cisplatin in human oral squamous cell carcinoma. International Journal of Oncology 査読有 46(6):2364-70,2015  
DOI: 10.3892/ijo.2015.2948

吉川恭平、野口一馬、山村倫世、頭司雄介、高岡一樹、岸本裕充  
シスプラチン耐性口腔扁平上皮癌におけるHippo pathwayの関与の検討  
日本口腔組織培養学会誌 査読有 24:13-14, 2015

Takaoka K, Hidaka S, Hashitani S, Segawa E, Yamamura M, Tanaka N, Zushi Y, Noguchi K, Kishimoto H, Urade M. Effect of a nitric oxide inhibitor and a CXC chemokine receptor-4 antagonist on tumor growth and metastasis in xenotransplanted mouse model of adenoid cystic carcinoma of the oral floor. International Journal of Oncology 査読有 43(3) 737-45, 2013

Yamamura M, Noguchi K, Nakano Y, Segawa E, Takaoka K, Kishimoto H, Hashimoto-Tamaoki T, Urade M. Functional analysis of Zyxin in cell migration and invasive potential of oral squamous cell carcinoma cells. International Journal of Oncology 査読有 42(3) 873-80, 2013.

野口一馬、中野芳朗、山村倫世、吉川恭平、浦出雅裕、岸本裕充 角化嚢胞性歯原性腫瘍細胞株の樹立と病態モデル作製の試み 口腔組織培養学会誌 査読有 22(2):27-34, 2013

[学会発表](計 6件)

野口一馬、岸本裕充

口腔外科疾患における Hedgehog 関連遺伝子の異常- 角化嚢胞性歯原性腫瘍と Greig 頭蓋多合指趾症候群について-

第 52 回日本口腔組織培養学会 2015.11.21  
徳島大学長井記念ホール(徳島)

Noguchi K, Kishimoto H,  
Tamaoki-Hashimoto T, Nakano Y.  
In vitro differentiation from  
keratocystic odontogenic tumor.  
EMBO Meeting, Developmental Cell  
Conference (国際学会) 2015.9.5-8 パー  
ミンガム(英国)

Moridera K, Noguchi K, Takaoka K, Kawabe  
M, Kishimoto H.  
Retrospective clinical analysis of  
salivary gland carcinoma  
第 39 回日本頭頸部癌学会・第 4 回アジア頭  
頸部癌学会(国際学会)2015.6.4-5 神戸国  
際会議場(神戸)

野口一馬、首藤敦史、吉川恭平、西田倫世、  
頭司雄介、森寺邦康、高岡一樹、岸本裕充  
角化嚢胞性歯原性腫瘍培養細胞の細胞生物  
学的特性  
第 69 回日本口腔科学会学術集会  
2015.5.15-16 大阪国際会議場(大阪)

吉川恭平、野口一馬、山村倫世、頭司雄介、  
高岡一樹、岸本裕充  
シスプラチン耐性口腔扁平上皮癌における  
Hippo pathway の関与の検討  
日本口腔組織培養学会 2014.11.15 九州歯  
科大学記念講堂(福岡)

野口一馬、頭司雄介、吉川恭平、山村倫世、  
吉岡 済、浦出雅裕、岸本裕充  
日本口腔組織培養学会設立 50 周年記念学術  
大会 シンポジウム「組織培養を用いた口腔

癌研究の最前線 -発がんから医療への応用  
- 「in vitro 発癌モデルを用いた口腔発癌に  
おけるドライバー変異の解明」平成 25 年 11  
月 23・24 日 日本歯科大学生命歯学部九段  
ホール(東京)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

野口 一馬 (NOGUCHI, Kazuma)  
兵庫医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：50309473

### (2) 研究分担者

岸本 裕充 (KISHIMOTO, Hiromitsu)  
兵庫医科大学・医学部・教授  
研究者番号：30291818

中野 芳朗 (NAKANO, Yoshiro)  
兵庫医科大学・医学部・教授  
研究者番号：30360267

浦出 雅裕 (URADE Masahiro)  
兵庫医科大学・医学部・特別招聘教授  
研究者番号：70104883

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：