



Title	唾液腺癌における抗癌剤多剤耐性機構の解析
Author(s)	堂東, 亮輔
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46415
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	堂 東 亮 輔
博士の専攻分野の名称	博士(歯学)
学位記番号	第 19898 号
学位授与年月日	平成18年1月19日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	唾液腺癌における抗癌剤多剤耐性機構の解析
論文審査委員	(主査) 教授 古郷 幹彦 (副査) 教授 豊澤 悟 助教授 米原 典史 講師 中澤 光博

論文内容の要旨

【研究の目的】近年、抗癌剤の発展により癌化学療法の治療成績が向上しつつある。しかし、頭頸部癌は、依然抗癌剤に対して感受性が低く、その克服が重要な課題である。癌化学療法の問題の一つに抗癌剤耐性現象があるが、これは発生母細胞が薬剤抵抗性を示す「自然耐性」と薬剤耐性形質を獲得する「獲得耐性」がある。ATP-binding cassette (ABC) transporter は、ATP 依存性薬剤排出ポンプで、薬物を細胞外へ排出させる機構が明らかとなっている。頭頸部癌では、これまでに ABC transporter の multidrug resistance gene (MDR) 1 が、唾液腺癌の管腔形成細胞に高発現していることが報告されている。しかし、MDR1 の機能を阻害しても、唾液腺癌細胞が薬剤耐性形質を示すことが明らかにされ、MDR1 以外の薬剤耐性機構の存在が示唆される。そこで、MDR1 の構造に類似する multidrug resistance associated protein (MRP) 1 および MRP1 の基質として認識されるグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) のサブクラス (pi, mu, alpha) の発現について検討し、口腔扁平上皮癌と唾液腺癌における抗癌剤耐性機構の解析を行なった。

【実験方法】唾液腺組織と唾液腺癌組織および口腔扁平上皮癌組織を用い、MDR1、MRP1、GST のサブクラス (pi, mu, alpha) の細胞内局在を免疫組織学的に検討した。さらに各組織における発現の陽性率、平均陽性細胞率、染色強度を評価した。ヒト頭頸部癌由来培養細胞として、口腔扁平上皮癌由来 SK、TF、KB、KN 細胞、唾液腺癌由来 HSY、HSG 細胞を用いて、ビンクリスチン (VCR) 処理を行ない、ABC transporter と GST サブクラスの蛋白発現を Western blot 法で、mRNA の発現を RT-PCR 法で比較検討した。また、GST 阻害剤の Curcumin とグルタチオン合成酵素阻害剤の Buthionine Sulfoximine を用い、HSG 細胞における薬剤感受性の変化を 50% 増殖抑制濃度で評価した。さらに、MDR1、MRP1 の RNA 干渉による発現抑制を行い、薬剤感受性の変化を細胞増殖抑制濃度で検討し、またフローサイトメトリーによる薬剤排泄機能の評価を行った。

【結果および考察】正常唾液腺組織において、MDR1 と MRP1 は、線条部と排泄部導管上皮細胞に検出された。GST も同様な染色態度を示し、GST-pi は、GST-alpha と GST-mu に比べ弱い染色性を示した。一方、腺様囊胞癌組織での MDR1 と MRP1 は、主に管腔構造をとる腫瘍細胞で高発現するとともに、GST-pi が均一に強染した。また、両 transporter および GST サブクラスの陽性率、平均陽性細胞率、染色強度は、口腔扁平上皮癌では低値を示し、腺様囊胞癌と腺癌は、ともに均一な両 transporter の発現と強い染色強度を示した。特に唾液腺癌における GST-pi の発現は GST-mu に比べ約 10 倍の染色強度を示した。培養癌細胞における MDR1、MRP1 および GST の発現を Western blot 法で検討した結果、MDR1、MRP1 は口腔扁平上皮癌細胞に比べ唾液腺癌細胞で高い発現レベルを示し、VCR

処理による発現の亢進がみられた。また、口腔扁平上皮癌細胞と唾液腺癌細胞において VCR 処理による GST-pi の発現誘導がみられた。頸下腺癌由来培養細胞 HSG において、VCR 処理後の *MDR1*、*MRP1*、*GST-pi* mRNA の発現は、VCR 未処理に比べ有意に高く、*MRP1* の発現とともに *GST-pi* の mRNA は高値を示した。VCR 処理した HSG 細胞を用いた阻害実験の結果、GST 阻害剤、GSH 合成阻害剤により、VCR 感受性が上昇し、さらに *MDR1* と *MRP1* の RNAi についても同様の結果を示した。フローサイトメトリーによる検討では、*MDR1* と *MRP1* の RNAi による薬剤排泄機能の低下が認められた。

腫瘍組織および培養癌細胞を用いた ABC transporter の発現検討の結果、唾液腺癌は扁平上皮癌に比べ *MDR1*、*MRP1*、GST の発現レベルが高く、薬剤排泄機能が高いと推測される。これは、唾液腺癌は口腔扁平上皮癌に比べ、癌化学療法の奏効率が低いという clinical evidence に一致しており、薬剤排泄機構に関わる ABC transporter の発現レベルが唾液腺癌細胞の抗癌剤感受性に影響を与えると考えられた。また、HSG 細胞を用いた抗癌剤処理実験の結果より、唾液腺癌細胞では抗癌剤作用による薬剤耐性遺伝子の発現誘導がみられ、さらに、GST-pi の発現に伴う *MRP1* の薬物排泄機能が亢進することが考えられた。阻害実験の結果、*MDR1*、*MRP1*、GST の阻害によりいずれも唾液腺癌細胞の薬剤感受性が上昇したことから、唾液腺癌の抗癌剤耐性獲得にこれらの分子が関与していることが強く示唆された。

以上の結果より、唾液腺癌の抗癌剤耐性には、*MDR1* の薬物排泄機構に加え、GST-pi で触媒される解毒抱合体を基質とする *MRP1* の薬剤排泄機構が関与していることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は病理組織と培養癌細胞を用いて、唾液腺癌と口腔扁平上皮癌における ATP-binding cassette(ABC) transporter の発現と薬剤排泄機構を解析したものである。

その結果、*in vitro* において唾液腺癌細胞と口腔扁平上皮癌細胞は抗癌剤処理によって multidrug resistance gene (MDR) 1 と multidrug resistance associated protein (MRP) 1 が発現することを明らかにした。さらに唾液腺癌細胞の薬剤耐性は、薬剤によって誘導された GST-pi によって触媒され形成された解毒抱合体が、*MRP1* によって細胞外に排泄される薬物排泄機構が関与していることが示唆された。

以上の研究結果は、唾液腺癌細胞の抗癌剤多剤耐性機構を理解する上で重要な知見を与え、博士（歯学）の称号を与えるに値するものと認める。