

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861737

研究課題名(和文) アポトーシス関連因子IAPによる抗がん剤耐性機構の解明と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Elucidate the mechanism of anti-cancer drug resistance caused by inhibitor apoptosis protein(IAP) and development of novel therapeutic strategy

研究代表者

永田 将士(NAGATA, MASASHI)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師

研究者番号：10635791

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：われわれは口腔扁平上皮癌細胞株を用い5-FU耐性株を樹立し、アポトーシス阻害タンパクであるcIAP2の重要性を提示し、cIAP2の高発現が5-FUを用いた放射線化学療法感受性低下を生じ、予後不良となることを報告した。続いて、cIAP2発現調節メカニズムとしてmiR-30aの高発現とアポトーシス耐性の関連性を示した。また、細胞外基質であるFibronectinが、細胞表面のインテグリンレセプターと結合し抗がん剤耐性をもたらすことや、癌関連線維芽細胞および腫瘍関連マクロファージの放射線化学療法への治療効果との関係という細胞周囲環境の変化による耐性メカニズムを報告した。

研究成果の概要(英文)：We have reported the importance of cellular inhibitor of apoptosis 2 (cIAP2) using 5FU-resistant oral squamous cell carcinoma cell line, which we establish for 2 years 5FU treatment. We presented treatment-resistant and poor prognosis was due to cIAP2 high expression. To analyze of cIAP2 regulator, we found relevance of miR-30a overexpression and apoptosis inhibition. In addition, an overexpression of extracellular matrix molecule fibronectin activate of survival regulator and confers cell adhesion-mediated drug resistance against 5-FU. Furthermore, we reported tumour-associated macrophages (TAMs) are a potential biomarker for predicting the clinical response to 5-FU-based chemoradiotherapy, and the expression status of the cancer-associated fibroblasts and TAMs may be useful for making treatment decisions to improve the survival of OSCC patients.

研究分野：抗がん剤耐性

キーワード：抗がん剤耐性 アポトーシス 腫瘍周囲環境

1. 研究開始当初の背景

(1) 口腔癌の現状と薬剤耐性について

口腔扁平上皮癌 (OSCC) では、cisplatin (CDDP) を含む白金製剤と代謝拮抗剤である 5-FU 系抗がん剤が汎用されている。申請者は OSCC の抗がん剤耐性に関連する新規の分子を探索するために、2 年以上かけ 5-FU および CDDP 耐性 OSCC 細胞株を樹立した。その後、DNA マイクロアレイ解析の結果をもとに、アポトーシス阻害因子である cIAP2 に着目し、5-FU によるアポトーシスを阻害し、耐性を獲得していることを解明した。また、5-FU 系抗がん剤を使用した術前放射線化学療法を施行した OSCC 患者において、cIAP2 発現は治療効果と有意な相関を認め、cIAP2 高発現患者群は有意に予後不良であり、cIAP2 の発現は予後因子となりうることを報告した (Nagata et al. BJC 2011)。また、申請者は、樹立した 5-FU 耐性株および親株を用いた、CDDP 投与後の生存分析により、CDDP との交差耐性を確認している。これに加え、CDDP 耐性株を用いた解析においても cIAP2 が高発現しており、5-FU と同様にアポトーシス阻害を起こし、CDDP 耐性を誘導していることや、CDDP 投与患者群における予後不良因子となっていることを報告した (癌学会学術総会 2013 年)。これらのことから cIAP2 が多剤耐性の標的因子となる可能性を示した。

抗がん剤耐性を誘導する因子に関して、腫瘍のみでなく、その周囲環境にも着目し研究を進めることとした。

また、口腔癌治療において放射線療法の併用も多く認めることから放射線耐性のメカニズムに関する解析を行った。

2. 研究の目的

(1) アポトーシス阻害誘因メカニズムの検討 アポトーシス阻害因子の発現を調整する因子として microRNA の変化を確認する。

(2) OSCC の 5-FU 耐性獲得と細胞周期に関する検討

(3) 細胞周囲環境による抗がん剤耐性メカニズムの検討

(4) 細胞周囲環境による放射線耐性メカニズムの検討

3. 研究の方法

(1) 特定の miRNA による耐性メカニズムの解明にあたっては、OSCC 細胞株 SAS および Ca9-22 と、それらより樹立した 5-FU 耐性株 (SAS/FR2、Ca9-22/FR2) を用いて実験を行った。親株と耐性株による miRNA マイクロアレイ解析の結果、miR-30a が有意に発現上昇していたため、miR-30a の機能解析のための *in vitro* の研究を行った。具体的には、miR-30a の恒常的過剰発現株を樹立し、5-FU 感受性やアポトーシスの変化の解析、細胞周期解析、ルシフェラーゼアッセイによる

miR-30a の標的確認実験などを行った。

(2) 上記で使用した細胞株の 5-FU 投与時における細胞周期の変化を解析した。5-FU 投与後 24、48、72 時間後の細胞を Cell clock に暴露し細胞周期解析を行った。

(3) 口腔扁平上皮癌細胞株 (SAS、Ca9-22) と、それらを用い、当科で樹立した 5-FU 耐性株 (SAS/FR2、Ca9-22/FR2) を使用した。DNA マイクロアレイ解析による網羅的検索の結果、耐性株において発現増強のみられた fibronectin (FN) に注目し、Real-Time quantitative PCR (RT-qPCR)、Western blotting 法 (WB 法)、ELISA 法、FACS などの手法を用いて *in vitro* の解析を行った。

(4) 化学放射線療法に抵抗性もつ患者の生検組織において、腫瘍周囲間質において腫瘍関連マクロファージや腫瘍関連線維芽細胞の発現を確認し、予後との相関の有無を検討した

4. 研究成果

(1) miR-30a の発現増加時の 5-FU 耐性度を評価するために、親株である SAS および Ca9-22 に pmR-ZsGreen1 Vector に組み込んだ miR-30a を細胞導入し、miR-30a を安定的に高発現した SAS/st-30a および Ca9-22/st-30a を樹立した。

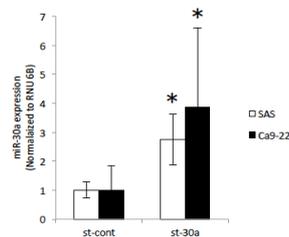


図 1. RT-qPCR による miR-30a の発現確認

in vitro での miR-30a の機能解析においては、miR-30a を恒常的に過剰発現させた細胞株では、5-FU 処理によって親株よりもアポトーシスに耐性を示し、また細胞周期解析において、G1 アレスト細胞の増加を認めた。

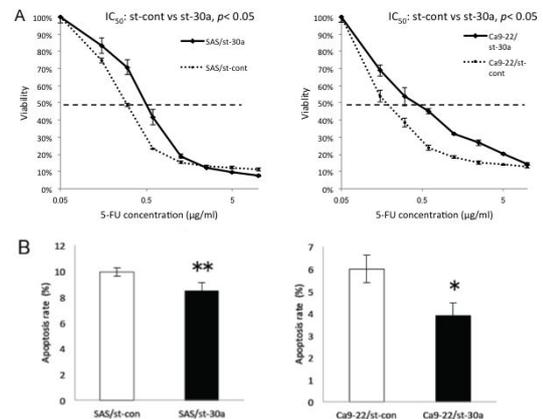


図 2 A: 両細胞間の 5-FU 感受性曲線
B: 5-FU 投与 72 時間後のアポトーシス測定

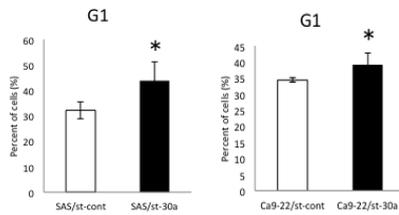


図3 miR-30aの恒常的発現細胞における細胞周期解析

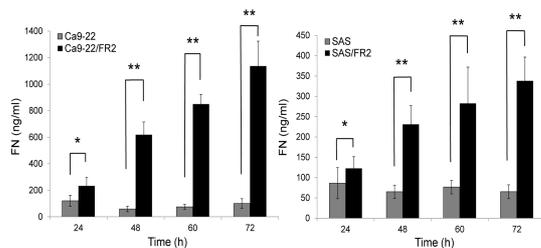
以上の結果は共同研究者の川原が報告している (Kawahara et al., J Oral Pathol Med 43(5), 2014)

(2) p53変異を認める細胞株であるSASでは、24時間で既にM期において5-FU添加時は細胞分裂が抑えられており、48時間においてM期にいかない細胞はS期に溜まっていた。

SASの5-FU耐性株では細胞周期の変化は生じていなかった。また、p53変異がないCa9-22では、5-FU投与によって細胞数の減少のみ認め、細胞周期には変化が生じていなかった。Ca9-22の5-FU耐性株においては、5-FU投与によって細胞周期のサイクルが早く廻っていた。これらの結果よりp53の機能が保存されているかによって耐性のメカニズムに違いが生じている可能性が示唆された。

以上の結果は現在論文執筆中である。

(3) 両細胞株において、DNAマイクロアレイの結果に基づき、FNの発現に関して、遺伝子レベル、タンパクレベルで耐性株におけるFNの上昇を確認した。さらに、細胞培養中のFN分泌量をELISA法にて確認したところ、経



時的に、両細胞株において有意にFN分泌量が耐性株で亢進しているのが確認された。

図4 OSCC細胞株および5-FU耐性株における経時的なFibronectin分泌測定

インテグリンの細胞膜上発現のサブユニット解析をFACSにて行ったところ、FNのレセプターとして機能する4、5、1サブユニットの量的分布に関しては有意差が認められなかった。次に、Non-coatとFN-coatのdish上で細胞を培養し、耐性度の変化を確認したところ、有意にFN-coatのdish上で培養した細胞の耐性度の上昇を認めた。

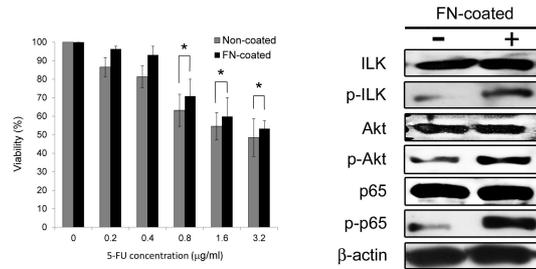
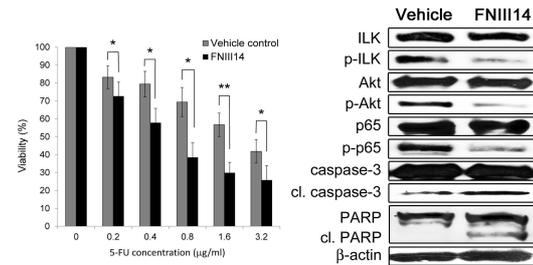


図5 FN-coatのDishで培養した細胞における5-FU感受性試験と細胞生存関連タンパクの発現解析

最後に、FNIII14にてFN-インテグリン接着阻害実験を行ったところ、FN-インテグリン接着によるILK/Akt/NF- κ Bシグナリングの細胞生存関連分子の阻害が確認され、有意な耐性度の低下を認めた。

図6 FN抑制細胞における5-FU感受性試験



と細胞生存関連タンパクの発現解析

以上の結果は共同研究者の中川が報告している (Nakagawa et al., IJO 44(4), 2014)

(4) 化学放射線療法に抵抗性を示すヒト舌癌組織検体では、癌細胞および間質にCD163陽性のリンパ球が高発現している症例を多く認め、腫瘍関連マクロファージ (TAMs) による治療抵抗性との関連が示唆された。また、SMAの免疫染色を行うと、腫瘍細胞周囲にSMA陽性の腫瘍関連線維芽細胞 (CAFs) を多く認めた。この2つに関して、相関を調べたところ、有意に正の相関関係を認めた。

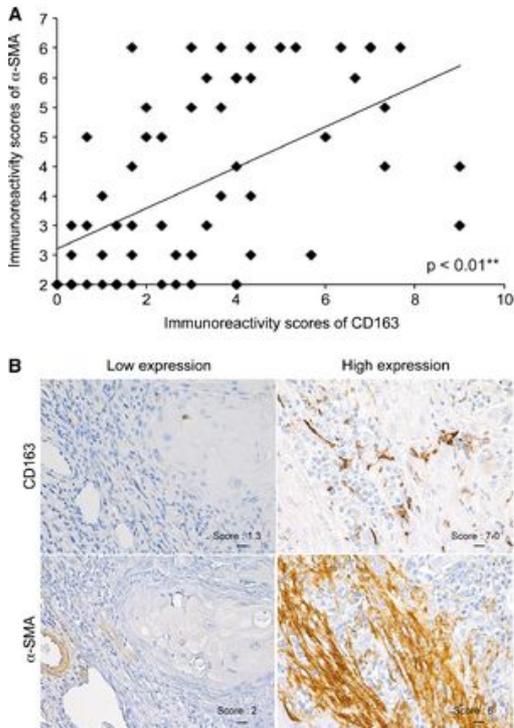


図7 OSCC組織におけるCAFとTAMsの発現とその相互関係

次に、放射線化学療法を施行した60例の患者群において、TAMsとCAFの発現と治療効果および予後の関連を解析した結果、CAFおよびTAMs高発現患者群は有意に予後不良であることが示された。

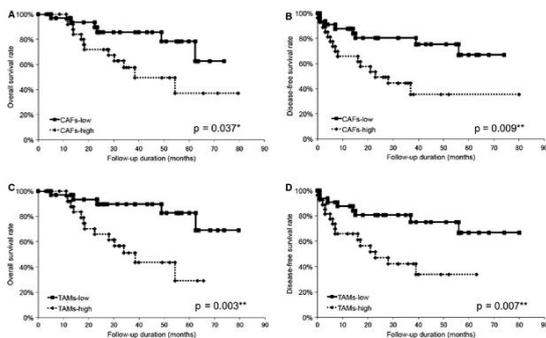


図8 TAMsおよびCAF発現別、全生存分析および無病生存分析

以上の結果は共同研究者の松岡が報告している(Matsuoka et al., IPMIS 123(3), 2015)

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. Matsuoka Y, Yoshida R, Nakayama H, Nagata M, Hirose A, Tanaka T, Kawahara K, Nakagawa Y, Sakata J, Arita H, Hiraki A, Shinohara M.

The tumour stromal features are associated with resistance to 5-FU-based chemoradiotherapy and a poor prognosis in patients with oral squamous cell carcinoma.

APMIS. 123(3):205-14 (2015)

2. Hikaru Nakashima, Yuichiro Matsuoka, Ryoji Yoshida, Masashi Nagata, Akiyuki Hirose, Kenta Kawahara, Jyunki Sakata, Hidetaka Arita, Akimitsu Hiraki and Hideki Nakayama

Pre-treatment neutrophil to lymphocyte ratio predicts the chemoradiotherapy outcome and survival in patients with oral squamous cell carcinoma

BMC Cancer 2016 Jan 26;16 (1):41

3. Yoshitake Y, Fukuma D, Yuno A, Hirayama M, Nakayama H, Tanaka T, Nagata M, Takamune

Y, Kawahara K, Nakagawa Y, Yoshida R, Hirose A, Ogi H, Hiraki A, Jono H, Hamada A, Yoshida K,

Nishimura Y, Nakamura Y, Shinohara M.

Phase II clinical trial of multiple peptide vaccination for advanced head and neck cancer patients revealed induction of immune responses and improved OS.

Clin Cancer Res. 21(2): 312-21 (2015)

4. Yoshida R*, Nakayama H, Nagata M, Hirose A, Tanaka T, Kawahara K, Nakagawa Y, Matsuoka Y, Sakata J, Arita H, Hiraki A, Shinohara M, Ito T.

Overexpression of nucleostemin contributes to an advanced malignant phenotype and a poor prognosis in oral squamous cell carcinoma.

Br J Cancer.;111(12):2308-15. (2014)

5. Nagata M, Yoshitake Y, Nakayama H, Yoshida R, Kawahara K, Nakagawa Y, Shinohara M.

Angiosarcoma of the oral cavity: a clinicopathological study and a review of the literature.

Int J Oral Maxillofac Surg.; 43(8):917-23.2. (2014)

6. Nakagawa Y, Nakayama H, Nagata M, Yoshida R, Kawahara K, Hirose A, Tanaka T, Yuno A, Matsuoka Y, Kojima T, Yoshitake Y, Hiraki A, Shinohara M.

Overexpression of fibronectin confers cell adhesion-mediated drug resistance (CAM-DR) against 5-FU in oral squamous cell carcinoma cells.

Int J Oncol.;44(4):1376-84. (2014)

7. Kawahara K, Nakayama H, Nagata M,

Yoshida R, Hirosue A, Tanaka T, Nakagawa Y, Matsuoka Y, Kojima T, Takamune Y, Yoshitake Y, Hiraki A, Shinohara M.
A low Dicer expression is associated with resistance to 5-FU-based chemoradiotherapy and a shorter overall survival in patients with oral squamous cell carcinoma.
J Oral Pathol Med.,43(5):350-6. (2014)

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 有田英生、平木昭光、川原健太、上村恭子、吉田遼司、永田将士、中山秀樹
口腔癌の化学放射線療法における唾液量の変化に関する臨床的検討-臨床的影響因子や放射線性粘膜炎との関連について-
第 60 回日本唾液腺学会総会並びに学術集会
2015 年 12 月 5 日
文教学院大学、東京、口演

2. 有田 英生、吉田 遼司、廣末 晃之、松岡 祐一郎、永田 将士、川原 健太、中川、純泰、坂田 純基、平木 昭光、篠原正徳、中山 秀樹
The clinical significance of FBXW7 in oral squamous cell carcinoma
第 74 回日本癌学会学術総会 2015 年 10 月 8-10 日
名古屋国際会議場、愛知、ポスター

3. 川原健太、吉田遼司、廣末晃之、田中拓也、永田将士、松岡祐一郎、湯野晃、有田英生、坂田純基、平木昭光、中山秀樹、篠原正徳
Radioresistance of metastatic tumor cells in oral squamous cell carcinoma
第 39 回日本頭頸部癌学会/第 4 回アジア頭頸部癌学会、2015 年 6 月 4-6 日
神戸国際会議場、兵庫、ポスター

4. 有田 英生、吉田 遼司、廣末 晃之、永田 将士、川原 健太、中川 純泰、松岡 祐一郎、坂田 純基、中山 秀樹、平木 昭光、篠原 正徳
口腔扁平上皮癌患者における FBXW7 の臨床的意義の検討
第 33 回日本口腔腫瘍学会・学術大会 2015 年 1 月 29-30 日
奈良県新公会堂、奈良、ポスター

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 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 0 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
永田 将士 (NAGATA Masashi)
熊本大学・医学部附属病院 歯科口腔外科
非常勤診療医師
研究者番号：10635791

(2)研究分担者 ()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：