



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	オステオポンチンは内因性シスプラチン耐性遺伝子で，抗がん剤治療のターゲットとなりうる
Author(s)	柏尾，啓太
Citation	北海道歯学雑誌，33(2)，103-110
Issue Date	2013-03
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/52449
Type	journal article
File Information	06-kashiwao.pdf



原 著

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

柏 尾 啓 太

抄 録：【背景】シスプラチン（CDDP）は固形癌の治療に広く使われる最も有力な抗癌剤の1つである。しかしながら、CDDPに対し耐性を示す腫瘍が存在し、術前にその奏効性を予測することは困難である。著者は腫瘍におけるCDDP感受性を術前に予測するために研究を行った。耐性の原因となる遺伝子には、内因性耐性遺伝子と、獲得性耐性遺伝子が知られている。著者の目的の達成には内因性耐性遺伝子の同定が必要となる。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ない、耐性株（HSC-3-6, 8）および感受性株（HSC-3-9, 10）を樹立した。これらの細胞株を用いてマイクロアレイを行い、いくつかの耐性候補遺伝子を見出した。耐性株ではCDDP存在下でもAKTの活性が高かったことから、候補遺伝子のうちAKTの活性に働くと考えられているオステオポンチン（OPN）とCDDP耐性の関係について検討した。

【材料と方法】耐性株（HSC-3-8）、感受性株（HSC-3-10）におけるCDDP暴露後のAKTの活性をウェスタンブロット法で調べた。次に、OPNを過剰発現あるいはノックダウンした細胞を用い、CDDP処理後の細胞生存率とアポトーシスについて調べた。

【結果】耐性株では感受性株に比べ、CDDP暴露後のAKTの活性が高く、AKTの活性を阻害すると耐性が消失した。OPNを過剰発現させたHSC-3細胞はCDDPに抵抗性を示し、逆にOPNをノックダウンしたものでは、抵抗性が減弱した。また、OPNの過剰発現ではCDDP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。

【考察および結論】口腔病理病態学教室で樹立した細胞株ではAKTの活性がCDDP耐性に関与していることが示唆された。また、OPNの過剰発現あるいはノックダウンすることでCDDP抵抗性に差を認めたことから、OPNはCDDP投与前のマーカーとなりうること、さらに化学療法における有効性を改善する遺伝子であることが示唆された。

キーワード：シスプラチン、オステオポンチン、薬剤耐性

緒 言

口腔癌は、舌、口底、頬粘膜、上顎歯肉、下顎歯肉、硬口蓋など解剖学的構造の異なった部位に発生するために、癌の病態や進展様式は発生部位によって大きく異なる。また、口腔は咀嚼および摂食、嚥下、構音などの機能面ならびに顎顔面領域の審美面に関わるため、口腔癌における根治的切除はしばしば術後のQOLの低下を生むことになる。そのため、近年では、CDDPを中心とした化学放射線療法が治療の選択肢の一つとして行われているが、CDDPに耐性を示す腫瘍が存在する。CDDPは、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。また現時点では治療前にCDDPの効果を予測する手段はなく、不必要な治療や副作用を回避するためにも、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ことから、口腔病理病態学教室ではその指標となるマーカーを探索するための研究を行ってきた。

CDDPが奏功しない原因の一つとして耐性遺伝子の存在が示唆されている。耐性遺伝子には内因性と獲得性耐性の二種類が存在する。内因性耐性遺伝子は、がん細胞内において元来発現が高く、それによって耐性に寄与する遺伝子である。一方、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¹⁻²⁾。一般的な耐性遺伝子を標的にした多くの研究は、まず耐性株を樹立することから始まる。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。親株と耐性株の遺伝子発現をマイクロアレイで比較検討し、耐性株で発現が上昇しているものを耐性遺伝子として同定する方法がほとんどである³⁻⁴⁾。しかし、これらの方法で同定した遺伝子が、内因性か獲得性のどちらの耐性遺伝子であるかの判断は困難であり、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、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法で、幾つかの細胞株を樹立し、それぞれの細胞株にCDDPを作用させ、CDDP耐性の程度を調べた。それら細胞株の遺伝子の発現とCDDP抵抗性の結果から、発現量が高くなればなるほどCDDPに抵抗性を示すような、発現量とCDDP耐性が相関する遺伝子を同定することができ、これらは内因性遺伝子の候補となりえると考えた。それらの細胞株のうち、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。(北村、投稿中)

本研究では、シングルセルクローニングで樹立した感受性株と耐性株の特性の違いを検討し、以前候補となった内因性耐性遺伝子の中からその特性に基づいてCDDP内因性遺伝子を同定し、さらにその遺伝子とCDDP耐性のメカニズムについて検討することにした。

材料及び方法

1. 腫瘍細胞および培養条件

ヒト口腔扁平上皮癌細胞であるHSC-3細胞、SAS細胞を用いた。また、当研究室で樹立したHSC-3-6, 8を耐性株として、HSC-3-9, 10を感受性株として用いた。各細胞は、37℃、5% CO₂-気相下において10%牛胎仔血清(FBS)を加えた培地中で通法に従い培養した。培地はDulbecco's modified Eagle's medium (DMEM: Sigma, USA)を用いた。なおHSC-3細胞、SAS細胞は理化学研究所(Tsukuba, Japan)から分与された。

2. Western blotting法

それぞれの細胞培養液中にCDDP単独あるいはCDDPと50μMのPI3-K阻害剤(Calbiochem, USA)を加え、PBSで洗浄後、NP-40 Lysis Buffer (150 mM NaCl, 1% NP-40, 50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 50 mM NaF, 5 mM β-glycerophosphate, 1 mM sodium orthovanadate, Protease inhibitor (Sigma, USA), 10% glycerolにて可溶化、遠心後上清を細胞抽出液とした。細胞抽出液はSDS-polyacrylamide gelelectrophoresis (SDS-PAGE)にて展開後、polyvinylidene difluoride (PVDF)メンブレン(Millipore, USA)に転写した。一次抗体として抗PARP、抗Cleaved PARP、抗p-AKT (Cell Signaling Technology, USA)、抗β-actin (Santa Cruz Biotechnology, USA)、抗MDR1 (Gene

Tex, USA) 抗体を用い、二次抗体にはHRP標識抗マウスIgG抗体 (Pierce, USA)、HRP標識抗ラビットIgG抗体 (Pierce, USA)、HRP標識抗ラットIgG抗体(Jackson Immuno Research, USA)を用い、SuperSignal West Femto detection kit (Pierce, USA)にて検出を行った。

3. リアルタイムRT-PCR法

それぞれの細胞からRNeasy Mini Kit (QIAGEN, Japan)を用いてtotal RNAを抽出し、逆転写酵素(Toyobo, Japan)を用いてcDNAを合成した。使用したプライマーの配列を以下に示す。

オステオポンチンforward; 5'-TTG CAG TGA TTT GCT TTT GC-3', reverse; 5'-GCC ACA GCA TCT GGG TCT TT-3', GAPDH forward; 5'-TCTGAC GTG CCG CCT GGA G-3', reverse; 5'-TCG CAG GAG ACA ACC TGG TC-3'. リアルタイムPCRは、SYBR®Green Real time PCR Master Mix-plus (Toyobo, Japan)を用い、C1000™ Thermal Cycler (BIO RAD, CA)にて増幅産物を定量および解析を行った。内部標準にはGAPDHを用い、その相対比を比較検討した。

4. 細胞増殖アッセイ (MTSアッセイ)

CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (PROMEGA, Japan)を用いてMTS assayを行った。HSC-3-8, 10細胞を96穴に3×10³個/well播種し24時間培養後、CDDP5μg/mlで処理し、0, 1, 2日後にMTS reagentを添加し2時間反応させ、Benchmark microplate reader (Bio-Rad Laboratories, USA)を用いて490nmで吸光度を測定した。また、各細胞株間の細胞増殖における差に関して、有意差検定(T検定)を行った。

5. ELISA

HSC-3およびSAS細胞を96穴に5×10³個/wellで播種し、24時間培養後、controlあるいはオステオポンチン発現ベクターをHilymaxを用いて遺伝子導入し、48時間後に培養上清を回収した。回収した上清はhuman Osteopontin Quantikine kit (R&D)を用いてEnzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)を行った。

結 果

1. MDR1の発現

はじめに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、代表的な耐性遺伝子の一つであるMDR1の発現について調べた。各細胞を6well plateに3×10⁵個/wellで播種し24時間後にタンパクを回収し、Western blotting法にて検討した。樹立した細胞ではすべてにおいてMDR1の発現は認められなかった(Fig. 1a)。なお、ポジティブコントロールとしてヒト結腸癌細胞株であるCaco-2を用いた。

2. AKTの活性とアポトーシス

多くの腫瘍においてAKTによる生存促進メカニズムが

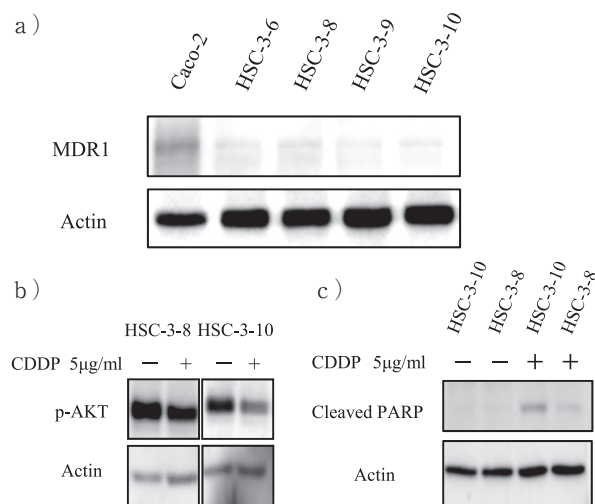


Fig. 1 樹立した細胞株の特性

a) 耐性株HSC-3-6, 8および感受性株HSC-3-9, 10におけるMDR1の発現: HSC-3からシングルセルクローニングを行なって樹立した細胞株からタンパク質を抽出し, MDR1の発現をWestern blottingにて調べた。ポジティブコントロールとしてCaco-2を用いた。樹立した細胞株にはMDR1の発現はほとんどみられなかった。b, c) 耐性株HSC-3-8および感受性株HSC-3-10におけるAKTのリン酸化および活性型PARPの発現: HSC-3-8およびHSC-3-10細胞株をシスプラチンで処理し, Western blottingにて調べた。5 µg/mlのシスプラチンで18時間後処理した後, 細胞からタンパク質を回収した。b) HSC-3-8ではシスプラチンによるAKT活性減少がHSC-3-10に比べ少なかった。c) HSC-3-8ではHSC-3-10に比べてシスプラチンによる活性型PARPの発現が抑制されていた。

亢進していることが知られている。そこでシングルセルクローニング法で樹立した細胞株を用いてAKTの活性をWestern blottingで調べた。CDDP未処理の耐性株HSC-3-8および感受性株HSC-3-10ではAKTの活性に差異は認めなかった。しかしCDDP処理によってHSC-3-10ではAKTの活性は低下したものの, HSC-3-8ではAKTの活性が強く維持されていた (Fig. 1b)。また, これらの細胞のCDDPに対するアポトーシスによる細胞死を調べるためPARPの活性をWestern blottingで調べた。HSC-3-10およびHSC-3-8はCDDP未処理では活性型PARPのバンドはみられなかったが, これらの細胞をCDDPで処理すると, HSC-3-10における活性型PARPの発現はHSC-3-8に比べ強く認められた (Fig. 1c)。次にCDDPに対する抵抗性を調べるため, HSC-3-10とHSC-3-8にCDDPを加え, 1日後および2日後にMTS assayを行った。HSC-3-8はHSC-3-10に比べCDDPに対して抵抗性を示した (Fig. 2a)。しかしAKTの上流に位置するPI3Kの阻害剤LY294002をCDDPと併用したところ, HSC-3-8のCDDP抵抗性は消失し, HSC-3-10と同レベルの感受性を示した (Fig. 2b)。

3. オステオポンチンのCDDP抵抗性

DNAマイクロアレイにより内因性耐性遺伝子の候補とし同定した遺伝子の中で, AKTと関連のあるオステオポ

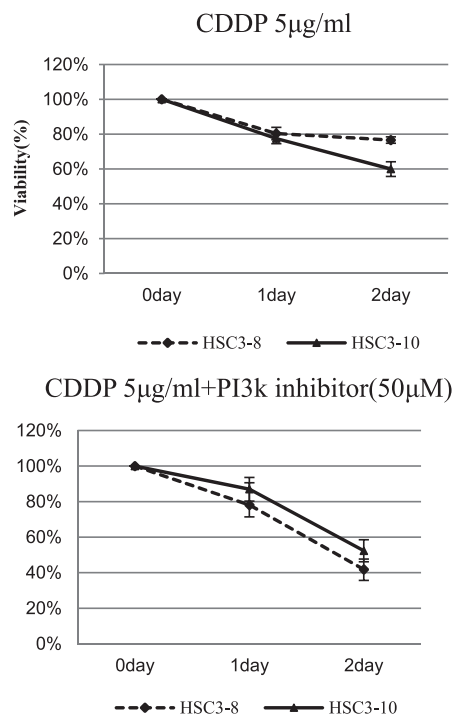


Fig. 2 HSC-3-8およびHSC-3-10のシスプラチン抵抗性とPI3K阻害剤の効果

HSC-3-8およびHSC-3-10におけるシスプラチンに対する抵抗性をMTSアッセイで解析した。シスプラチン未処理時の細胞数を100%とした際の, シスプラチン時間依存的細胞増殖比を示す。HSC-3-8はHSC-3-10と比較してシスプラチンに対する抵抗性を持つが, PI3K阻害剤で処理すると耐性は消失した。

ンチンについて検索を行った。HSC-3およびSAS細胞にOPNを遺伝子導入し, オステオポンチンの発現量とCDDP抵抗性との関係を調べた。細胞内および分泌型OPNの発現をWestern blottingおよびELISA法にてそれぞれ調べたところ, 遺伝子導入したHSC-3細胞においてそれぞれの発現量が亢進していた (Fig. 3a, b)。OPN発現プラスミドあるいはコントロールベクターを遺伝子導入したHSC-3細胞をCDDPで処理し, 生存した細胞数をMTS assayにて調べたところ, OPN遺伝子導入細胞ではコントロールに比べ, CDDP処理1日後および2日後において生存した細胞数は多かった (Fig. 3c)。さらに, OPN mRNAに特異的なsiRNAによるノックダウンを行い, OPNの発現量とCDDP耐性についてHSC-3細胞で検討した。OPNに対するsiRNAの抑制効果をリアルタイムRT-PCRで調べたところ, コントロールsiRNAを遺伝子導入した細胞に比べ, OPN siRNAを遺伝子導入した細胞ではOPN mRNAの発現量は有意に減少していた (Fig. 3d)。これらの細胞を用いてCDDPに対する感受性をMTS assayにて調べた。siRNAによってOPNの発現量を抑制したHSC-3細胞ではコントロールに比べ, 2日目に有意にCDDP抵抗性が減弱した (Fig. 3e)。

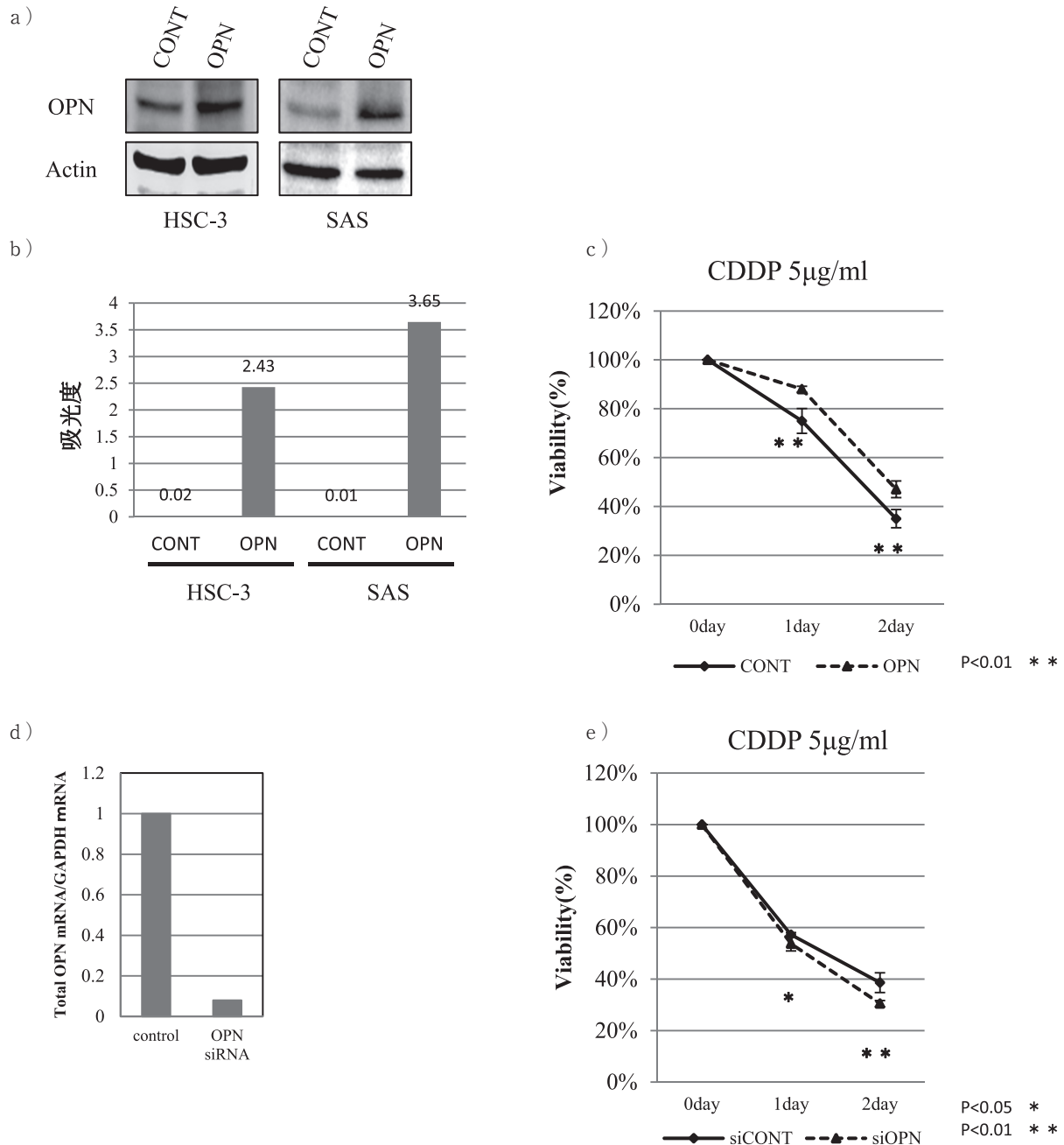


Fig. 3 オステオポンチンの発現とシスプラチン抵抗性の関係

a, b) HSC-3, SAS細胞にコントロールベクター (CONT) またはオステオポンチン発現ベクター (OPN) を遺伝子導入し、オステオポンチンの発現をWestern blottingおよびELISA法にて調べた。オステオポンチン発現ベクターを遺伝子導入した細胞では細胞内および培養中のオステオポンチンの発現量が上昇していた。c) オステオポンチンを強制発現したHSC-3細胞はコントロールベクター (CONT) を遺伝子導入した細胞に比べシスプラチンに抵抗性を示した。d) HSC-3にコントロールsiRNA (CONT) またはオステオポンチン特異的なsiRNA (siOPN) を遺伝子導入し、オステオポンチンmRNAの発現をリアルタイムPCRにて調べた。オステオポンチン特異的なsiRNAを遺伝子導入した細胞では、オステオポンチンmRNAの発現が著しく低下していた。e) オステオポンチンの発現を抑制したHSC-3細胞ではシスプラチンに対する抵抗性が減少した。

4. OPNの抗アポトーシス効果とAKTの活性

SAS細胞を用いてOPNによるAKTの活性と活性型PARPの発現を調べた。SAS細胞にOPN発現ベクターあるいはコントロールベクターを遺伝子導入し、3 µg/ml CDDPで18時間処理した。オステオポンチン遺伝子導入細胞では

コントロールに比べAKTの活性が上昇し活性型PARPの発現が抑制されていた (Fig. 4a)。さらにCDDP処理前にPI3K阻害剤LY294002で3時間前処置したところ、OPN導入細胞でもPARPの活性はコントロールと同程度に減弱した (Fig. 4b)。

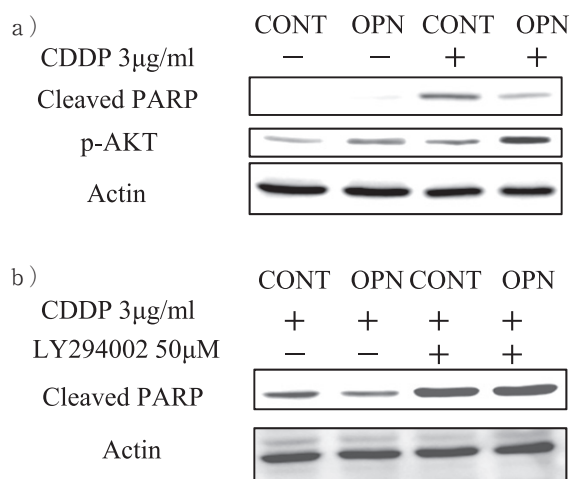


Fig. 4 オステオポンチンのシスプラチン耐性における分子メカニズム

a) SAS細胞に対しオステオポンチン (OPN) を遺伝子導入し24時間培養した後に、3 μg/mlのCDDPで18時間処理して、活性型PARPの発現とAKTの活性を調べた。オステオポンチンを強制発現した細胞ではコントロールに比べ、活性型PARPの発現の減少およびAKT活性の上昇が認められた。b) シスプラチン処理前に50 μMのLY294002を3時間処理すると、オステオポンチンの発現による活性型PARPの発現量の差が消失した。

考 察

がん細胞のCDDP耐性に関して、これまでに、薬剤の細胞外への排除機構の亢進、DNA修復の亢進、アポトーシス経路の異常や、細胞の生存活性の亢進など、様々なメカニズムが示されている。MDR1 (multidrug resistance protein 1, P糖蛋白質) は、小腸、血液脳関門などに分布し、細胞の中から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、抗腫瘍剤を細胞外に排出し、腫瘍細胞を抗腫瘍剤耐性にする薬剤耐性因子として作用することが示され、抗がん剤耐性メカニズムに深く関与していることが報告されている。しかし、今回の実験においては、シングルセルクロニングで得られたすべての細胞株においてMDR1タンパク質の発現は低く、CDDP処理後でも亢進はみられなかった (データ未掲載) ことから、口腔扁平上皮癌細胞株HSC-3においてはシスプラチン耐性機構にMDR1の関与は少ないことが示された。実際に、MDR1が各種の薬物処置ストレスに反応し、誘導されるストレス蛋白であるという報告や⁵⁾、膀胱がん患者に対し、抗がん剤暴露後にMDR1が上昇しているとの報告⁶⁾がある。次に、シングルセルクロニング法で樹立した感受性株と耐性株の特性の違いについて検討した。アポトーシスを阻害する因子であるAKTは、多くの癌で活性化され、薬剤耐性の発現を促すと考えられている⁷⁻⁹⁾。著者の実験系においてもAKTの活性がCDDP抵抗性に関連している可能性が考えられることから、Western blottingによりAKTの活性化と活性型PARPの発現について検討した。アポトーシスを

誘導するような刺激を受けた時には、細胞内でカスパーゼが活性化して最終的にPARPが活性化され、この活性型PARPの発現量はアポトーシスの一つの指標として知られている¹⁰⁾。

CDDP処理を行った耐性株HSC-3-8における活性型PARPは感受性株であるHSC3-10に比べて発現が低く、AKTの活性化は感受性株に比べて高かった。またAKTの上流に位置するPI3Kの阻害剤をCDDPと併用すると、HSC-3-8のCDDP抵抗性が消失し、HSC-3-10と同レベルの活性型PARPがみられた。このことは、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。さらに、HSC-3細胞株はヘテロの集団であることが明らかとなった。

OPNは分子量約41kDaの分泌型酸性リン酸化糖たんぱく質で、カルシウムの沈着した骨組織のマトリックスを構成する非コラーゲン性タンパク質として同定され、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¹¹⁾。オステオポンチンは、インテグリンやCD44と結合し骨の再吸収や、創傷治療、免疫機能、血管新生、細胞の生存など多くの機能に関与していることが知られており¹²⁾、腫瘍組織においては肝癌、乳癌、胃癌、卵巣癌と肺癌などで高発現し¹³⁻¹⁸⁾、肺癌において、血清オステオポンチンが高発現している患者は、予後不良という報告がある¹⁹⁾。一方で、頭頸部癌では血清中のオステオポンチン量と予後に関係性はないという報告もみられる²⁰⁾。OPNは前立腺癌を始めとするいくつかの細胞においてAKT活性を亢進するという報告がある²¹⁾。今回の検索では、HSC-3細胞にOPNを過剰発現するとCDDP抵抗性が増し、ノックダウンによりCDDP抵抗性が減弱した。またCDDP抵抗性のオステオポンチン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。このことからオステオポンチンによる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。

さらにOPN遺伝子導入細胞の培養上清中にOPN発現量が著しく増加した。細胞外分泌型のOPNは細胞表面のCD44やインテグリンなどのレセプターを介して細胞内シグナル伝達系のAKT活性化により細胞生存に関与し、MMP-2、9のクリパージにより浸潤増殖に関与しているという報告がある^{17, 22-24)}が抗癌剤耐性機構との関連性については未だ不明な点が多い。今後、分泌型のオステオポンチンがどのようにしてがん細胞の抗がん剤耐性に寄与しているのか、更なる検討が必要であると思われる。

結 論

本研究によって以下のことが明らかとなった。

シングルセルクロニング法で樹立した細胞株では、

MDR1の発現に差は認められず、AKTの活性がCDDP抵抗性に重要であることが示唆された。

オステオポンチンを強制発現した細胞ではCDDPに対して抵抗性を示した。逆にオステオポンチンをknockdownした細胞ではCDDPに対して感受性を示した。オステオポンチンの発現によってCDDPによるPARPの活性が阻害され、AKTの活性が増加した。またPI3K阻害剤を併用するとオステオポンチンの発現によるPARPの活性阻害が消失した。

以上のことより、CDDP内因性耐性遺伝子であるオステオポンチンは、術前のCDDP耐性マーカーとなりうること、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であることが示唆された。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、本研究に数々のご援助、ご協力を頂きました北海道大学大学院歯学研究科口腔病態学講座口腔顎顔面外科学教室ならびに口腔病理病態学教室員各位に厚く御礼申し上げます。

参 考 文 献

- 1) Gottesman MM.: Mechanisms of cancer drug resistance. *Annu Rev Med* 53 : 615-27, 2002.
- 2) Cara A.: Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treatment Reviews* 33 : 9-23, 2007.
- 3) Yamano Y.: Identification of cisplatin-resistance related genes in head and neck squamous cell carcinoma. *J. Cancer* 126 : 437-449, 2010.
- 4) Wittig R.: Candidate genes for cross-resistance against DNA-damaging drugs. *Cancer Res* 62 : 6698-705, 2002.
- 5) Ho RH and Kim RB.: Transporters and drug therapy : implications for drug disposition and disease. *Clin Pharmacol Ther* 78 : 260-77, 2005.
- 6) 根笹 信一, 藤広 茂, 出口 隆, 河田 幸道, 川本 正吾, 玉木 正義, 山田 伸一郎, 岡野 学: 膀胱癌における抗癌剤投与によるMDR1遺伝子発現誘導の解析. : 泌尿器科紀要 43 : 626-636, 1997.
- 7) Hafsi S, Pezzino FM, Candido S, Ligresti G, Spandidos DA, Soua Z, McCubrey JA, Travalì S, Libra M.: Gene alterations in the PI3K/PTEN/AKT pathway as a mechanism of drug-resistance (Review) *Int J Oncol* 40 : 639-644, 2012.
- 8) Jin W, Wu L, Liang K, Liu B, Lu Y, Fan Z.: Roles of the PI-3K and MEK pathways in Ras-mediated chemoresistance in breast cancer cells. *Br J Cancer* 89 : 185-91, 2003.
- 9) Page C, Lin HJ, Jin Y, Castle VP, Nunez G, Huang M and Lin J.: Overexpression of Akt/AKT can modulate chemotherapy-induced apoptosis. *Anticancer Res* 20 : 407-416, 2000.
- 10) Boulares H, Yakovlev A, Ivanova V, Stoica B, Wang G, Iyer S, Smulson M.: Role of Poly (ADP-ribose) Polymerase (PARP) Cleavage in apoptosis. *J Biol Chem* 33 : 22932-40, 1999.
- 11) Buback F, Renkl A, Schulz G, Weiss J.: Osteopontin and the skin : multiple emerging roles in cutaneous biology and pathology. *Experimental Dermatology* 18 : 750-759, 2009.
- 12) Butler WT.: Structural and functional domains of osteopontin. *Ann N Y Acad Sci* 760 : 6-11, 1995.
- 13) Gillespie MT, Thomas RJ, Pu ZY, Zhou H, Martin TJ, Findlay DM.: Calcitonin receptors, bone sialoprotein and osteopontin are expressed in primary breast cancers. *Int J Cancer* 73 : 812-5, 1997.
- 14) Ue T, Yokozaki H, Kitadai Y, Yamamoto S, Yasui W, Ishikawa T.: Co-expression of osteopontin and CD44v9 in gastric cancer. *Int J Cancer* 79 : 127-32, 1998.
- 15) Kim JH, Skates SJ, Ueda T, Wong KK, Schorge JO, Feltmate CM, et al.: Osteopontin as a potential diagnostic biomarker for ovarian cancer. *JAMA* 287 : 1671-79, 2002.
- 16) Gu T, Ohashi R, Cui R, Tajima K, Yoshioka M, Iwakami S, Sasaki S, Shinohara A, Matsukawa T, Kobayashi J, Inaba Y, Takahashi K.: Osteopontin is involved in the development of acquired chemoresistance of cisplatin in small cell lung cancer. *Lung Cancer* 66 : 176-183, 2009.
- 17) Zhang R, Pan X, Huang Z, Weber G, Zhang G.: Osteopontin Enhances the Expression and Activity of MMP-2 via the SDF-1/CXCR4 Axis in Hepatocellular Carcinoma Cell Lines. *PLoS ONE* 6 : e23831, 2011.
- 18) Cao D, Li Z, Jiang X, Lum Y, Khin E, Lee N, Wu G, Luk J.: Osteopontin as potential biomarker and therapeutic target in gastric and liver cancers. *World J Gastroenterol* 18 : 3923-3930, 2012.
- 19) Zhao B, Sun T, Meng F, Qu A, Shen H, Jin Y, Li W.: Osteopontin as a potential biomarker of proliferation and invasiveness for lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 137 : 1061-70, 2011.
- 20) Lim A, Rischin D, Fisher R.: Prognostic Significance of Plasma Osteopontin in Patients with Locoregionally Advanced Head and Neck Squamous Cell Carcinoma

- Treated on TROG 02.02 Phase III Trial. Clin Cancer Res 18 ; 301-7, 2011.
- 21) Robertson B, Chellaiah M.: Osteopontin Induces β -Catenin Signaling Through Activation of Akt In Prostate Cancer Cells. Exp Cell Res 316 : 1-11, 2010.
- 22) Tajima K, Ohashi R, Sekido Y, Hida T, Nara T, Hashimoto M, Iwakami S, Minakata K, Yae T, Takahashi F, Saya H and Takahashi K.: Osteopontin-mediated enhanced hyaluronan binding induces multidrug resistance in mesothelioma cells. Oncogene 29 : 1941-1951, 2010.
- 23) Cui R, Takahashi F, Ohashi R, Gu T, Yoshioka M, Nishio K.: Abrogation of the interaction between osteopontin and α v β 3 integrin reduces tumor growth of human lung cancer cells in mice. Lung Cancer 57 : 302-10, 2007.
- 24) Lee JL, Wang MJ, Sudhir PR, Chen GD, Chi CW, Chen JY.: Osteopontin promotes integrin activation through outside-in and inside-out mechanisms : OPN-CD44V interaction enhances survival in gastrointestinal cancer cells. Cancer Res 67 : 2089-97, 2007.

ORIGINAL

Osteopontin is a new marker for predicting sensitivity to cisplatin and has potential applications as a chemotherapeutic target.

Keita Kashiwao

ABSTRACT : [Background] Resistance to cisplatin (CDDP) is a major obstacle to the successful treatment of oral squamous cell carcinomas (OSCC). Anti-cancer drug resistance genes can be divided into intrinsic and acquired, and there are studies targeting acquired resistance genes, but few studies of intrinsic resistance genes. Previously we have established the CDDP-resistant (HSC-3-6, 8) and sensitive cell lines (HSC-3-9, 10) by single cell cloning, and identified candidates for intrinsic resistance genes before. This study investigated the relationship between cisplatin resistance and osteopontin which is one intrinsic resistance gene candidate.

[Materials and methods] AKT activation and apoptosis in the CDDP-resistant and sensitive cell lines were examined with Western blot analysis. The chemosensitivity of the HSC-3 and SAS cells with osteopontin (OPN) transfected or downregulated was measured by the MTS assay.

[Results] The AKT activation in the CDDP resistant cell line was stronger with the CDDP treatment than in the CDDP sensitive cell line. The PI3K inhibitor was able to cancel the tolerance of the resistance cell line. The OPN expression level was related to chemosensitivity by using the overexpression and knockdown method in HSC-3 and SAS cells and the PI3K inhibitor decreased resistance caused by OPN overexpression.

[Discussion and conclusions] The activation of AKT is a mechanism of the CDDP resistance and OPN is related to chemoresistance through AKT activation. The OPN offers the potential for predicting the efficacy of cisplatin-based chemotherapy and in the treatment of OSCC.

Key Words : Cisplatin, Osteopontin, Drug resistance.