



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	オステオポンチンの発現は口腔癌患者のシスプラチンに対する抵抗性の予測因子となりうる
Author(s)	上田, 倫弘
Citation	北海道歯学雑誌, 41(2), 116-124
Issue Date	2021-03-15
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/80673
Type	journal article
File Information	41_02_03.pdf



原 著

オステオポンチンの発現は口腔癌患者のシスプラチンに対する 抵抗性の予測因子となりうる

上田 倫弘

抄 録：シスプラチンは頭頸部扁平上皮癌の治療で広く使われる抗癌剤であるが、シスプラチンに耐性を示す癌が存在し、期待した効果を得られない場合も少なくない。その効果を化学療法前に予測することは難しく、その予測が可能であれば抗癌剤による治療の可否を決定できる。化学療法施行前にその効果を予測するためには獲得性耐性遺伝子ではなく内因性耐性遺伝子の同定が必要であり、オステオポンチンはシスプラチンに対する内因性耐性遺伝子の一つとして同定された。

オステオポンチンは骨基質中で破骨細胞とハイドロキシアパタイトを架橋するタンパクとして考えられてきたが、多くの正常組織や癌組織でも発現している。オステオポンチンを遺伝子導入した口腔癌細胞株HSC-3細胞ではシスプラチンを作用させると生存シグナルであるAKTのリン酸化の阻害が減弱し、PARPの活性化が阻害された。

口腔扁平上皮癌患者の生検組織でのオステオポンチンmRNA発現量とシスプラチンを用いた化学放射線同時療法の奏効性との関連について、恵佑会札幌病院で化学放射線同時療法を行った37名の口腔扁平上皮癌患者を対象として研究を行った。37名のうち14名は化学放射線同時療法によって癌が完全に消失したが、23名では癌の残存あるいは再発が認められた。化学放射線同時療法前の生検組織からmRNAを抽出し、real-time RT-PCRによりオステオポンチンmRNAの発現量を測定したところ、オステオポンチン低発現群では27例中14例(52%)で癌が消失したが、高発現群では10例すべてに残存・再発がみられた。原発巣効果期間についてはオステオポンチン高発現群で有意に短かった。

これらの結果から、オステオポンチンmRNAの発現量によって術前にシスプラチンを併用した化学放射線同時療法の効果を予測出来る可能性のあることが、またオステオポンチンはAKTならびにPARPの経路に作用してシスプラチンに抵抗性を示すことが明らかになった。

キーワード：オステオポンチン、シスプラチン、抗癌剤耐性

緒 言

口腔癌は全悪性腫瘍のなかで1～3%と比較的発生率が低い癌¹⁾だが、口腔は咀嚼、嚥下、発音などQOLに重要な器官であることから、口腔に癌が発生すると口腔機能に重大な支障を伴う。さらに口腔癌は根治性の観点から広範囲な外科的切除が標準治療とされ、口腔機能のみならず審美性にも大きな影響を及ぼす。近年では、化学療法を行い癌を縮小あるいは消失させて口腔の機能温存を期待する放射線化学療法を併用する症例が増加しており、シスプラチンは化学療法の中心的薬剤の一つで、分裂期のDNAと直接結合して複合体を形成し細胞機能を阻害する。癌細胞は正常細胞に比べ分裂活性が高いことから、シスプラチンが癌

細胞のDNAに作用することによって癌を死滅させる²⁻⁵⁾。しかしシスプラチンに対して抵抗性を示す癌の存在が化学療法の障害となっている。シスプラチンを始めとした化学療法の感受性の有無を治療前に評価することは困難であるが、不必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持つ。

抗癌剤治療に抵抗する原因の一つに、耐性遺伝子の発現上昇が知られている。これまでもシスプラチン耐性遺伝子に関する研究は広く行われ、数種の耐性遺伝子が同定されたものの、実際の臨床において治療前に耐性の有無を評価できる有用なマーカー遺伝子は未だ明らかではない。

耐性遺伝子には獲得性耐性遺伝子と内因性耐性遺伝子の

二種類がある^{6,7)}。獲得性耐性遺伝子は、癌細胞が抗癌剤に晒されたときに反応性に発現が上昇する遺伝子で、一方、内因性耐性遺伝子は癌細胞内で本質的に発現が高く、耐性に寄与する遺伝子である。これまで行われてきた耐性遺伝子の研究は、培養細胞に抗癌剤を暴露させその濃度を徐々に上昇させることで耐性株を樹立し、親株との遺伝子発現や薬物動態を比較検討する実験方法がほとんどであり、癌細胞がもっている本来の形質に加えて癌細胞が抗癌剤に暴露されたときに反応性に発現が上昇する遺伝子である獲得性耐性遺伝子をみているためではないかと考察されている。抗癌剤の感受性の有無を治療前に把握するためには癌細胞内で本質的に発現が高く、耐性に寄与する遺伝子である内因性耐性遺伝子を同定できる方法が必要であると考え、シングルセルクローニング法によりオステオポンチンを含む数種の内因性耐性遺伝子候補を明らかにした⁸⁾。

癌の悪性化に関与する機序としてAKTの活性上昇が多くの癌で知られている⁹⁾。AKTはセリン・スレオニンキナーゼのひとつで、細胞増殖、成長、生存、および抗アポトーシスなど重要な機能に関わっているタンパク質であるが、オステオポンチンがシスプラチンに抵抗性を示すメカニズムにおけるAKTの役割は未だ不明である。本研究では、口腔癌細胞株でのオステオポンチンのシスプラチン抵抗性におけるAKTの機能解析に加え、口腔扁平上皮癌組織でのオステオポンチンmRNAの発現量と化学放射線療法同時療法の効果との関係について検討を行った。

材料および方法

1) 癌細胞および培養条件

ヒト口腔扁平上皮癌細胞株であるHSC-3細胞を用いた。細胞は、37℃、5% CO₂気相下において10%牛胎仔血清(FBS)を加えたDulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Sigma) 培地中で通法に従い培養した。なおHSC-3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にシスプラチン (Phizer株式会社, Japan) 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 -glycerophosphat, 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 gel electrophoresis (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 (Cell Signaling Technology), 抗AKT (Cell Signaling Technology), 抗p-AKT (Cell Signaling

Technology), 抗osteopontin (IBL, Japan), 抗 β -actin (Santa Cruz Biotechnology) の各抗体を、二次抗体にはHRP標識抗マウスIgG抗体 (Pierce, IL. USA), HRP標識抗ラビットIgG抗体 (Pierce, IL. USA) を用い、SuperSignal West Femto detection kit (Pierce, IL. USA) にて検出を行った。

3) リアルタイムRT-PCR法

それぞれの組織から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。

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) 症例

2003年～2012年の10年間に恵佑会札幌病院歯科口腔外科を受診した顎口腔扁平上皮癌一次例に対し、シスプラチンを用いた動注化学療法または静注化学療法に放射線を同時併用した化学放射線同時療法 (Concomitant Chemoradiotherapy: 以下、動注例はIA CCRT, 静注例はIV CCRT と略) を施行し、生検組織にて遺伝子検索が可能であった37症例を対象とした。CCRTのプロトコルは放射線照射療法 (1回1.8～2.5 Gy, 週4～5回) と、シスプラチン化学療法 (IA CCRTの場合は1回40～100 mg/m², 週1回, IV CCRTの場合は1回5 mg/m², 週5日) を同時に行い、これらを4週にわたって行った。原則として放射線総量が40 Gy前後に到達した時点でRECISTガイドライン¹⁰⁾ に準じて原発巣を評価した。完全奏効と判断された症例はさらに2週間 CCRTを追加した (IV CCRTの場合は放射線療法のみ)。CCRTを完遂した後再びRECISTガイドラインに準じて原発巣を評価し、完全奏効と判断された症例は経過観察を行った。化学療法はシスプラチンのみを使用し、他の薬剤との併用は行わなかった。またRECISTガイドラインに準じた評価で部分奏効、進行、安定と判断された症例は外科的切除に移行した。これらの治療の全体像をFigure 1に示す。本研究では原発巣に対するCCRTの効果を検討した。放射線量、シスプラチン総投与量の如何に関わらず、外科的切除された組織で病理組織学的に癌が認められなかった症例と、経過観察中に原発巣に再発を認めら

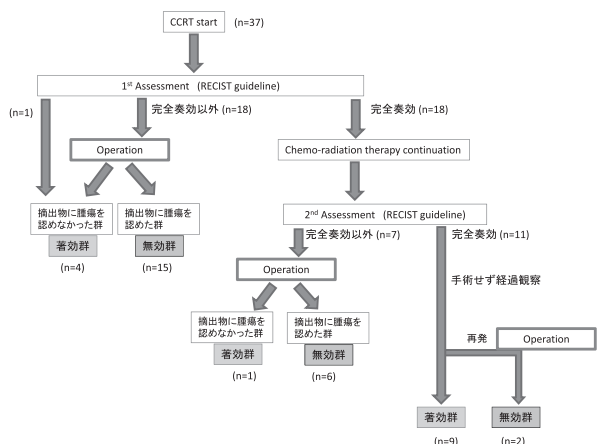


Figure 1 CCRTのアルゴリズムと症例数

れない症例を著効群とし、外科的切除された組織に病理組織学的に癌を認めた症例及び、経過観察中に再発を認めた症例を無効群とした。化学放射線同時療法による原発巣の効果期間（以下、原発巣効果期間）は、著効群ではCCRT後から手術の有無にかかわらず病理組織学的あるいは臨床的に無再発の期間とし、無効群ではCCRT後から外科的切除された組織で癌の残存・再発が病理組織学的に確認された日までの期間とした。患者の詳細についてTable 1に示す。

なお、本研究は、恵佑会札幌病院倫理委員会が1999年に承認された臨床研究であり、北海道大学病院の自主臨床研

究審査委員会の承認（承認番号：自009-0019）を得ている。

5) 統計

統計処理はStatView version5.0とSPSS version19.0を用い、Mann-Whitney's U test, Fisher's exact probability test, Chi-squared test, log rank(Mantel-Cox test)を用い、有意水準 $P<0.05$ を有意差ありと判断した。またカプランマイヤー曲線におけるカットオフ値は、ROC曲線解析を行い設定した。

結 果

1. 口腔扁平上皮癌細胞でのオステオポンチンの抗アポトーシス効果とAKTの活性

口腔扁平上皮癌細胞株HSC-3細胞を用いて、オステオポンチンの抗アポトーシスに対する影響を調べた。まず、オステオポンチン発現プラスミドあるいはコントロールベクターを細胞に遺伝子導入し、その発現を確認した。抗オステオポンチン抗体でウェスタンブロッティングを行ったところ、オステオポンチン発現プラスミドをいれた細胞ではオステオポンチンの発現が上昇していた。次にシスプラチン処理によるPARPの活性化（シスプラチン作用後18時間）とAKTのリン酸化（シスプラチン作用後1時間）に対するオステオポンチンの影響について検討した。HSC-3細胞に

Patient number	Age	Gender	Region	Stage	T	N	Treatment	Total amount of CDDP (mg)	Concomitant X-RT dosage (Gy)	著効群or 無効群	OPN mRNA	OPN 低発現群(L) or 高発現群(H)	制御期間	手術の有無
1	60	M	Tongue	IV	4	2b	IV CCRT	300	67.4	著効群	0.15	(L)	440	無し
2	69	M	Upper gingiva	IV	2	2b	IA CCRT	280	65	著効群	0.64	(L)	371	無し
3	53	M	Buccal mucosa	II	2	0	IV CCRT	176	39.6	著効群	0.84	(L)	787	有り
4	52	M	Tongue	IV	3	2c	IA CCRT	300	50	著効群	0.94	(L)	1935	無し
5	68	F	Oropharynx	IV	4	2b	IA CCRT	600	66	著効群	0.95	(L)	2678	無し
6	69	F	Tongue	IV	4	2b	IV CCRT	304	68.4	著効群	0.95	(L)	760	無し
7	56	M	Tongue	II	2	0	IA CCRT	200	60	著効群	0.97	(L)	1327	無し
8	72	M	Floor of the mouth	IV	4	0	IA CCRT	270	36	著効群	1.04	(L)	3269	無し
9	67	M	Oropharynx	III	2	1	IV CCRT	232	68.4	著効群	1.04	(L)	731	無し
10	56	M	Upper gingiva	IV	4	1	IA CCRT	202.8	60	著効群	1.15	(L)	203	有り
11	68	M	Tongue	III	2	1	IV CCRT	176	39.6	著効群	1.19	(L)	738	有り
12	57	M	Tongue	IV	4	2b	IA CCRT	200	60	著効群	1.20	(L)	141	無し
13	63	M	Oropharynx	II	2	0	IA CCRT	300	66	著効群	1.27	(L)	2197	無し
14	67	M	Buccal mucosa	II	2	1	IV CCRT	168	39.6	著効群	1.29	(L)	534	有り
15	73	M	Upper gingiva	IV	4	0	IA CCRT	310	59.4	無効群	0.22	(L)	28	有り
16	72	M	Upper gingiva	IV	4	0	IA CCRT	200	40	無効群	0.22	(L)	20	有り
17	69	M	Tongue	IV	4	2b	IA CCRT	320	40	無効群	0.28	(L)	15	有り
18	64	M	Tongue	IV	4	0	IA CCRT	450	40	無効群	0.60	(L)	29	有り
19	74	M	Lower gingiva	IV	4	2b	IA CCRT	300	50	無効群	0.76	(L)	104	有り
20	68	M	Upper gingiva	IV	4	2b	IA CCRT	900	66	無効群	0.80	(L)	36	有り
21	42	M	Lower gingiva	IV	4	2b	IA CCRT	350	39.6	無効群	0.87	(L)	31	有り
22	29	M	Tongue	IV	4	2b	IA CCRT	300	32	無効群	0.88	(L)	14	有り
23	63	M	Upper gingiva	IV	4	2b	IA CCRT	292	60	無効群	0.94	(L)	37	有り
24	65	M	Lower gingiva	IV	4	0	IV CCRT	32	39.6	無効群	1.00	(L)	19	有り
25	60	M	Tongue	IV	2	2b	IV CCRT	176	39.6	無効群	1.08	(L)	19	有り
26	60	M	Maxillary sinus	IV	3	2b	IA CCRT	150	66	無効群	1.14	(L)	8	有り
27	50	M	Tongue	IV	4	0	IA CCRT	500	39.6	無効群	1.15	(L)	18	有り
28	83	F	Tongue	II	2	0	IV CCRT	110	39.6	無効群	1.79	(H)	26	有り
29	26	F	Tongue	IV	4	0	IV CCRT	110	39.6	無効群	1.83	(H)	19	有り
30	40	M	Upper gingiva	IV	4	2b	IA CCRT	600	60	無効群	1.97	(H)	39	有り
31	72	M	Lower gingiva	IV	4	2b	IV CCRT	120	27	無効群	2.22	(H)	17	有り
32	69	F	Buccal mucosa	II	2	0	IV CCRT	176	39.6	無効群	2.30	(H)	20	有り
33	68	M	Tongue	IV	4	1	IV CCRT	176	39.6	無効群	2.68	(H)	20	有り
34	76	M	Upper gingiva	IV	4	0	IV CCRT	110	39.6	無効群	2.75	(H)	46	有り
35	63	M	Buccal mucosa	IV	4	2b	IV CCRT	110	39.6	無効群	4.56	(H)	41	有り
36	64	F	Upper gingiva	IV	4	0	IV CCRT	176	39.6	無効群	5.43	(H)	37	有り
37	51	F	Upper gingiva	IV	4	2b	IA CCRT	300	66	無効群	5.66	(H)	159	有り

Table 1 症例一覧

a) Patient 8: 全身状態が悪化したためCCRTを中断し、外科的切除は行わず経過観察となった
b) Patient 24: 腎機能の低下によりシスプラチン投与を途中で中断した
c) Patient 19, 37: 経過観察中に再発を認めたため外科的切除を行った

オステオポンチン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、シスプラチン2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で処理した。コントロール細胞では、シスプラチンによって活性型PARPの発現が上昇し、AKTのリン酸化が減弱した。これに対し、オステオポンチン導入細胞ではコントロールに比べ、活性型PARPの発現が抑制され、AKTのリン酸化の減弱が抑制された (Figure 2)。

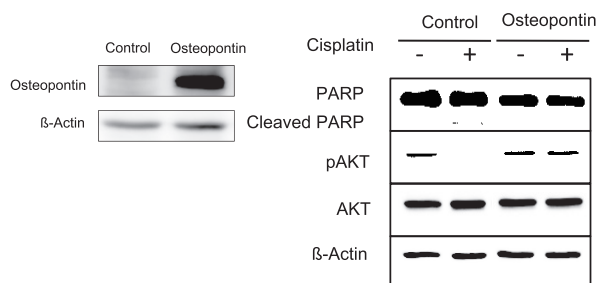


Figure 2 オステオポンチンのシスプラチン抵抗性

オステオポンチンまたはコントロールベクターを強制発現させたHSC-3細胞にシスプラチン2.5 mg/mlを作用させ、PARPとAKTの活性をwestern blottingで調べた。オステオポンチンの発現は抗オステオポンチン抗体で確認した。シスプラチンによってオステオポンチン強制発現細胞ではPARPの活性化が減弱し、AKTの減弱が抑制された。

2. 口腔扁平上皮癌におけるオステオポンチンmRNAの発現

恵佑会札幌病院で口腔扁平上皮癌と診断され、シスプラチンと放射線によるCCRTを受けた患者37人から生検時に癌組織を採取した。37人の患者のまとめはTable 2に示すように26歳から83歳までの男性30人、女性7人で、舌癌が14人と最も多く、上顎歯肉、頬粘膜、下顎歯肉、中咽頭、口底、上顎洞の順であった。またステージIV患者が29人と最も多く、ステージIIIは3人、ステージIIは5人、T分類では、T4が25人と最も多く、T3は2人、T2は10人であった。N分類ではN0が14人、N1が1人、N2が18名であった。

Age median (yr)	61.8
(range)	(26~83)
Gender	
Male	30
Female	7
Region	
Buccal mucosa	4
Floor of the mouth	1
Lower gingiva	4
Maxillary sinus	1
Oropharynx	3
Tongue	14
Upper gingiva	10
stage	
II	5
III	3
IV	29
T	
2	10
3	2
4	25
N	
0	14
1	5
2a,b,c	18
Treatment	
IA CCRT	21
IV CCRT	16

Table 2 顎口腔扁平上皮癌37症例の背景因子、治療因子のまとめ

シスプラチン総投与量の平均値は269.6 mgで併用した放射線総量平均は48.95 Gyであった。IA CCRTを受けた患者は21名、IV CCRTを受けた患者は16名であった。

CCRTを受けた結果、原発巣の癌が消失した著効群は14例、癌が残存あるいは再発した無効群は23例であった。CCRTによる治療効果と背景因子をTable 3に示す。それぞれの臨床項目に対し統計処理を行ったところ、T分類では癌の大きいものほど有意に治療抵抗性を示した。年齢、性別、病期、N分類では有意差が認められなかった。また、IA CCRTとIV CCRTの違いと治療効果には有意な差がみられなかった。

	著効群 (n=14)	無効群 (n=23)	p value
Age median (yr)	62.6	60.9	0.7414 a)
(range)	(56~72)	(26~83)	
Gender			0.686 b)
Male	12	18	
Female	2	5	
Region			0.078 c)
Buccal mucosa	2	2	
Floor of the mouth	1	0	
Lower gingiva	0	4	
Maxillary sinus	0	1	
Oropharynx	3	0	
Tongue	6	8	
Upper gingiva	2	8	
stage			0.103 a)
II	3	2	
III	3	0	
IV	8	21	
T			0.039 a)
2	7	3	
3	1	1	
4	6	19	
N			0.452 a)
0	3	11	
1	4	1	
2a,b,c	7	11	
Treatment			1 b)
IA CCRT	8	13	
IV CCRT	6	10	

a) Mann-Whitney u test
b) Fisher's exact probability test
c) Chi-squared test

Table 3 著効群と無効群の治療因子、背景因子の関連性

患者の癌組織からmRNAを抽出し、オステオポンチンmRNA発現量をreal time RT-PCRにて測定した。内因性コントロールとしてGAPDH mRNAを用いその相対値を検討した。全37症例のオステオポンチンmRNA量をFigure 3に示す。オステオポンチンmRNAの発現量は0.15~5.66で、ROC曲線解析より、カットオフ値を1.54と設定した (Figure 4)。オステオポンチンmRNAの発現量がカットオフ値以下の症例をオステオポンチン低発現群 (n=27)、カットオフ値以上の症例をオステオポンチン高発現群 (n=10) とした。CCRTによって癌が消失した症例はすべてオステオポンチン低発現群に属し、オステオポンチン高発現群はすべて無効群に属した。

オステオポンチンmRNAの発現と背景因子との関連について比較検討した結果をtable 4に示す。それぞれの臨床項目に対し統計処理を行ったところ、オステオポンチン高発現群では低発現群に比べ、有意にCCRTが奏効しないことが明らかとなった。また、女性が男性に比べ、オステオポンチンmRNAの値が高い傾向がみられた。なおオステオポンチンの発現と年齢、部位、ステージ、大きさ、リンパ節転移に有意な関連性はみられなかった。

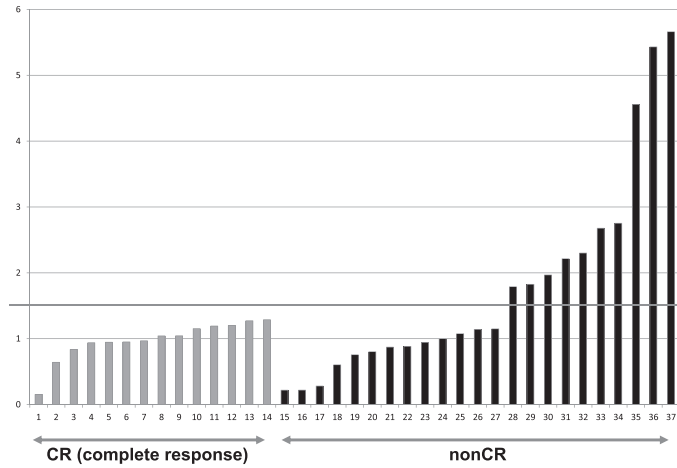


Figure 3 各症例のオステオポンチンmRNAの発現量

CCRTによって腫瘍が消失した症例ではすべて、オステオポンチンmRNA低発現群であった。また、オステオポンチン高発現群では全て残存・再発がみられた。

3. オステオポンチンmRNAの発現量と原発巣効果期間

オステオポンチンmRNA発現量と原発巣効果期間について検討を行った。解析はKaplan-Meier法で生存曲線を求め、有意差はlog rank testを用いて検定した (Figure 5)。その結果、原発巣効果期間はオステオポンチンmRNA高発現群では低発現群に比べ有意に原発巣効果期間が短縮した (P=0.016)。

考 察

本研究では、オステオポンチンmRNAの発現量が高い口腔扁平上皮癌はCCRTに対して抵抗を示すことが明らかとなった。抗癌剤耐性遺伝子は獲得性耐性遺伝子と内因性耐性遺伝子の2種類があり、オステオポンチンはシスプラチン抵抗性に関連する内因性耐性遺伝子の一つとして同定

	OPN low expression	OPN high expression	p value	
Age median (yr)	61.7	63	0.453	mann-whitney's U test
(range)	29~74	26~83		
Gender Male	25	5	0.009	Fisher's exact probability test
Female	2	5		
Region Buccal mucosa	2	2	0.676	Chi-squared test
Floor of the mouth	1	0		
Lower gingiva	3	1		
Maxillary sinus	1	0		
Oropharynx	3	0		
Tongue	11	3		
Upper gingiva	6	4		
stage II	3	2	> 0.9999	Mann-Whitney u test
III	3	0		
IV	21	8		
T 2	8	2	0.473	Mann-Whitney u test
3	2	0		
4	17	8		
N 0	9	5	0.073	Mann-Whitney u test
1	4	1		
2a,b,c	14	4		
CCRT responsibility CR	14	0	0.006	Fisher's exact probability test
non-CR	13	10		

Table 4 オステオポンチンmRNA高発現と低発現群の比較
オステオポンチンmRNA発現は、CCRTの効果及び性差とに有意な相関がみられた。

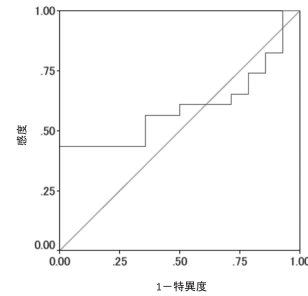


Figure 4 ROC曲線解析

オステオポンチンmRNA量のカットオフ値を設定した。

	感度	1-特異度
-8462	1.000	1.000
1981	1.000	.929
2187	.957	.929
2501	.913	.929
4427	.870	.929
6229	.826	.929
6990	.826	.857
7800	.783	.857
8199	.739	.857
8545	.739	.786
8714	.696	.786
9107	.652	.786
9417	.652	.714
9452	.609	.714
9484	.609	.643
9593	.609	.571
9848	.609	.500
10220	.565	.500
10431	.565	.429
10609	.565	.357
11094	.522	.357
11459	.478	.357
11517	.435	.357
11726	.435	.286
11967	.435	.214
12366	.435	.143
12803	.435	.071
15394	.435	.000
18079	.391	.000
18970	.348	.000
20921	.304	.000
22583	.261	.000
24890	.217	.000
27153	.174	.000
36551	.130	.000
49944	.087	.000
55471	.043	.000
66622	.000	.000

された⁸⁾。多くの抗癌剤耐性の研究では、細胞株に抗癌剤を用いて生き残った細胞を耐性株として樹立し、親株と遺伝子発現を比較することで耐性遺伝子を同定している。しかし、これら耐性遺伝子の発現と癌の抗癌剤感受性との間に相関性がないという報告が多くみられる¹¹⁻¹⁶⁾。特にGilletは380もの耐性遺伝子について検索を網羅的に行い、組織サンプルと*in vitro*モデルの間には関連性がみられない報告している¹⁷⁾。*in vitro*で耐性遺伝子の一つとして同定されたオステオポンチンが、実際に*in vivo*でも耐性遺伝子として発現が亢進していることを示すことができたことは、本研究の大きな意義と考えられる。

今回、口腔癌症例の生検組織でオステオポンチンmRNA

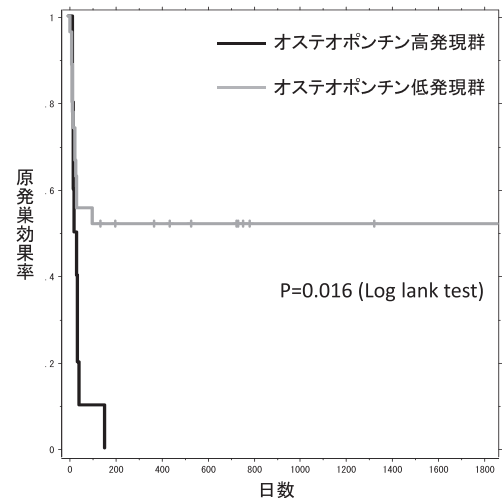


Figure 5 オステオポンチンmRNA発現量と全症例の原発巣効果期間

オステオポンチンmRNA高発現群では低発現群に比べ、原発巣効果期間が有意に短縮した。

が高発現していた10例は、すべてCCRTに抵抗性を示した。また、CCRTによって外科的切除を回避できた9例および外科的切除に腫瘍が認められなかった5例すべてで生検組織のオステオポンチンmRNAの発現が低かった。以上のことから、口腔扁平上皮癌に対するシスプラチンを用いた化学放射線同時療法において、オステオポンチンが予測因子となりうると考えられた。途中評価で外科的切除となり腫瘍が残存した15例のうち7例はオステオポンチン低発現群で、これらはCCRTを継続することで腫瘍が消失し外科的切除を避けることができる可能性が示唆された。一方、オステオポンチン高発現群ではCCRTを継続しても腫瘍の残存・再発の可能性が高く、外科的切除回避は困難と予想される。よって、オステオポンチン高発現群では、CCRTが完遂し臨床的に腫瘍が完全消失したという評価であっても外科的切除を選択した方が良いと考えられた。また、オステオポンチン高発現群10症例全てが化学放射線同時療法に抵抗性を示した。偽陽性が少ないことから、オステオポンチンmRNAの測定はスクリーニング検査として非常に優れている可能性がある。

オステオポンチン低発現群では著効例14例、無効例13例で効果との関連性がみられなかった。口腔扁平上皮癌の発生には多くの遺伝子変異が関連している¹⁸⁾ことから、抗癌剤耐性の機序を単一因子のみで言及することは困難であると考えられ、内因性耐性遺伝子と同定された他の遺伝子発現を加味して検索を進める必要がある。

オステオポンチンは、分子量約41kDaのたんぱく質で、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¹⁹⁾。オステオポンチンは、インテグリンやCD44受容体の双方に結合し骨の再吸収や、創傷治癒、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いる²⁰⁾。また癌組織では肝癌、乳癌、胃癌、卵巣癌、肺癌などで高発現していることが報告されている²¹⁻²⁶⁾。オステオポンチンがシスプラチンに対して抵抗性を示す機序は不明な点が多かったが、今回癌の悪性化に関与するAKTの活性化が関連していることが明らかとなった (Figure 1)。しかしAKTからどのようなシグナル伝達によって細胞死に抵抗性を示すか、またオステオポンチンがAKTをどのように活性化するかは依然不明である。活性化されたAKTはXIAPやBAD、GSK3などの細胞死や増殖を制御するさまざまな標的分子を活性化する²⁷⁾ことや、オステオポンチンがEGFRを介してAKT/mTOR/p70S6Kを活性化する²⁸⁾という報告がある。また、細胞死について調べるためPARPの切断についてwestern blotting法を用いて検討した。PARPはDNA修復やDNAの安定化に関与するタンパク質で、アポトーシス経路が活性化した際にカスパーゼによって切断されることから切断型PARPの発現はアポトーシス

の指標となる²⁹⁾。本研究では、シスプラチンによるPARPの切断はオステオポンチンの強制発現で阻害された。AKTによって活性化されるXIAPは、カスパーゼ9に結合し活性を阻害することが知られている³⁰⁾。よってオステオポンチンはEGFR-AKT-XIAP-PARP経路を活性化してシスプラチンに抵抗性を示すと考えられるが、その全容は今後検索が必要である。

今回の研究で、中間評価で癌の残存を疑われ切除に至った19例のうち4例に腫瘍が認められなかったことから、RECISTガイドラインは正確な腫瘍の残存を示す評価とはならない可能性がある。本研究において、切除を行わなかった症例では経過観察開始からそれぞれ109日、159日に手術により腫瘍の再発を認めた症例が存在することから、長期間の経過観察が必要である。

また、オステオポンチンmRNA量が男性に比べ女性に高い発現が認められた。原因として女性ホルモンの影響が考えられたが、過去の文献を検索してもオステオポンチンの発現と性差について述べられたものは認められなかったが、女性の進行癌症例は比較的少ないため、今後さらに検討する必要がある。

今回は37例の症例について検討を行ったが、今後更に症例を追加して検討を行う必要がある。またオステオポンチンが分泌タンパクであることから、患者の血清中のオステオポンチン量がシスプラチンを併用した化学放射線同時療法に対する抵抗性に関与する可能性があり、予後と相関関係について検討が必要である。

結 論

口腔扁平上皮癌におけるシスプラチン耐性とオステオポンチンの関連性について以下の知見を得た。

1. 口腔扁平上皮癌細胞株HSC-3にオステオポンチンを強制発現させてシスプラチンで処理を行ったところ、AKTの活性化の減弱が阻害されPARPの活性化が減少した。
2. 口腔扁平上皮癌組織から採取したオステオポンチンmRNAの発現とCCRTの効果について比較検討したところ、オステオポンチンmRNAを強く発現する癌ではCCRTに抵抗性を示した。
3. CCRTによって癌が消失した例ではすべて、オステオポンチンmRNA低発現群であった。
4. オステオポンチンmRNA高発現群では低発現群に比べ原発巣効果期間が短縮した。
5. オステオポンチンmRNAの発現量によって治療前にシスプラチンを用いた化学放射線同時療法の効果を予測出来る可能性のあることが明らかになった。

参 考 文 献

- 1) Varsha, B.K., et al., Perineural invasion in oral squamous cell carcinoma: Case series and review of literature. *J Oral Maxillofac Pathol*, 2015. 19(3): 335-41.
- 2) Wang, X.T., J.L. Martindale, and N.J. Holbrook, Requirement for ERK activation in cisplatin-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 2000. 275(50): 39435-39443.
- 3) Horky, M., et al., Segregation of nucleolar components coincides with caspase-3 activation in cisplatin-treated HeLa cells. *Journal of Cell Science*, 2001. 114(4): 663-670.
- 4) Wang, D. and S.J. Lippard, Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2005. 4(4): 307-320.
- 5) Licitra, L., et al., Primary chemotherapy in resectable oral cavity squamous cell cancer: A randomized controlled trial. *Journal of Clinical Oncology*, 2003. 21(2): 327-333.
- 6) Rabik, C.A. and M.E. Dolan, Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treatment Reviews*, 2007. 33(1): 9-23.
- 7) Gottesman, M.M., Mechanisms of cancer drug resistance. *Annual Review of Medicine*, 2002. 53: 615-627.
- 8) Kitamura, T., et al., Identification of marker genes required to predict oral cancer cells with intrinsic resistance to cisplatin. *Oncology report*, 2016. in press.
- 9) Swami, M., Therapeutics Akt: a double-edged sword. *Nature Reviews Cancer*, 2009. 9(2): 76-76.
- 10) Eisenhauer, E.A., et al., New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer*, 2009. 45(2): 228-47.
- 11) Koberle, B., et al., Cisplatin resistance: preclinical findings and clinical implications. *Biochim Biophys Acta*, 2010. 1806(2): 172-82.
- 12) Zurita, A.J., et al., Lung resistance-related protein as a predictor of clinical outcome in advanced testicular germ-cell tumours. *Br J Cancer*, 2003. 88(6): 879-86.
- 13) Auner, V., et al., ABC transporter gene expression in benign and malignant ovarian tissue. *Gynecol Oncol*, 2010. 117(2): 198-201.
- 14) Izquierdo, M.A., et al., Drug resistance-associated marker Lrp for prediction of response to chemotherapy and prognoses in advanced ovarian carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, 1995. 87(16): 1230-7.
- 15) Hayes, M., et al., ERCC1 expression and outcomes in head and neck cancer treated with concurrent cisplatin and radiation. *Anticancer Res*, 2011. 31(12): 4135-9.
- 16) Shen, B., et al., Expression of ABC transporters is an unfavorable prognostic factor in laryngeal squamous cell carcinoma. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 2011. 120(12): 820-7.
- 17) Gillet, J.P., et al., Redefining the relevance of established cancer cell lines to the study of mechanisms of clinical anti-cancer drug resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011. 108(46): 18708-18713.
- 18) Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature*, 2015. 517(7536): 576-82.
- 19) Buback, F., et al., Osteopontin and the skin: multiple emerging roles in cutaneous biology and pathology. *Experimental Dermatology*, 2009. 18(9): 750-759.
- 20) Butler, W.T., Structural and Functional Domains of Osteopontin. *Osteopontin: Role in Cell Signalling and Adhesion*, 1995. 760: 6-11.
- 21) Gillespie, M.T., et al., Calcitonin receptors, bone sialoprotein and osteopontin are expressed in primary breast cancers. *International Journal of Cancer*, 1997. 73(6): 812-815.
- 22) Ue, T., et al., Co-expression of osteopontin and CD44v9 in gastric cancer. *International Journal of Cancer*, 1998. 79(2): 127-132.
- 23) Kim, J.H., et al., Osteopontin as a potential diagnostic biomarker for ovarian cancer. *Jama-Journal of the American Medical Association*, 2002. 287(13): 1671-1679.
- 24) Gu, T., et al., Osteopontin is involved in the development of acquired chemo-resistance of cisplatin in small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 2009. 66(2): 176-183.
- 25) Zhang, R.H., et al., Osteopontin Enhances the Expression and Activity of MMP-2 via the SDF-1/CXCR4 Axis in Hepatocellular Carcinoma Cell Lines. *Plos One*, 2011. 6(8).
- 26) Cao, D.X., et al., Osteopontin as potential biomarker and therapeutic target in gastric and liver cancers. *World Journal of Gastroenterology*, 2012. 18(30): 3923-3930.
- 27) Dan, H.C., et al., Akt phosphorylation and

- stabilization of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP). *Journal of Biological Chemistry*, 2004. 279 (7): 5405-5412.
- 28) Lamour, V., et al., Targeting osteopontin suppresses glioblastoma stem-like cell character and tumorigenicity in vivo. *International Journal of Cancer*, 2015. 137 (5): 1047-1057.
- 29) Boulares, A.H., et al., Role of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage in apoptosis. Caspase 3-resistant PARP mutant increases rates of apoptosis in transfected cells. *Journal of Biological Chemistry*, 1999. 274 (33): 22932-40.
- 30) Srinivasula, S.M., et al., A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/ DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature*, 2001. 410 (6824): 112-6.

ORIGINAL

Resistance of oral squamous cell carcinoma to cisplatin is predicted by the increased expression of osteopontin

Michihiro Ueda

ABSTRACT : Cisplatin is one of the widely-used anti-cancer drugs for many types of tumors. Nonetheless, drug resistance poses a major hindrance to the success of chemotherapy in cancer. Therefore, it is important to identify specific markers that can be used to predict the sensitivity of tumor cells to cisplatin before chemotherapy.

Anti-cancer drug resistance genes are divided into: intrinsic genes that are highly expressed in resistant cells, de novo, and acquired genes that are induced by exposure to anti-cancer drugs. Intrinsic resistance genes are thought to be more efficient in predicting the sensitivity of tumor cells to anti-cancer drugs at the primary clinical onset, although both intrinsic and acquired resistant genes are involved in drug-sensitivity. Kitamura et al. established a new approach to identify several intrinsic resistance genes.

Osteopontin was identified as a candidate gene that was related to cisplatin resistance. In this study, the clinicopathological features of the patients were compared with the mRNA expression levels of osteopontin. Patients were divided into CR (complete response) and non-CR groups according to the therapeutic efficacy. The mRNA levels of osteopontin were significantly higher in the resistance group compared to the disease-free group ($P < 0.05$). The disease-free period in patients with high expression levels of osteopontin was shorter than that in patients with low expression levels ($P < 0.05$). These results indicate that osteopontin is a potential predictive marker for cisplatin-based chemotherapy in head and neck squamous cell carcinoma.

Key Words : Osteopontin, Cisplatin, Anti-cancer drug resistance