

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：34519

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861760

研究課題名(和文) 口腔扁平上皮癌におけるシスプラチン耐性機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of acquired resistance mechanism to cisplatin in human oral squamous cell carcinoma

研究代表者

吉川 恭平 (Yoshikawa, Kyohei)

兵庫医科大学・医学部・研究生(研究員)

研究者番号：00727480

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、口腔扁平上皮癌における新たなシスプラチン耐性機構を解析することを目的とする。樹立したシスプラチン耐性口腔扁平上皮癌細胞のうち、YAPを中心とするHippo pathwayとの関連が示唆されたOSC-19では、親株と比較してYAPの核内移行が亢進していた。さらにsi-YAP処理によりYAP発現を抑制することで、シスプラチン感受性が増大した。これらの結果から、YAPがシスプラチン耐性克服の新たな治療標的となり得る可能性が見いだされた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to analyze a new mechanism of resistance to cisplatin in human oral squamous cell carcinoma. We established three cisplatin-resistant cell lines. In OSC-19 cell line, which is one of them, the relationship between YAP expression of hippo pathway and resistance to cisplatin were suggested. Compared with parental cells, translocation of YAP from the cytoplasm to the nucleus were enhanced in cisplatin-resistant cells. Knockdown of YAP using siRNAs revealed that sensitivity to cisplatin was significantly increased. From these results, YAP could be a new therapeutic target for overcoming the resistance to cisplatin.

研究分野：口腔癌

キーワード：シスプラチン感受性 ノックダウン

1. 研究開始当初の背景

(1) 頭頸部癌の約 90%は組織学的に扁平上皮癌であり、基本的に手術療法が根治的治療として選択されることが多い。しかし、最近では放射線療法と化学療法を併用する頻度が高まっており、局所進行頭頸部扁平上皮癌の制御率や機能温存率が向上してきている。しかし、その中でも依然として 20~30%に局所再発や遠隔転移が生じ、予後不良となる症例が存在する。その原因の一つとして、薬剤応答および抗腫瘍効果発現における多様性があり、この現象が治療抵抗性につながっている。

(2) シスプラチンに対する耐性化の研究は広く進められており、特に薬剤輸送に関与する ABC トランスポーターの高発現や、DNA 損傷を修復する遺伝子活性、また重金属解毒系の亢進といった、さまざまな解析がなされているが、耐性化の克服には至っていないのが現状である。

(3) 近年では、自己複製能や腫瘍形成能を持つ癌幹細胞の存在が盛んに研究されており、乳癌においては上皮間葉転換 (epithelial to mesenchymal transition: EMT) が癌幹細胞様の性質獲得に重要であることが知られている。また、EMT と癌幹細胞の関わりとして Hippo pathway の存在が明らかになっており、研究が進められている。乳がんの培養細胞では、シグナルの中心を担う YAP が抗癌剤のドセタキセル耐性に関与するとの報告があると同時に、YAP は癌遺伝子としても考えられているが、頭頸部癌における Hippo pathway および YAP の働きはほとんど検討されておらず、詳細は不明である。

2. 研究の目的

シスプラチンは口腔扁平上皮癌に対する有用な抗癌剤として頻用されているものの、その耐性の獲得がしばしば問題視されている。最近では、癌幹細胞の特性として抗癌剤耐性が供わっていることが明らかとなっている。耐性の克服が非常に重要な治療成績の向上に直結する意味を持つと考えられる。癌幹細胞および幹細胞性の抗癌剤耐性機構について解析を行うため、口腔扁平上皮癌培養細胞を用いてシスプラチン耐性細胞を作成し、耐性機構を明らかにすることで、シスプラチンを用いた化学療法に新たな知見や展開が生まれるだけでなく、口腔癌幹細胞の特性を解析することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 3 種類の異なる口腔扁平上皮癌由来培養細胞株 (SCCKN, HSC-3, OSC-19) を使用し、dose escalation method によってシスプラチン耐性細胞を樹立した。各耐性細胞の性質を確認するために、まずシスプラチン耐性に関与することが報告されている ATP7B,

ERCC1, GST- のタンパク質発現をウエスタンブロット法にて検討した。また、YAP を含む Hippo pathway に関連するタンパク質の発現も合わせてウエスタンブロット法にて検討した。

(2) 各耐性細胞の形態観察を行った後、Hippo pathway の関与が示唆された OSC-19 および耐性細胞において、免疫細胞染色を用いて YAP の局在性を比較検討した。

(3) OSC-19 の耐性細胞に対して、YAP の siRNA 処理を行った後、再度 Hippo pathway に関連するタンパク質の発現変化をウエスタンブロット法にて検討した。さらに、siRNA 処理によって YAP の局在性の変化について、免疫細胞染色を用いて観察した。

(4) si-YAP 処理した OSC-19 の耐性細胞と、si-control 処理した OSC-19 耐性細胞とで、シスプラチン感受性がどのように変化するか、IC50 を再度算出し比較検討した。また、細胞増殖能の変化についても同様に比較検討した。

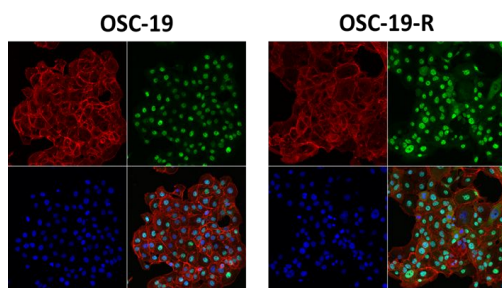
4. 研究成果

(1) 樹立した 3 種類のシスプラチン耐性細胞 (SCCKN-R, HSC-3-R, OSC-19-R) はそれぞれ 5~7 倍の耐性度を示した (表 1)。ウエスタンブロット法により、SCCKN-R, HSC-3-R では ATP7B の高発現を認めしたが OSC-19-R では有意な変化を認めなかった。また、ERCC1, GST- ではいずれも有意な変化を認めなかった。細胞形態を解析した結果、OSC-19-R では、親株と比較して細胞の膨化が認められたため、親株の OSC-19 およびそのシスプラチン耐性株である OSC-19-R を標的として Hippo pathway との関連性の解析をすすめた。ウエスタンブロット法にて各タンパク質発現を検討した結果、YAP 発現には有意な変化を認めない一方で、phospho-YAP 発現が、OSC-19-R において著明に低下していた。

Cell line	IC <sub>50</sub> in μM (mean ± SD)	Fold resistance	p-value
OSC-19	17.1 ± 12.7	-	
OSC-19-R	113.3 ± 17.6	6.6	< 0.01
SCCKN	1.7 ± 0.3	-	
SCCKN-R	9.8 ± 0.8	5.7	< 0.01
HSC-3	9.9 ± 0.9	-	
HSC-3-R	54.6 ± 4.5	5.5	< 0.01

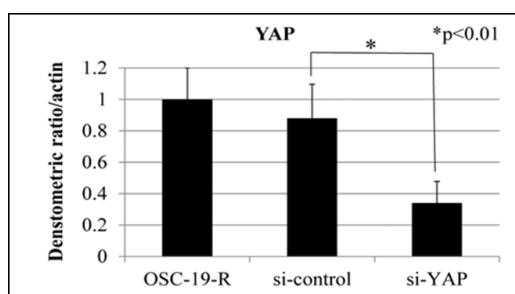
(表 1)

(2) 免疫細胞染色の結果、OSC-19-R では親株と比較し YAP が核内に高発現していた (図 1)

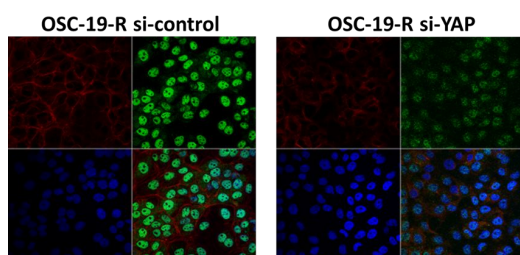


(図 1)

(3) OSC-19-R に対して si-YAP 処理した結果、YAP のタンパク質発現は著明に抑制された (図 2)。また、免疫細胞染色にて、核内の YAP 発現も著明に抑制されたことを確認した (図 3)



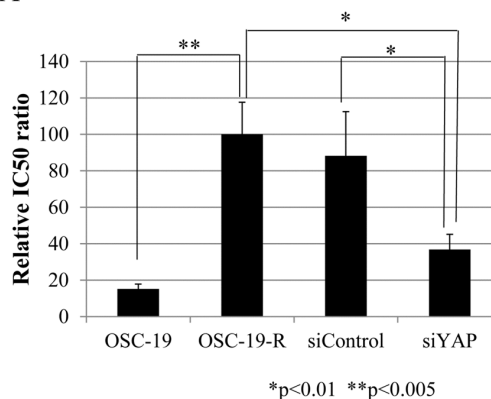
(図 2)



(図 3)

(4) si-control 処理した OSC-19-R と比較し、si-YAP 処理した OSC-19-R において、シスプラチンに対する IC50 が約 37% にまで減少し、シスプラチン感受性が明らかに増大した (図 4)。また、細胞増殖能を検討した結果、si-YAP 処理により著明に抑制された。

A



(図 4)

## 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 1 件)

Yoshikawa Kyohei, Noguchi Kazuma, Nakano Yoshiro, Yamamura Michiyo, Takaoka Kazuki, Hashimoto-Tamaoki Tomoko, Kishimoto Hiromitsu. The Hippo pathway transcriptional co-activator, YAP, confers resistance to cisplatin in human oral squamous cell carcinoma. International Journal of Oncology 査読あり 2015;46(6):2364-2370  
Doi: 10.3892/ijo.2015.2948

〔学会発表〕(計 3 件)

森寺 邦康, 野口 一馬, 吉川 恭平, 高岡 一樹, 岸本 裕充. ドセタキセルの動脈投与による Persistent Supravenuous Erthematus が疑われた 1 例. (一般) 第 33 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会 2015.1.29 奈良県新公会堂 (奈良)

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. (一般) 第 51 回日本口腔組織培養学会学術大会・総会 2014.11.15 九州歯科大学 (小倉)

野口 一馬, 高岡 一樹, 吉川 恭平, 山村 倫世, 首藤 敦史, 頭司 雄介, 森寺 邦康, 岸本 裕充. 両側上顎歯肉に転移した肺癌の 1 例. (一般) 第 68 回日本口腔科学会学術集会 2014.5.8 京王プラザホテル (東京)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉川 恭平 (YOSHIKAWA, Kyohei)  
兵庫医科大学・医学部・研究生 (研究員)  
研究者番号: 00727480

(2)研究協力者

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

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