

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670714

研究課題名(和文)オートファジー細胞死誘導による頭頸部癌新規治療法の開発

研究課題名(英文)The development of a new treatment for head and neck cancer by inducing autophagic cell death

研究代表者

辻 亮(Tsujii, Akira)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：70632652

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジーは細胞内蛋白分解系の重要な機構で、恒常性維持のために不要な蛋白等を順次分解し、再利用する役割をしている。癌細胞は代謝要求性が高く、オートファジーによる自己分解を介したアミノ酸や脂肪酸、糖質の供給は、その生存、増殖に寄与する。上咽頭癌組織を用いた実験で、化学療法前後におけるオートファジー関連タンパクのBeclin1の発現を免疫組織学的に検討したところ、化学療法前と比べ化学療法後でオートファジーが増加していることが分かった。さらに上咽頭癌細胞株を用いた実験で、頭頸部癌のキードラッグであるシスプラチンを加え、そこにオートファジー抑制物質を加えると、細胞死が増えるという結果を得た。

研究成果の概要(英文)：Autophagy can help cancer cells to overcome metabolic stress and the cytotoxicity of chemotherapy. Beclin1 has been well-characterized to play a pivotal role in autophagy. Cisplatin (CDDP) is central to the treatment of nasopharyngeal carcinoma (NPC). Autophagy may contribute to acquire resistance to chemotherapeutic agents, but it is unclear that inhibition of autophagy promotes death of cancer cells or tumor growth. In this study, we examined the role of autophagy in NPC and Beclin1 was used as an index. Immunohistochemical analysis is performed to evaluate autophagy in NPC tissue. Beclin1 protein levels in NPC cell lines with CDDP and/or CQ were evaluated with Western blot analysis. We also examined the viability of NPC cell lines with CDDP and/or CQ. Beclin1 expression is significantly higher after chemotherapy than before. In vitro concomitant therapy (CDDP and CQ) was more effective in restraining NPC cells proliferation.

研究分野：頭頸部癌

キーワード：上咽頭癌 オートファジー シスプラチン クロロキン 細胞死

1. 研究開始当初の背景

上咽頭癌は、進行期で見つかることが多く、また解剖学的に手術は困難な場所に発生する。そのため化学放射線療法が標準的な治療法であり、白金ベースの化学療法が最も一般的に使用されている。

オートファジーは細胞内蛋白分解系の重要な機構で、恒常性維持のために不要な蛋白等を順次分解し、再利用する役割をしていると考えられている。*Beclin1*は最も重要なオートファジー関連遺伝子の一つである。

オートファジーは、腫瘍の発生に重要な役割を果たしている。オートファジーは、損傷した細胞小器官や蛋白を除去し、ゲノム不安定性を抑制することにより、腫瘍形成を抑制する。しかし一旦癌化すると、代謝要求性が高い癌細胞にとって、オートファジーは自己分解を介したアミノ酸や脂肪酸、糖質の供給により、その生存、増殖に寄与する。オートファジーはまた、化学療法によって増強することが報告されている。オートファジーと上咽頭癌の関係について、オートファジーの阻害が、上咽頭癌における細胞死または増殖を促進するかどうかは明らかではない。

2. 研究の目的

上咽頭癌で、シスプラチンを中心とした化学療法に対するオートファジーの役割を明らかにし、またオートファジーを阻害することで、治療効果に対する影響を検討することを目的とする。

3. 研究の方法

組織サンプル

2008年から2013年にかけて金沢大学附属病院で化学療法、放射線療法の交替療法を行った上咽頭癌患者の、治療前と化学療法1コース終了後の生検組織を用いた。サンプル採取については金沢大学附属病院の倫理委員会の承認と、各患者の同意を得て行った。生検標本はWHO病理組織学的分類で組織型を決定した。また患者個々の病期についてはUICC分類に基づき行った。

免疫組織学的検討

パラフィン包埋された標本を3 μ mの厚さにスライスし、スライドガラスの上に固定後、脱パラフィンした。その後内因性ペルオキシダーゼ活性を不活化するために10分間、3%過酸化水素水で、さらに20分間タンパク質ブロッカーで処理した。そして一次抗体として抗*Beclin1*抗体(500倍希釈)を4、一晚反応させ、その後ペルオキシダーゼ標識ポリマーを作用させ、DABで発色させヘマトキシリンで対比染色した。*Beclin1*陽性細胞数をカウントし、各切片の腫瘍部における陽性率を次のようにスコア化した。スコア0:陰性、スコア1:陽性率0~25%、スコア2:陽性率26~50%、スコア3:陽性率51~75%、

スコア4:76~100%。

細胞株、細胞培養

上咽頭癌細胞株C666-1は10%FBSを加えたRPMI培地にペニシリン、およびストレプトマイシンを添加した培地で培養した。上咽頭癌細胞株CNE2は10%FBS、ペニシリンおよびストレプトマイシンを加えたDMEMで培養した。両細胞株は37、5%CO₂の湿式インキュベータで培養した。

ウェスタンブロット解析

上咽頭癌細胞株にシスプラチンとクロロキンを作用させて*Beclin1*の発現を検討するために、ウェスタンブロット法を用いた。10%SDS-PAGEゲルで電気泳動を行い、メンブレンに転写し、5%脱脂肪ミルクで20分間ブロッキング後、一次抗体の*Beclin1*(500倍希釈)を4で一晚反応させた。それを洗浄した後、二次抗体(2000倍希釈)を室温、1時間反応させた。バンドの検出は、増強化学発光(ECL)試薬を用いた。 β -actinをコントロールとして用いた。

細胞活性の測定

C666-1とCNE2細胞の生存率を測定するために細胞増殖試験を行った。細胞を4つのグループ(コントロール、シスプラチン群、クロロキン群、シスプラチン+クロロキン群)に分けて、96ウェルアッセイプレート各ウェルに100 μ lの培地中に播いて20 μ M CellTiter 96[®] AQueous One Solution Reagentを加えて37、5%CO₂の湿式インキュベータで2時間インキュベートし、490nmの吸光度を測定し、細胞生存率曲線を作成した。

Annexin V-FITC/PI 二重染色解析

C666-1とCNE2細胞をシスプラチンおよび/またはクロロキン処理し、Annexin V-FITCとPIを作用させ暗所、室温で15分間インキュベートした。アポトーシスの怒った細胞ではAnnexin V-FITCが陽性となり、アポトーシスの後期やネクローシスの場合にはAnnexin V-FITC/PI両者陽性となる。正常な細胞は何の試薬とも反応せず陰性となる。Annexin V-FITC/PI陽性の細胞を蛍光顕微鏡で観察し、Annexin V-FITC陽性アポトーシス細胞の割合を計測した。

統計学的解析

統計解析はWindowsのバージョン11.0.1 SPSSを使用して行った。臨床病理学的パラメータと化学療法に関する*Beclin1*の発現については、フィッシャーの直接確率検定を用いて解析した。細胞生存率はt検定で解析した。p値<0.05で統計学的に有意とした。

4. 研究成果

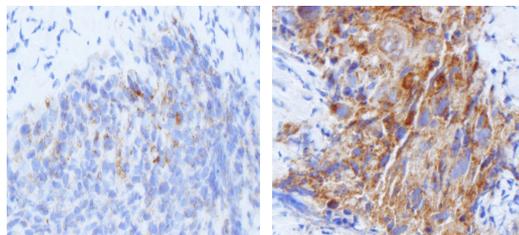
患者背景

11人の中、男性10人、女性1人、年齢は16~79歳(中央値:55.6)、病期分類はステージ

0人、ステージ 2人、ステージ 4人、ステージ 5人で病理学的に WHO type 0人、type 6人、type 5人であった。

患者背景	
年齢	16-79歳(中央値 55.6)
性別	
男性	10
女性	1
T分類	
T1,T2	5
T3,T4	6
N分類	
N0,N1	7
N2,N3	4
M分類	
M0	9
M1	2
ステージ分類	
0	0
2	2
4	4
5	5
WHO病理分類	
0	0
6	6
5	5

上咽頭癌組織における免疫組織学的検討で治療前と比較し、化学療法1コース終了後にオートファジー関連蛋白の Beclin1 の発現が増加していた。



治療前 化学療法1コース後

臨床的なパラメータと Beclin1 のスコアには有意な相関は見られなかった。

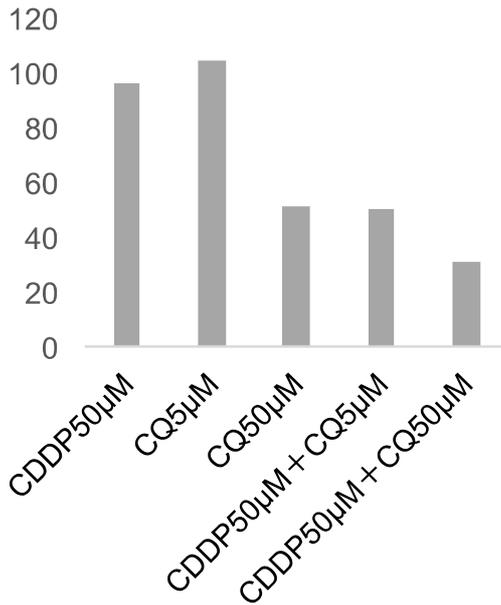
	臨床的項目と Beclin1 スコア							
	化学療法前			化学療法後				
	スコア	2	3	スコア	2	3	スコア	P 値
年齢								
50歳	2	2		0	4			0.236
>50歳	6	1		3	4			
T分類								
T1,T2	3	2	0.545	1	4			0.621
T3,T4	5	1		2	4			
N分類								
N0,N1	5	2	0.898	2	5			0.491
N2,N3	3	1		1	3			
M分類								
M0	7	2	0.491	2	7			0.658
M1	1	1		1	1			

化学療法前後において上咽頭癌組織で Beclin1 の発現が有意に上昇していた。

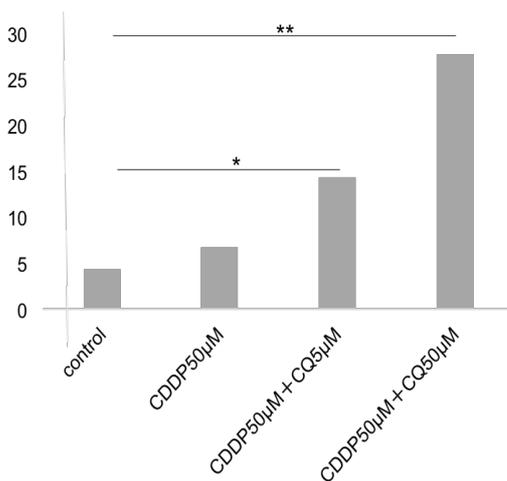
化学療法前後での Beclin1 のスコア					
	スコア	2	スコア	3	P 値
化学療法前	8		3		0.033
化学療法後	3		8		

上咽頭癌細胞株においてシスプラチンはオートファジーを誘導し、それはクロロキンによって抑制される。

C666-1 の細胞活性



上咽頭癌細胞にシスプラチンだけを加えたときよりもシスプラチンとクロロキンを加えた方が、アポトーシスが誘導された。



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

以上の結果から、本研究における重要な知見は、上咽頭癌細胞では化学療法によってオートファジーが促進するということである。化学療法後にオートファジー関連蛋白の Beclin1 が上昇した。これは腫瘍細胞が、抗癌剤耐性獲得のためにオートファジーを促進することを示唆している。

また上咽頭癌細胞株を用いた実験では、シスプラチンとクロロキンを併用することで腫瘍細胞のアポトーシスが促進されることから、今後の上咽頭癌の治療に有用な治療法となる可能性がある。

今後は動物実験などを追加し、さらなる検討を行う予定である。

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 0 件)

現在 Clinical Cancer Research に投稿中

〔学会発表〕(計 3 件)

発表者：正谷 知巳

演題名：上咽頭癌における Beclin 1 の発現に関する臨床的検討

学会名：日本頭頸部癌学会

発表日：2014 年 6 月 12 日

発表場所：東京都

発表者：辻 亮

演題名：Cisplatin promote autophagy in nasopharyngeal carcinoma tissue

学会名：European Congress On Head And Neck Oncology

発表日：2014 年 4 月 24 日

発表場所：Liverpool

発表者：辻 亮

演題名：上咽頭癌組織におけるオートファジー関連蛋白 Beclin1 の発現に関する臨床的検討

学会名：日本口腔・咽頭科学会

発表日：2013 年 11 月 13 日

発表場所：名古屋市

〔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

辻 亮 (TSUJI, Akira)
金沢大学・医学系・助教
研究者番号：70632652

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：