



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	口腔癌におけるPTP4A1 のシスプラチン内因性耐性メカニズム
Author(s)	岡田, 知之
Citation	北海道歯学雑誌, 33(2), 111-120
Issue Date	2013-03
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/52450
Type	journal article
File Information	07-okada.pdf



原 著

口腔癌におけるPTP4A1 のシスプラチン内因性耐性メカニズム

岡 田 知 之

抄 録：シスプラチンは頭頸部癌の治療で最も一般的に用いられる薬剤である。しかし、時に期待した治療効果が得られないケースがあり、それを予測することは困難である。抗癌剤耐性遺伝子には、細胞内で元来発現は低い、抗癌剤に暴露されたときに反応性に発現が上昇して耐性の原因となる獲得性耐性遺伝子と、元来発現が高くそれが原因で耐性を示す内因性耐性遺伝子の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その癌のシスプラチン感受性を評価するマーカーをみつけるため内因性耐性遺伝子のみを同定し、いくつかの耐性遺伝子の候補を見出した。そのうち、チロシンフォスファターゼのひとつであるPTP4A1 (Protein Tyrosine Phosphatase type 4A1) 遺伝子に着目し実験を行った。

樹立した耐性株と感受性株でPTP4A1 mRNAの発現を比較したところ、耐性細胞株では感受性細胞株にくらべPTP4A1の発現量が高かった。次に、PTP4A1を過剰発現させた細胞及びknockdownさせた細胞を用いて、PTP4A1の発現とシスプラチン感受性について検討したところ、過剰発現した細胞はシスプラチン抵抗性が上昇し、knockdownした細胞ではシスプラチン抵抗性が減弱した。

生存シグナルであるAKTのリン酸化とアポトーシスシグナルであるcleaved PARPをWestern blottingで検索したところ、PTP4A1を過剰発現させるとAKTのリン酸化が上昇し、シスプラチン存在下でもAKTのリン酸化は高く、cleaved PARPは減少した。逆にPTP4A1をknockdownさせるとAKTのリン酸化の低下とcleaved PARPの増加を認めた。

以上の所見は、PTP4A1がシスプラチン耐性に関連する遺伝子で、そのメカニズムにはAKTのリン酸化が重要であることが示唆された。

キーワード：シスプラチン、PTP4A1、薬剤耐性

緒 言

口腔癌の標準的治療は根治性の観点から手術による外科的切除が中心であるが、進行癌に対して外科的切除による広範囲な浸襲は、口腔機能及び審美性に多大なる影響を及ぼし、患者のQOLの著しい低下を招く。近年では手術前に化学療法を行い、がんを縮小させて口腔の機能温存を期待する術前化学療法を手術に併用する場合が増加しており、シスプラチンはその中心的薬剤の一つである。その主な作用はDNAに直接結合して複合体を形成し、細胞分裂や転写などの細胞の生存に必要な働きを阻害することで、アポトーシス経路を活性化する¹⁻⁴⁾。しかしながら、シスプラチンに対して抵抗性を示す腫瘍が存在し、抗癌剤治療の障害となっている。さらに、腫瘍の抗癌剤感受性または耐性は、実際に治療を行なって初めて明らかとなり、不

要な治療や予期せぬ副作用を避けるためにも、抗癌剤に対する感受性を予測できるシステムの構築は大きな意義をもつ。

抗癌剤に対する抵抗性の一つの原因として、耐性遺伝子の発現上昇が知られている。耐性遺伝子には内因性耐性遺伝子と獲得性耐性遺伝子の2種類が存在し^{5,6)}、それらは分けて考える必要がある。内因性耐性遺伝子とは、癌細胞内で本質的に発現が亢進しており、それによって腫瘍が耐性を示すような遺伝子である。それに対し獲得性耐性遺伝子は、元来癌細胞内で発現が低い、抗癌剤で処理されると発現が上昇し、それが耐性に寄与する遺伝子である。抗癌剤耐性遺伝子を検索する一般的な方法は、まず細胞株を抗癌剤で処理し、生き残った細胞を耐性細胞株として樹立する。そして耐性株と親株の遺伝子発現を比較して、耐性株で強く発現しているものを耐性遺伝子とする方法である。

が、この方法で同定された遺伝子は、内因性かあるいは獲得性かは不明である。術前の抗癌剤感受性予測マーカーを検索する場合、獲得性耐性遺伝子ではその要件を満たさず、内因性耐性遺伝子のみを同定する必要がある。そこで、ヒト口腔がん細胞株HSC-3よりシングセルクローニングを行い内因性耐性遺伝子のみを検索できる実験方法を考案し、シスプラチン耐性を術前に予測できるマーカーの検索を目的として研究を行ってきた。

口腔病理病態学教室では、以前にヒト口腔がん細胞株HSC-3よりシングセルクローニング法で、シスプラチン感受性株および耐性株を樹立した。培養細胞はヘテロの集団で、そこからシングセルクローニング法によって細胞を分離し、そのひとつの細胞から細胞株を樹立すると、それぞれわずかに異なる性質をもつ細胞株を得ることができる。実際にそれぞれの細胞株にシスプラチンを作用させると、生き残る細胞数が異なった。次に、それぞれの細胞株の遺伝子の発現をマイクロアレイによって検索し、シスプラチンの抵抗性を示す細胞株では多く発現し、感受性を示す細胞では発現が低い遺伝子を検索することで、幾つかの内因性耐性遺伝子の候補を同定した（北村、投稿中）。そのうちのひとつであるPTP4A1遺伝子について解析を行った。

PTP4A1 (Protein Tyrosine Phosphatase type 4A1) 別名PRL-1は、チロシンフォスファターゼのひとつであり、肝臓の再生時に発現が上昇するタンパク質として同定された。その後正常組織の脳や、消化管上皮に発現を認め、また、いくつかの腫瘍組織において発現が亢進し^{6,7)}、PTP4A1の過剰発現が細胞増殖の亢進や転移に関与するという報告がある⁸⁻¹³⁾。著者が渉猟した限りではPTP4A1の発現量と抗癌剤耐性の関係を示した報告はなく、今回PTP4A1のシスプラチンに対する耐性機序について検討することとした。

材料及び方法

1) 腫瘍細胞および培養条件

ヒト口腔がん細胞株HSC-3およびSAS細胞を用いた。細胞は37℃、5% CO₂下において10%牛胎子血清 (FBS) 含有Dulbeccos modified Eagles medium (DMEM) を用いて培養した。なおHSC-3、SAS細胞は理化学研究所 (Tsukuba, Japan) から分与された。

2) PTP4A1発現プラスミドとPTP4A1 siRNAのトランスフェクション

PTP4A1発現プラスミドはEGFP C1ベクターのマルチクローニングサイトにPTP4A1遺伝子の全長を挿入して作成した。コントロールとして、EGFPC1ベクターを使用した。細胞内への遺伝子導入にはHilymax (Dojin, Japan) を使用した。またsiRNAによるknockdown法はPTP4A1に特異的なsiRNA (Qiagen, USA) を用い、遺伝子導入試薬と

してHiperfect (Qiagen, USA) を用いた。

3) リアルタイムRT-PCR

それぞれの細胞からRNeasy Mini Kit (QIAGEN) 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。

PTP4A1 forward; 5'-ATC CAA CCA ATG CGA CCT TA -3', reverse; 5'-AAG GCC AAT CAA GAA CAT GG-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、イニシヤルインキュベーション (95℃ 1分)、熱変性 (95℃ 15秒)、アニーリング (56℃ 15秒)、伸長反応 (72℃ 15秒) で40サイクル行い、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) MTS assay

MTS reagent (Promega) を使用して細胞増殖能を解析した。培地に懸濁した1穴あたり3×10³個のHSC-3細胞またはSAS細胞を96穴プレートに播種し、十分な接着を確認した後、EGFP-PTP4A1発現ベクターもしくはコントロールベクターを遺伝子導入し、48時間後MTS reagentを2時間反応させ、490nmで吸光度を測定した。また、シスプラチンに対する抵抗性を調べた実験では、同様に遺伝子導入をおこない18時間後に各濃度のシスプラチンで48時間処理し、MTS reagentを加えて2時間反応させ、490nmで吸光度を測定した。

5) Western blotting

それぞれの細胞培養液中にCDDP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, MO, 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, MA, USA) に転写した。一次抗体として抗PARP, 抗Cleaved PARP, 抗p-AKT, 抗EGFR, 抗EGFR pTy1045, 抗p-PTEN (Cell Signaling Technology, USA), 抗EGFP, 抗β-actin (Santa Cruz Biotechnology, USA) 抗体を用い、二次抗体にはHRP標識抗マウスIgG抗体もしくはHRP標識抗ラビットIgG抗体 (Pierce, USA) を用い、SuperSignal West Femto detection kit (Pierce, IL, USA) にて検出を行った。

6) Confocal laser scanning microscope

滅菌したカバーガラス上にSAS細胞を播種し、24時間後にEGFPC1ベクターまたはEGFP-PTP4A1ベクターを遺伝子導入した。48時間後に4% paraform aldehydeにて20分間固定し、DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) を用いて核を染色した後、Confocal laser scanning microscope (Olympus, Japan) にて観察した。

結 果

1) PTP4A1と細胞増殖

Western blottingで使用可能な抗PTP4A1抗体がなかったため、EGFP C1ベクターにPTP4A1の遺伝子を組み込み、PTP4A1発現ベクターを作成した。ヒト口腔扁平上皮癌細胞株であるHSC-3細胞にPTP4A1発現プラスミドを遺伝子導入し、PTP4A1のmRNA及びタンパク発現をリアルタイムPCR及びWestern blottingにて調べた。遺伝子導入を行った細胞ではコントロール細胞に比べ、PTP4A1のmRNAは約35倍に上昇していた (Fig. 1a)。またEGFP-PTP4A1タンパク質の発現は抗EGFP抗体にて明瞭なバンドを得た (Fig. 1b)。同様の結果はヒト口腔扁平上皮癌細胞株であるSAS細胞でも得られた (Fig. 1c)。またPTP4A1

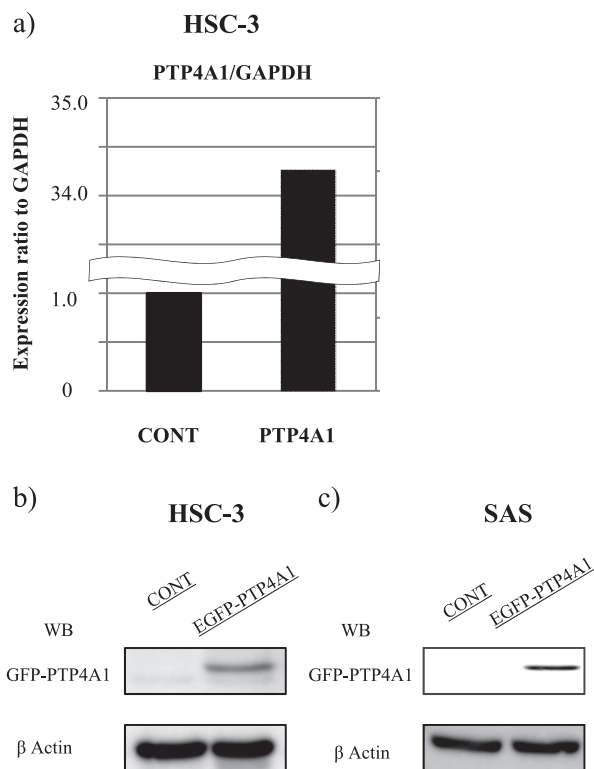


Fig. 1 PTP4A1発現ベクターの確認

HSC-3細胞およびSAS細胞にコントロールベクター (CONT) またはEGFP-PTP4A1発現ベクターを遺伝子導入した。mRNAの発現はリアルタイムPCRで、タンパク質の発現は抗EGFP抗体を用いてWestern blottingにて調べた。どちらの細胞においても発現ベクターはタンパク質を発現していた。

の強制発現による細胞為害性について調べるために、HSC-3細胞およびSAS細胞にPTP4A1もしくはコントロールベクターを遺伝子導入しMTS assayにて細胞増殖能を調べた。どちらの細胞株においても遺伝子導入後2日目にはPTP4A1を遺伝子導入した細胞はコントロールに比べ細胞数の増加がみられた (Fig. 2a, b)。

2) PTP4A1とシスプラチン抵抗性

次にPTP4A1とシスプラチン抵抗性について検討した。

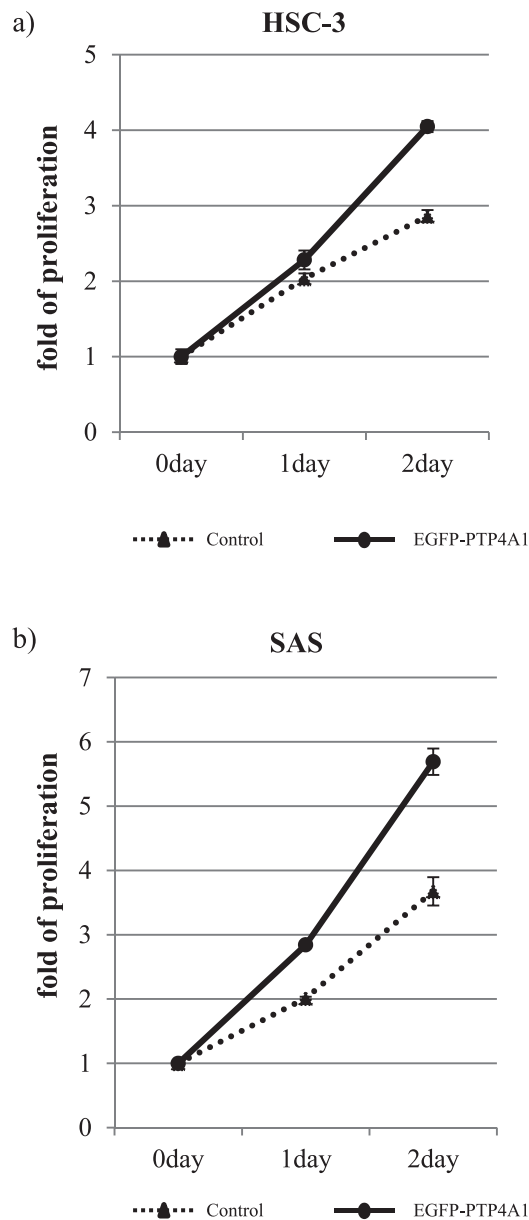


Fig. 2 PTP4A1の発現による細胞増殖

HSC-3、SAS細胞にコントロールベクター (Control) またはEGFP-PTP4A1発現ベクターを遺伝子導入し、細胞数をMTS assayにて調べた。どちらの細胞においてもPTP4A1を強制発現した細胞は増殖が亢進し、PTP4A1の強制発現によって細胞死は誘導されないことが明らかとなった。

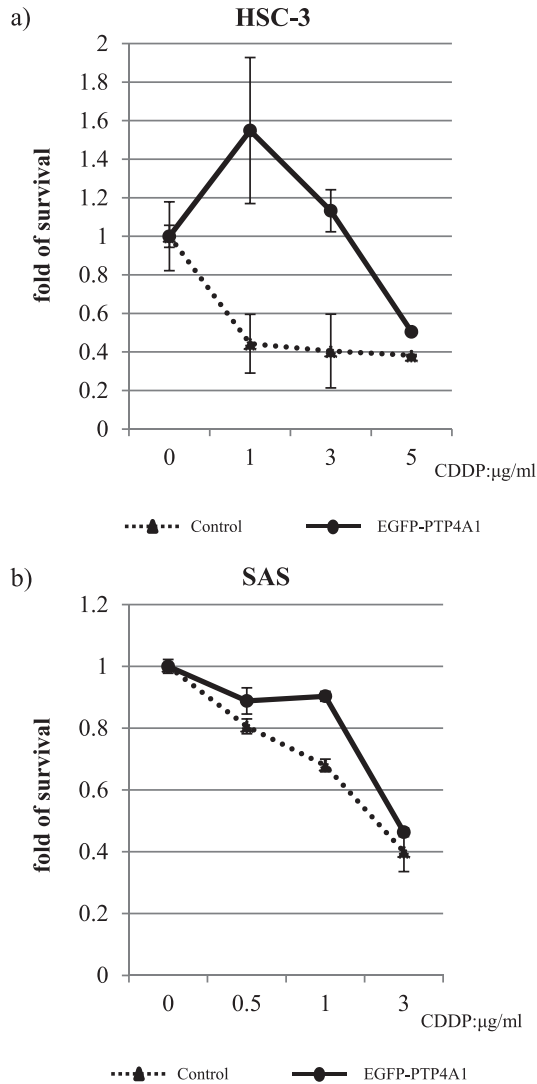


Fig. 3 PTP4A1の発現とシスプラチンによる細胞死

HSC-3, SAS細胞にコントロールベクター (Control) またはEGFP-PTP4A1発現ベクターを遺伝子導入し、各濃度のシスプラチンで18時間処理し、細胞数をMTS assayにて調べた。どちらの細胞においてもPTP4A1を強制発現した細胞はシスプラチンに抵抗性を示した。

HSC-3細胞及びSAS細胞にEGFP-PTP4A1またはコントロールベクターを遺伝子導入し、様々な濃度のシスプラチンで処理し、48時間後に生細胞数をMTS assayで調べた。HSC-3細胞では1および3 $\mu\text{g/ml}$ のシスプラチン濃度、SAS細胞では0.5および1.0 $\mu\text{g/ml}$ のシスプラチン濃度において、PTP4A1を遺伝子導入した細胞ではコントロールに比べ抵抗性を示した (Fig. 3a, b)。

3) PTP4A1によるapoptosis阻害

PTP4A1によるシスプラチン抵抗性がアポトーシスによるものかを調べるため、cleaved PARPについて検討した。HSC-3細胞にEGFP-PTP4A1またはコントロールベクターを遺伝子導入し、シスプラチンにて処理を行って

cleaved PARPの発現をWestern blottingにて調べた。PTP4A1を強制発現したHSC-3細胞ではコントロールに比べ、12時間後及び24時間後で、cleaved PARPの発現が減少し (Fig. 4a)、SAS細胞でもPTP4A1を強制発現させた細胞ではcleaved PARPの発現が、コントロールに比べ減少していた (Fig. 4b)。逆に、PTP4A1をsiRNAにてknockdownさせたHSC-3細胞では、5および10 $\mu\text{g/ml}$ のシスプラチン濃度においてcleaved PARPの発現はコントロールに比べ上昇していた (Fig. 4d)。なおPTP4A1に対するsiRNAの抑制効果はリアルタイムPCRにて確認した (Fig. 4c)。

4) PTP4A1によるAKTのリン酸化阻害

シングルセルクローニングによって樹立した耐性株においてAKTのリン酸化が亢進していたことから (柏尾, 投稿中)、PTP4A1とAKTのリン酸化について検索した。HSC-3細胞にPTP4A1またはコントロールベクターを遺伝子導入し、5 $\mu\text{g/ml}$ のシスプラチンで18時間処理した。PTP4A1を遺伝子導入した細胞ではコントロールに比べ、シスプラチン未処理においてAKTのリン酸化の発現が高く、シスプラチンで処理してもコントロールに比べそのリン酸化は高かった。またFig. 3a同様にPTP4A1の発現によって、cleaved PARPの発現は減少していた (Fig. 5a)。逆にHSC-3細胞にsiRNAを遺伝子導入しPTP4A1の発現を抑制した細胞を用い、同様の実験を行った。PTP4A1の発現を抑制した細胞ではシスプラチン10 $\mu\text{g/ml}$ の濃度でコントロールに比べAKTのリン酸化は低かった。またcleaved PARPの発現はFig. 4d同様に増加していた (Fig. 5b)。

5) AKTの上流タンパク質の検索

AKTの上流にはEGFRを始めとする多くの膜タンパク質があることから、PTP4A1の局在について検討した。EGFPC1ベクターまたはEGFP-PTP4A1発現ベクターをSAS細胞に遺伝子導入し、EGFP-PTP4A1の局在をConfocal laser scanning microscopeにて観察した。EGFPC1は核および細胞質に分布しているのに対し、EGFP-PTP4A1は細胞膜および細胞質に分布しており、細胞膜に強く局在することが明らかとなった (Fig. 5c)。AKTの上流に位置し、細胞質にもみられるタンパク質としてEGFRとPTENの活性化を、SAS細胞を用いてWestern blottingにて調べた。EGFRの1045番目のチロシンおよびPTENのリン酸化はシスプラチンによってわずかに上昇したが、PTP4A1の発現による影響はみられなかった (Fig. 5d)。

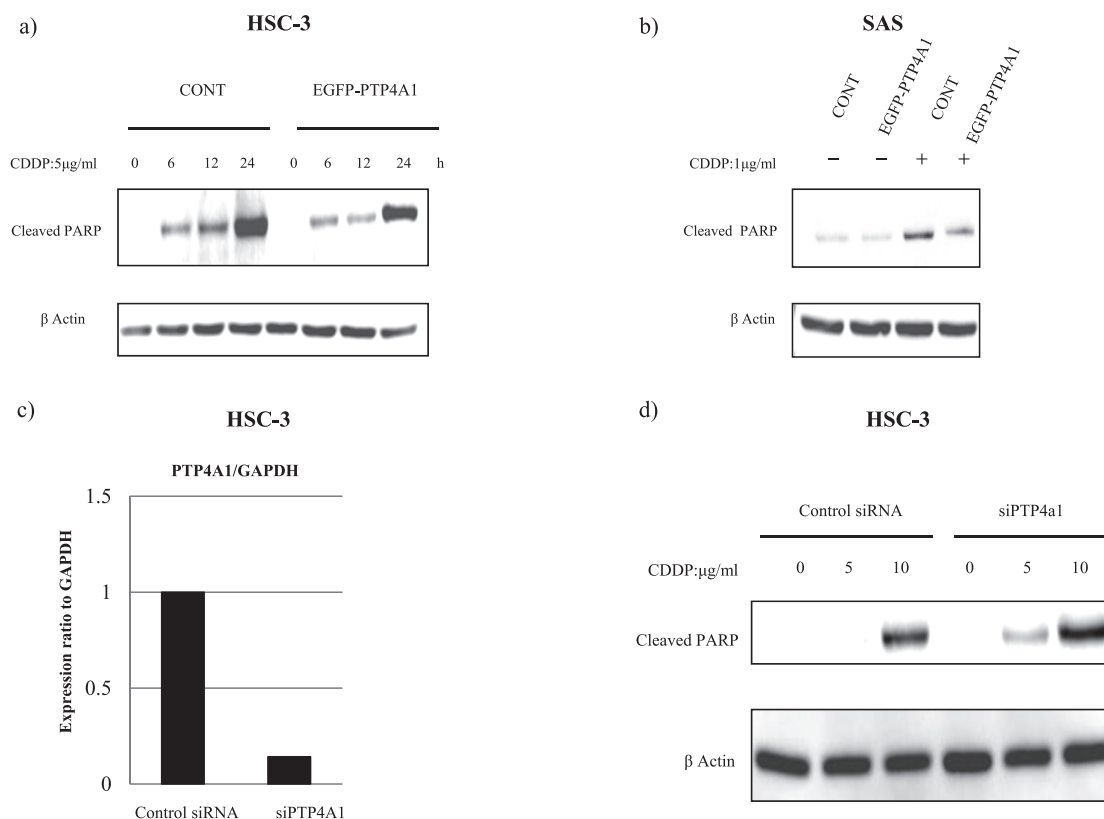


Fig. 4 PTP4A1によるアポトーシス阻害

a) HSC-3細胞にコントロールベクター (CONT) またはEGFP-PTP4A1発現ベクターを遺伝子導入し、5 μg/mlのシスプラチンで処理し、cleaved PARPの発現をWestern blottingで調べた。PTP4A1を発現した細胞では、コントロールに比べcleaved PARPの発現が抑制されていた。b) EGFR-PTP4A1またはコントロールベクターを遺伝子導入したSAS細胞をシスプラチンにて18時間処理した。同様の結果がSAS細胞でも得られた。c, d) PTP4A1に対するsiRNAを用いて、同様の実験を行った。c) PTP4A1特異的なsiRNAはPTP4A1のmRNAの発現を約10%にまで減少させた。d) HSC-3細胞にコントロールsiRNAまたはPTP4A1特異的なsiRNAを遺伝子導入し、5 または10 μg/mlのシスプラチンで18時間処理し、cleaved PARPの発現をWestern blottingで調べた。PTP4A1の発現を抑制した細胞では、コントロールに比べcleaved PARPの発現が上昇した。

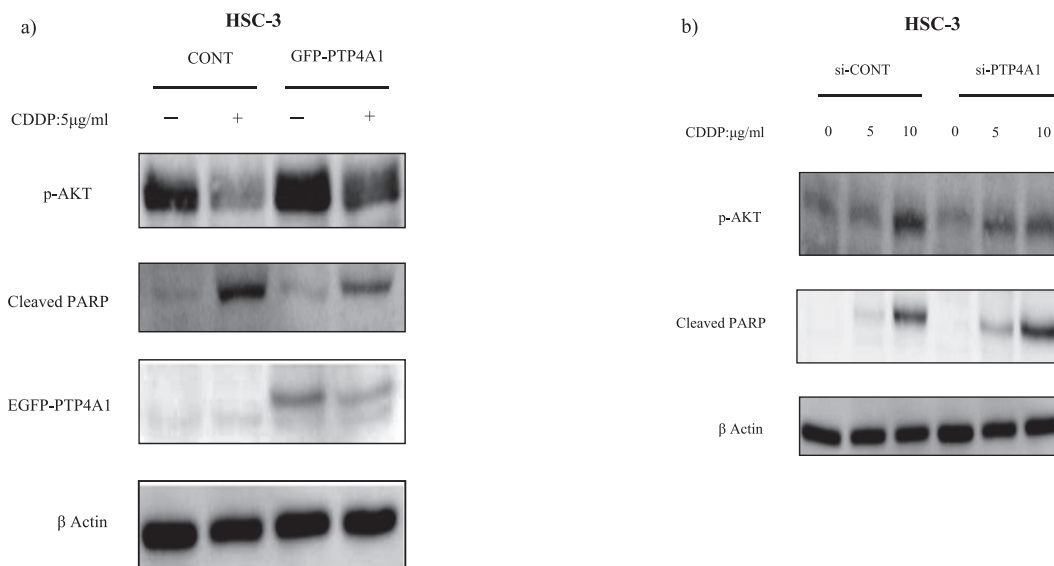


Fig. 5 PTP4A1の耐性メカニズム

a) 各遺伝子を導入したHSC-3細胞はシスプラチンで18時間処理後、AKTのリン酸化とcleaved PARPの発現をWestern blottingにて調べた。PTP4A1を発現した細胞ではシスプラチン未処理においても、AKTのリン酸化は上昇し、シスプラチンで処理してもコントロールに比べその活性は高かった。b) PTP4A1の発現を抑制した細胞では、シスプラチン10mg/mlの濃度でコントロールに比べAKTのリン酸化は低かった。

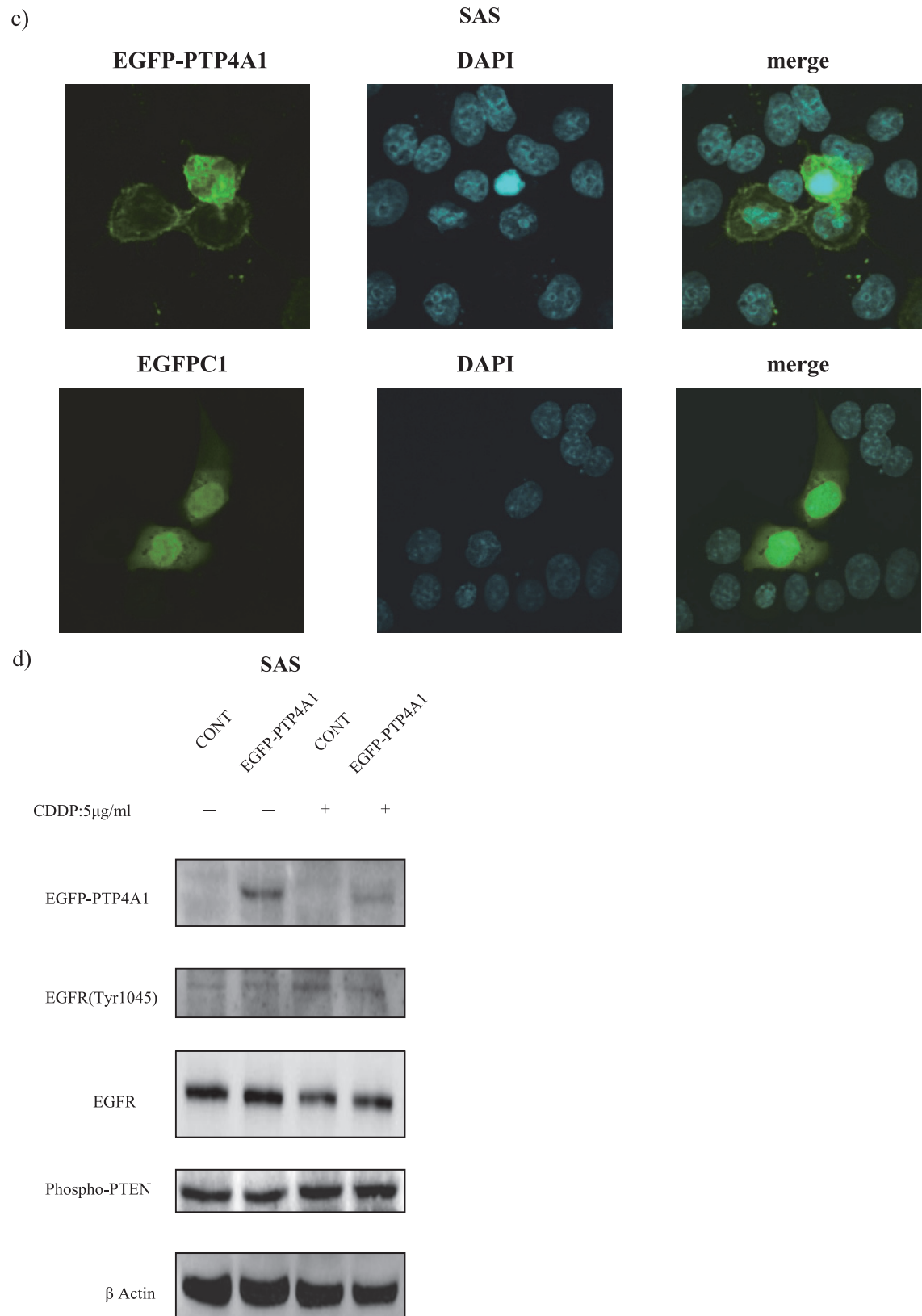


Fig.5 PTP4A1の耐性メカニズム

c) SAS細胞にEGFP-PTP4A1またはEGFPC1を遺伝子導入し、Confocal laser scanning microscopeで局在を調べた。EGFPC1は核および細胞質に分布しているのに対し、GFP-PTP4A1は細胞膜および、細胞質に分布しており細胞膜に強く局在していた。d) SAS細胞にコントロールベクターまたはEGFP-PTP4A1発現ベクターを遺伝子導入し、5 μg/mlのシスプラチンで処理し、EGFRの1045番目のチロシンのリン酸化とPTENのリン酸化について検討したが、それらの活性にはPTP4A1は関与していなかった。

考 察

本研究では、PTP4A1の発現がシスプラチンに対して抵抗性を示し、そのメカニズムにAKTが関わっていることが示された。シスプラチンは多くの固形がんに対して用いられており、その主な機序は、DNAと水素結合し、転写や細胞分裂などを阻害してアポトーシスを誘導する^{4,5)}。しかし、脱核した近位尿管細胞においても、シスプラチンの処理によりCaspase-3活性化され細胞死が生じることが知られており¹⁴⁾、シスプラチンの作用について未だ不明な点も多い。

シスプラチンに対して抵抗性を示す腫瘍が存在し、抗癌剤治療において大きな障害となっている。耐性の機序には、シスプラチンの細胞内への流入異常、DNAへの結合阻害、DNA損傷の認識異常、その後のアポトーシス経路の阻害などが示唆されている¹⁵⁾。さらにシスプラチンの経路とは直接関係しない、EGFRやERBB2などの高発現による細胞内の潜在的な抗アポトーシス経路の活性化も知られており^{16,17)}、多くの因子が耐性に関与していると考えられている。このように耐性に関する多くの研究がなされ、様々な耐性遺伝子が同定されたが、一方ではそれらの耐性遺伝子の発現と実際の腫瘍に相関がみられないという報告が少なからずみられる¹⁸⁾。

現在のところ、腫瘍が抗癌剤に対して耐性をもつかどうかは、実際に抗癌剤治療を行ってみなければわからない。不必要な治療と副作用の惹起の可能性を避けるには、術前に抗癌剤使用の可否を判断する必要がある。その一つの方法として耐性遺伝子の同定が挙げられるが、耐性遺伝子は内因性耐性遺伝子と獲得性耐性遺伝子を区別して考える必要がある。前者は元来細胞内で高発現している遺伝子で、それが原因で耐性を示すものであり、後者は、元来細胞内で発現は低いが、抗癌剤に晒されて反応性に発現が上昇し、それが原因で耐性を示すものである。多くの耐性遺伝子の研究では、まず親株に抗癌剤で処理して生き残った細胞を耐性株として樹立し、次に親株と耐性株の遺伝子発現を比較し、耐性株で多く発現しているものを耐性遺伝子として同定してきた。しかし、この方法では、同定された耐性遺伝子が内因性か獲得性かは明らかではない。また、抗癌剤で処理して生き残った細胞は、自らの多くの遺伝子発現を変化させて抗癌剤ストレスに適応すると考えられる。このため、従来の方法で候補となった耐性遺伝子の多くは獲得性耐性遺伝子となることが想像できる。これが先に述べた耐性遺伝子の発現と実際の腫瘍に相関がみられないという報告の理由であり、著者が目的としている術前に耐性予測を可能にするためには、内因性耐性遺伝子のみを同定する必要であると考えた。Lippertらは内因性耐性遺伝子の同定には、実際の患者の組織を使うしか方法がないと述べているが¹⁸⁾、この方法では患者個人の遺伝子レベルの違い

を考慮する必要がある。シングルセルクローニング法で樹立した幾つかの細胞株は、親株が同じ細胞であるため、上記の問題は少ないと考えられる。

口腔病理病態学教室では、ヒト口腔癌細胞株HSC-3からシングルセルクローニングによって樹立した同系の細胞株を用いて、マイクロアレイにより遺伝子の発現量を比較した。その結果いくつかの耐性遺伝子の候補を同定した（北村、投稿中）。本研究では、そのうちのひとつであるPTP4A1遺伝子について解析を行った。

PTP4A1は、転移や、細胞増殖能を亢進させ、癌の悪性度に関与すると以前より報告があることや、アミノ酸配列からチロシンフォスファターゼのひとつとしてタンパク質リン酸化の調節の役割を果たす酵素であると考えられているが、PTP4A1のターゲットは未だに明らかとなっていないため、PTP4A1とシスプラチンの感受性および耐性機序について解析を行った。著者が行った実験では、PTP4A1を強制発現させた口腔がん細胞株HSC-3、SAS細胞において細胞増殖能が高く、小細胞肺癌細胞株においてPTP4A1の発現が細胞増殖能の調節に関与するという報告^{8,12)}と一致し、PTP4A1がシスプラチン耐性以外にも細胞増殖能を亢進させて悪性度を増加していると考えられた。PTP4A1を強制発現させたHSC-3細胞ではシスプラチンに対して抵抗性を示し、SAS細胞でも同様にPTP4A1の強制発現によってシスプラチンに抵抗性を示したことから、PTP4A1のシスプラチン抵抗性はHSC-3細胞固有の現象でないことが明らかとなった。

AKTは多くのがん組織において活性が亢進していることが知られている¹⁹⁻²¹⁾。著者は、PTP4A1のシスプラチン耐性のメカニズムを調べるため、細胞生存シグナルであるAKTのリン酸化とアポトーシスシグナルであるcleaved PARPについて解析を行った。HSC-3にPTP4A1を過剰発現させるとAKTのリン酸化が上昇し、シスプラチン存在下でもAKTのリン酸化は高く、cleaved PARPは減少していた。逆にPTP4A1の発現をsiRNAによってノックダウンすると、AKTのリン酸化の低下とcleaved PARPの発現増加を認め、PTP4A1がシスプラチンに対する抵抗性に関与していることが示された。

EGFP-PTP4A1の局在は、細胞質および、細胞膜に存在することから、細胞膜に局在、あるいは細胞膜から細胞質に局在を変化させるタンパク質でAKTの上流に位置するタンパク質がPTP4A1と相互作用するのではないかと考え、PTP4A1の発現とEGFRおよびPTENの活性化について検索した。しかし、それらの活性はPTP4A1の発現とは相関がみられなかった。リン酸化および脱リン酸化は、転写調節、アポトーシス、細胞周期進行、タンパク質分解とタンパク質輸送などの様々なタンパク質の機能的活動に大きな影響を及ぼしている。PTP4A1はそのアミノ酸配列からチロシンフォスファターゼと考えられており⁷⁾、タンパ

ク質リン酸化の調節の役割を果たす酵素であると考えられている。しかし、PTP4A1のターゲットは未だに明らかではなく、今後更なる研究が必要と考えられる。

結 語

本研究により、シングルセルクローニング法を利用した方法で得られたシスプラチン内因性耐性遺伝子の候補遺伝子のなかから、内因性耐性遺伝子PTP4A1を同定することが可能であった。PTP4A1は細胞の増殖活性を亢進し、シスプラチン耐性以外にも癌化を促進する可能性が示唆された。PTP4A1を強制発現したHSC-3およびSAS細胞でシスプラチンに抵抗性を示した。またPTP4A1の発現はシスプラチンによるcleaved PARPの発現を阻害した。またsiRNAによってPTP4A1の発現を阻害すると、cleaved PARPが上昇した。またPTP4A1の発現はAKTのリン酸化を上昇させ、シスプラチン処理を行ってもなお高い活性がみられた。逆にsiRNAでPTP4A1の発現を阻害すると、シスプラチンによるcleaved PARPは上昇し、AKTのリン酸化は減少した。PTP4A1は細胞膜、と核周辺に局在した。

以上のことからPTP4A1はシスプラチン内因性耐性遺伝子と考えられ、患者のシスプラチン投与前のマーカーとなりうる可能性が示唆された。

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構病態学講座口腔顎顔面外科学教室ならびに口腔病理学教室員各位に厚く御礼申し上げます。

参 考 文 献

- 1) Wang X, Martindale JL, Holbrook NJ.: Requirement for ERK activation in cisplatin-induced apoptosis, J Biol Chem 275 : 39435-39443, 2000.
- 2) Horky M, Wurzer G, Kotala V, Anton M, Vojtěšek B, Vacha J, Jozefa WG.: Segregation of nucleolar components coincides with caspase-3 activation in cisplatin-treated HeLa cells, J Cell Sci 114 : 663-670, 2001.
- 3) Licitra L, Grandi C, Guzzo M, Mariani L, Vullo SL, Valvo F, Quattrone P, Valagussa P, Bonadonna G, Molinari R, Cantu G.: Primary Chemotherapy in Resectable Oral Cavity Squamous Cell Cancer: A Randomized Controlled Trial, Journal of Clinical Oncology 21 : 327-333, 2003.
- 4) Wang D, Lippard SJ.: Cellular processing of platinum anticancer drugs, Nat Rev Drug Discov 4 : 307-320, 2005.
- 5) Gottesman MM.: Mechanisms of resistance and toxicity associated with with platinating agents, Cancer Treatment Reviews 33 : 9-23, 2007.
- 6) Gottesman MM.: Mechanisms of cancer drug resistance, Annu Rev Med 53:615-627, 2002.
- 7) Peng Y, Du K, Ramirez S, Diamond RH, Taub R.: Mitogenic Up-regulation of the PRL-1 Protein-tyrosine Phosphatase Gene by Egr-1, J Biol Chem 274 : 4513-4520, 1999.
- 8) Stephens BJ, Han H, Gokhale V.: PRL phosphatases as potential molecular targets in cancer, Mol Cancer 4 : 1653-1661, 2005.
- 9) Achiwa H, Lazo JS.: PRL-1 Tyrosine Phosphatase Regulates c-Src Levels, Adherence, and Invasion in Human Lung Cancer Cells, Cancer Res 67 : 643-650, 2007.
- 10) Sun JP, Luo Y, Yu X, Wang WQ, Zhou B, Liang F, Zhang ZY.: Phosphatase Activity, Trimerization, and the C-terminal Polybasic Region Are All Required for PRL1-mediated Cell Growth and Migration, J Biol Chem 282 : 29043-29051, 2007.
- 11) Luo Y, Liang F, Zhang ZY.: PRL1 promotes cell migration and invasion by increasing MMP2 and MMP9 expression through Src and ERK1/2 pathways, Biochemistry 48 : 1838-1846, 2009.
- 12) Min SH, Kim DM, Heo YS, Kim YI, Kim HM, Kim J, Han YM, Kim IC, Yoo OJ.: New p53 target, phosphatase of regeneratin liver1 (PRL-1) downregulates p53, Oncogene 28 : 545-554, 2009.
- 13) Nakashima M, Lazo JS.: Phosphatase of Regenerating Liver-1 Promotes Cell Migration and Invasion and Regulates Filamentous Actin Dynamics, JPET 334 : 627-633, 2010.
- 14) Bai Y, Luo Y, Liu S, Zhang L, Shen K, Dong Y, Walls CD, Quilliam LA, Wells CD, Cao Y, Zhang ZY.: PRL-1 Protein Promotes ERK1/2 and RhoA Protein Activation through a Non-canonical Interaction with the Src Homology 3 Domain of p115 Rho GTPase-activating Protein, J Biol Chem 86 : 42316-24, 2011.
- 15) Bito T, Sumita N, Ashida M, Budiyo A, Ueda M, Ichihashi M, Tokura Y, Nishigori C.: Inhibition of Epidermal Growth Factor Receptor and PI3K/Akt Signaling Suppresses Cell Proliferation and Survival through Regulation of Stat3 Activation in Human Cutaneous Squamous Cell Carcinoma, J Skin Cancer 874571 : 11, 2010.
- 16) Yu F, Megyesi J, Price PM.: Cytoplasmic initiation of cisplatin cytotoxicity, J Physiol Renal Physiol 295 : F44-F52, 2008.

- 17) Ahsan A, Hiniker SM, Ramanand SG, Nyati S, Hegde A, Helman A, Menawat R, Bhojani MS, Lawrence TS, Nyati MK.: Role of epidermal growth factor receptor degradation in cisplatin-induced cytotoxicity in head and neck cancer, *Cancer Res* 70, 2862-2869, 2010.
- 18) Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I, Michels J, Martins I, Kepp O, Castedo M, Kroemer G.: Molecular mechanisms of cisplatin resistance, *Oncogene* 31 : 1869-83, 2012.
- 19) Gillet JP, Calcagno AM, Varma S, Marino M, Green LJ, Vora MI, Patel C, Orina JN, Eliseeva TA, Singal V, Padmanabhan R, Davidson B, Ganapathi R, Sood AK, Rueda BR, Ambudkar SV, Gottesman MM.: Redefining the relevance of established cancer cell lines to the study of mechanisms of clinical anti-cancer drug resistance, *PNAS* 108 : 18708-18713, 2011.
- 20) Fujiwara K, Iwado E, Mills GB, Sawaya R, Kondo S, Kondo Y.: Akt inhibitor shows anticancer and radiosensitizing effects in malignant glioma cells by inducing autophagy, *Int J Oncol* 31 : 753-760, 2007.
- 21) Claerhout S, Verschooten L, kelst SV, Vos RD, Proby C, Agostinis P, Garmyn M.: Concomitant inhibition of AKT and autophagy is required for efficient cisplatin-induced apoptosis of metastatic skin carcinoma, *Int J Cancer* 127 : 2790-803, 2010.
- 22) Yoon H, Min JK, Lee JW, Kim DG, Hong HJ.: Acquisition of chemoresistance in intrahepatic cholangiocarcinoma cells by activation of AKT and extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2, *Biochem Biophys Res Commun* 405 : 333-337, 2011.

ORIGINAL

The role of PTP4A1 as a cisplatin intrinsic resistance gene in oral cancer

Tomoyuki Okada

ABSTRACT : Cisplatin is one of the most commonly used chemotherapeutic drugs in head and neck cancers. However, cisplatin sensitivity is different for individual cancers and specific prognostic indicator is still unknown. Anti-cancer drug resistance genes are divided into intrinsic and acquired genes, and identification of intrinsic resistance genes will be necessary to become able to predict the sensitivity to cisplatin. We established a cisplatin resistant and sensitive cell lines by a single cell cloning and identified intrinsic resistance genes by DNA microarray, the results suggested that PTP4A1 is a candidate gene as a specific prognostic indicator.

PTP4A1 mRNA was significantly increased in resistant cell lines when compared to sensitive cell lines. Overexpression of PTP4A1 increased the resistance to cisplatin and knockdown of PTP4A1 reduced the resistance. To explore the mechanism of resistance related to PTP4A1, we examined the activity of both PARP and AKT by Western blotting. The activity of AKT was elevated in PTP4A1 overexpressing cells and the activity was persisted in the presence of cisplatin, and overexpression of PTP4A1 inhibited PARP cleavage caused by cisplatin. PTP4A1 knockdown reduced AKT activity and induced PARP cleavage. These results suggest that the PTP4A1 is closely associated with the resistance to cisplatin by regulating the activity of AKT.

Key Words : Cisplatin, PTP4A1, Drug resistance