

学位論文題名

オステオポンチンは内因性シスプラチン耐性遺伝子で、
抗がん剤治療ターゲットとなりうる

学位論文内容の要旨

口腔癌は癌全体の2%程度で比較的頻度は少ないが、外科的切除による広範囲の侵襲は口腔機能や審美性に多大なる影響を及ぼし、患者のQOLの低下を招く。そこで、口腔領域の癌治療においては、根治性、機能温存ならびに審美性も考慮する必要があるため、抗癌剤による化学療法や放射線療法などの非観血的治療の確立が望まれている。シスプラチン(CDDP)は代表的な化学療法剤で、DNAと複合体を形成しアポトーシス経路を活性化することで細胞傷害効果をもたらすが、その作用機序や耐性獲得の機序について未だに不明な点が多い。また、CDDPに対して抵抗性を示すがんもあるが、現時点ではCDDPの効果を治療前に予測する方法はない。治療法の的確な選択を行うためにも、術前に腫瘍のCDDP感受性を予測する意義は大きいと考えられる。

CDDPによる化学療法が奏功しない原因の一つとして耐性遺伝子の存在が示されている。耐性遺伝子には内因性と獲得性耐性の二種類が存在し、内因性耐性遺伝子は元来発現が高く、それによって耐性に寄与する遺伝子であるのに対し、獲得性耐性遺伝子は、細胞内での発現は高くないが、抗がん剤暴露後に発現が上昇し耐性に働く遺伝子である。一般的な耐性遺伝子を標的にした多くの研究は、培養した癌細胞にCDDPに暴露させ、その濃度を段階的に上げて最終的に生き残った細胞を耐性株とするため、これらの方法で同定した遺伝子は内因性と獲得性の双方の耐性遺伝子を含んでおり、術前にCDDPの効果を予測するためには、内因性の耐性遺伝子のみを同定する必要がある。

そこで内因性耐性遺伝子のみを検索するために、まず口腔扁平上皮癌細胞株HSC-3から限界希釈によりクローンを作製した。次に、遺伝子発現プロファイルをシングルカラーマイクロアレイで行い、さらに、各クローンのCDDP耐性の程度を検索した。シングルセルクローニングにより得られた細胞株の中で、HSC-3-8細胞はCDDPに対し最も耐性を示し、次にHSC-3-6、そしてHSC-3-9と

HSC-3-10 は最も耐性が低かった。これらの細胞株の遺伝子の発現と CDDP 抵抗性の結果から、発現量と CDDP 耐性が相関する遺伝子を比較することにより内因性遺伝子候補を同定し、CDDP 耐性のメカニズムについて検討した。

MDR1 は細胞内のカチオン性の薬剤を排出するトランスポーターとして機能し、抗癌剤を細胞外に排出し、抗がん剤に対する耐性度の違いは MDR1 の発現量の差に起因することが報告されている。シングルセルクローニング法で樹立した細胞株 HSC-3-6, 8, 9, 10 を用いて MDR1 の発現をウェスタンブロットで検索したが、すべての細胞株において MDR1 の発現は低く、今回用いた細胞株における CDDP 感受性の有無は MDR1 発現によるものではないことが示された。次に、抗がん剤による細胞死はアポトーシスによることが示されている。AKT は、多くの癌で活性化され、アポトーシス経路を阻害することで薬剤耐性を促すと考えられている。Western blotting により AKT の活性化について検索したところ、CDDP 処理を行った耐性株 HSC-3-8 では活性型 AKT の発現が高く、アポトーシス経路の最下流に位置する活性型 PARP の発現が低いことが示された。さらに、AKT の上流に位置する PI3K の阻害剤を加えると、HSC-3-8 の CDDP 抵抗性が消失し、感受性の高い HSC-3-10 と同レベルの活性型 PARP がみられた。このような結果は、耐性株 HSC-3-8 では AKT 活性の亢進により CDDP 抵抗性が増すことを示している。AKT 活性の差が CDDP によるアポトーシス誘導に関与していることから、マイクロアレイにより同定された候補遺伝子の中で AKT 活性化に関与していることが報告されているオステオポンチン (以下 OPN) について検索した。

OPN は分子量約 41kDa の分泌型タンパク質で、乳汁、胎盤、尿、白血球、腎臓などの正常組織にも存在していることが報告されている。OPN はレセプターである CD44 やインテグリンと結合し、PI3K を介して AKT を活性化し、細胞遊走、増殖、がん転移、細胞生存に寄与していると言われている。HSC-3 細胞に OPN を遺伝子導入すると CDDP 抵抗性が増し、siRNA によりノックダウンすると CDDP 抵抗性が減弱した。OPN を過剰発現した細胞では、CDDP による活性型 PARP の発現が低下しており、PI3K 阻害剤を使用するとコントロールとの差は消失した。このことから OPN による CDDP 抵抗性には AKT の活性化を介したアポトーシス抑制機構が関与していることが明らかとなった。

本研究によって以下のことが明らかとなった。

1. 口腔扁平上皮癌由来細胞株 HSC3 からシングルセルクローニングで樹立した細胞株間では、MDR1 の発現に差は認められず、PI3K を介した AKT 活性化が CDDP 抵抗性に重要であることが示唆された。
2. DNA マイクロアレイにより、内因性耐性遺伝子の候補となる数種類の遺伝子を同定し、その中に PI3K-AKT 経路に関連する OPN を見いだした。

3. OPN を遺伝子導入した細胞は CDDP 抵抗性を示し, 逆に OPN ノックダウン細胞では CDDP に対する感受性が亢進した。
4. OPN 遺伝子導入細胞では AKT 活性の亢進, PARP クリベージの阻害がみられた。
5. 以上の結果は, OPN が CDDP に対する内因性耐性遺伝子であり, CDDP 耐性マーカーとして, さらに化学療法による有効性を改善するためのターゲット遺伝子の一つとして有用である可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 鄭 漢 忠
副 査 教 授 進 藤 正 信
副 査 教 授 北 川 善 政

学位論文題名

オステオポンチンは内因性シスプラチン耐性遺伝子で、 抗がん剤治療ターゲットとなりうる

審査は、上記担当者による申請者に対する提出論文と関連事項についての口頭試問により執り行われた。審査を行った論文の概要は以下の通りである。

シスプラチンは固形癌の治療に広く使われるもっとも有力な抗がん剤のひとつである。しかしながらシスプラチンに対し耐性を示す腫瘍があり、術前に腫瘍に対する奏効性を予測することは難しい。抗がん剤耐性遺伝子には、細胞内でもともと発現は低い、抗がん剤に曝露されたとき発現が上昇して耐性の原因となる獲得性耐性遺伝子と、もともと発現が高く、それが原因で耐性を示す内因性遺伝子の2種類がある。

ヒト口腔がん細胞株 HSC-3 よりシングルセルクローニングを行い、シスプラチン投与前に、当該がんのシスプラチン感受性を評価するマーカーを見つけるため内因性遺伝子のみを同定し、いくつかの内因性耐性遺伝子の候補を見いだした（北村ら 投稿中）。本研究の目的は、そのうち、AKT の活性化に働くと考えられているオステオポンチンとシスプラチン耐性の関連性を検討することである。

樹立した耐性株（HSC-3-8）と感受性株（HSC3-10）におけるシスプラチン曝露後の AKT 活性をウェスタンブロット法で調べた。次にオステオポンチンを過剰発現あるいは knockdown した細胞を用い、シスプラチン処理後の細胞生存率とアポトーシスについて調べた。

耐性株では感受性株に比べ、シスプラチン曝露後の AKT の活性が高く、AKT の活性を阻害すると耐性が消失した。オステオポンチンを過剰発現させた HSC-3

細胞はシスプラチンに抵抗性を示し、逆に knockdown したものでは抵抗性が減弱した。また、オステオポンチンの過剰発現ではシスプラチンによるアポトーシスが減少した。また、SAS 細胞でも同様の結果が得られた。

樹立した細胞株では AKT の活性がシスプラチン耐性に関与していることが示唆された。また、オステオポンチンの過剰発現あるいは knockdown することでシスプラチン抵抗性に差がみられたことから、オステオポンチンはシスプラチン投与前の奏効性のマーカーになりうるということが示唆された。

論文審査にあたっては、申請者による学位論文要旨についての説明後、担当者により研究内容および関連事項についての質問を行った。主な質問事項は、1) 北村らの方法で遺伝子はいくつみつかったのか、シスプラチンの耐性と遺伝子発現パターンはいかがか、2) 今回の実験で HSC3 を選んだ理由は、3) オステオポンチンはマーカーとなり得るのか、もしくはターゲットとなり得るのか、4) 内因性遺伝子を見つける手法は他にはないのか、5) 今回の実験において得られたシスプラチン耐性株とがん幹細胞の関連性はなどであった。これらの質問に対しては申請者から適切かつ明快な回答および説明が得られ、研究の立案と遂行ならびに結果の収集とその評価について、申請者が十分な能力を有していることが確認された。本研究結果はオステオポンチンがシスプラチンの抵抗性に関連することを示唆するものとして意義深いものであることが高く評価された。申請者は、関連分野にも幅広い学識を有し発展的研究にも意欲的であり、今後の研究についての将来性も期待される。本研究業績は口腔外科領域のみならず癌の化学療法領域にも寄与すること大であり、博士（歯学）の学位に値するものと認められた。