

課題番号：7

がん細胞のシスプラチン耐性獲得機構の解明

[1] 組織

代表者：松本 英樹
(福井大学・高エネルギー医学研究センター)
対応者：福本 学
(東北大学・加齢医学研究所)
分担者：成田 憲彦
(福井大学・医学部)
藤枝 重治
(福井大学・医学部)

研究費：物件費7万円

[2] 研究経過

(2-1) 研究目的

がん治療研究において新たながん治療戦略の開発は、近年益々その重要性を増している。本共同研究は、その様な社会的背景に鑑み、がん細胞のシスプラチン耐性獲得機構を明らかにすることを目的とする。

(2-2) 研究の概要

1. がん細胞のシスプラチン処理後の遺伝子発現の網羅的解析
- (1) 本学（福井大学）で樹立したシスプラチン耐性細胞株およびその親株にシスプラチン処理（臨床施行濃度）をし、その後の遺伝子発現動態をPCRアレイにより網羅的に解析し、シスプラチン耐性獲得による遺伝子発現の変化を明らかにする。
- (2) 福本先生（東北大学）が樹立された臨床的放射線耐性細胞株とその親株にシスプラチン処理（臨床施行濃度）をし、その後の遺伝子発現動態をPCRアレイにより網羅的に解析し、シスプラチン処理後の遺伝子発現の変化を明らかにする。
- (3) (1)および(2)の遺伝子発現プロファイルを解析し、放射線耐性獲得によるシスプラチン誘発遺伝子発現動態への影響を明らかにする。
- (4) NOラジカル捕捉剤（c-PTIO）とシスプラチンとの同時併用処理を行い、がん細胞が産生するNOラジカルのシスプラチン誘発遺伝子発現動態への影響を明らかにする。
2. がん細胞の低濃度シスプラチン処理後の遺伝子発現の網羅的解析

- (1) 本学（福井大学）で樹立したシスプラチン耐性細胞株およびその親株に低濃度シスプラチン処理（臨床施行濃度の 1/10~1/50 程度）をし、その後の遺伝子発現動態をPCRアレイにより網羅的に解析し、シスプラチン耐性獲得による遺伝子発現の変化を明らかにする。
- (2) 福本先生（東北大学）が樹立された臨床的放射線耐性細胞株とその親株に低濃度シスプラチン処理（臨床施行濃度の 1/10~1/50 程度）をし、その後の遺伝子発現動態をPCRアレイにより網羅的に解析し、シスプラチン処理後の遺伝子発現の変化を明らかにする。
- (3) (1)および(2)の遺伝子発現プロファイルを解析し、放射線耐性獲得による低濃度シスプラチン誘発遺伝子発現動態への影響を明らかにする。
- (4) NOラジカル捕捉剤（c-PTIO）と低濃シスプラチンとの同時併用処理を行い、がん細胞が産生するNOラジカルのシスプラチン誘発遺伝子発現動態への影響を明らかにする。
3. がん細胞のシスプラチン耐性獲得機構の解析
1および2の遺伝子発現プロファイルからシグナル伝達パスウェイを解析し、シスプラチン耐性獲得機構の解明に迫る。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

本年度は、以下に示す研究成果を得た。

1. 低濃度シスプラチン処理後のシスプラチン耐性がん細胞の遺伝子発現変化
シスプラチン耐性（IMC3CR）細胞をシスプラチン（1 µg/ml）で処理し、6 時間後に全RNAを抽出し、RT-PCR array（SA Biosciences社のDNA Damage signaling pathway）を用いて、シスプラチン処理後の遺伝子発現動態を再度解析した。
- (1) 昨年度に見出した細胞周期調節に関連する遺伝子4種について、低濃度のシスプラチン処理により発現誘導されることを確認した。
- (2) ウェスタンブロット分析およびsiRNAによるノックダウン分析等により、ある遺伝子は低濃度のシスプラチン処理により特異的に誘導され、G2/M arrestを誘導するキータンパク質であることが示

唆された（具体的な遺伝子の名称は伏せさせて戴きます）。

2. X線（2 Gy）照射後の臨床的放射線耐性細胞の遺伝子発現変化

臨床的放射線耐性（SAS-R1）細胞にX線を2 Gy照射し、6 時間後に全RNAを抽出し、RT-PCR array (SA Biosciences社のDNA Damage signaling pathway) を用いて、X線照射後の遺伝子発現動態を解析した。

- (1) 細胞周期の調節に関与している数種の遺伝子が、非照射のものと比較して2 倍以上に発現量が上昇していた（表1）。
- (2) ATM、ATR、TP53、CHEK1/2等の発現量の上昇は認められなかった。
- (3) MRE11A、RAD50、RAD51、BRCA1等の発現量の上昇は認められなかった。
- (4) 現在、ウェスタンブロット分析およびsiRNAによるノックダウン分析等により、これら数種の遺伝子について、その発現動態および機能について解析中である（具体的な遺伝子の名称は伏せさせて戴きます）。

表1. SAS-R1におけるX線照射後の遺伝子発現動態。

Genes	Rations of Up (+) - or Down (-) Regulation
A gene	+ 31.56
B gene	+ 20.68
C gene	+ 7.94
D gene	+ 2.71
XRCC3	+ 2.30
RAD1	+ 2.19
CHEK1	+ 1.19
ATM	+ 1.17
BRCA1	+ 1.16
CHEK2	+ 1.09
TP53	+ 1.00
ATR	- 1.07
RAD51	- 1.28
GADD45A	- 1.35
TP73	- 1.44
RAD50	- 1.83

（3－2）波及効果と発展性など

（3－1）で記載したように、本学において樹立したシスプラチン耐性細胞株のシスプラチン処理後の遺伝子発現動態の網羅的解析により、数種の遺伝子の発現亢進が認められた。さらに福本先生の研究室において樹立した臨床的放射線耐性細胞株のX線照射後の遺伝子発現動態の網羅的解析により、数種の遺伝子の発現亢進が認められた。現在、それぞれの

細胞株における発現亢進遺伝子の機能的関連性に付いて解析中である。更に詳細が明らかとなれば、シスプラチンに対して抵抗性を示す腫瘍の新たな治療戦略を提案できることになると確信する。

〔4〕 成果資料

（原著および総説）

1. Narita, N., Fujieda, S., Kimura, Y., Ito, Y., Imoto, Y., Ogi, K., Takahashi, N., Tanaka, T., Tsuzuki, H., Yamada, T., Matsumoto, H.: Suppression of HDAC3 enhances apoptosis induced by paclitaxel in human maxillary cancer cells *in vitro* and *in vivo*. ***Biochem. Biophys. Res. Commun.*** 396: 310-316, 2010.
2. Matsumoto, H., Tomita, M., Otsuka, K., Hatashita, M., Hamada, N.: Nitric oxide is a key molecule serving as a bridge between radiation-induced bystander and adaptive responses. ***Curr. Mol. Pharmacol.***, in press.
(国際学会)
1. Matsumoto, H., Tomita, M., Otsuka, K.: A new paradigm in radioadaptive response developing from charged heavy particle microbeam research. ***5th NIRS International Open Laboratory Workshop on Advances in Dosimetry and Health Effects Associated with Exposure to Particles of Space Radiation Environment***. Chiba, 2010. (Invited)
2. Narita, N., Matsumoto, H., Yamamoto, H., Kimura, Y., Fujieda, S.: Analysis of molecular targets to overcome cisplatin-resistance in human maxillary cancer. ***23rd Congress of the European Rhinologic Society (ERS) 29th International Symposium of Infection and Allergy of the Nose (ISIAN)***. Geneva (Switzerland), 2010.
3. Matsumoto, H., Tomita, M., Otsuka, K., Hatashita, M.: A new paradigm in radioadaptive response developing from charged heavy particle microbeam research. ***9th International Workshop on Microbeam Probes of Cellular Radiation Response***. Darmstadt (Germany), 2010.
4. Matsumoto, H., Tomita, M., Otsuka, K., Hatashita, M.: Radioadaptive response can be induced even after priming irradiation of a limited number of cells with charged heavy particles. ***56th Annual Meeting of Radiation Research Society***. Maui, Hawaii (USA), 2010. (Invited)