

令和元年6月14日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11723

研究課題名(和文) 骨粗鬆症治療薬であるビタミンD誘導体(ED-71)を用いた口腔癌治療の開発研究

研究課題名(英文) Developmental study of oral cancer treatment using vitamin D derivative (ED-71) which is used for an osteoporosis treatment

研究代表者

新谷 智章 (Shintani, Tomoaki)

広島大学・病院(歯)・助教

研究者番号：90403518

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、扁平上皮癌細胞に対するビタミンD3とその誘導体であるED-71の抗腫瘍効果を検討した。

ビタミンD3およびED-71はNA、UEおよびA431細胞の細胞増殖を抑制した。

次に、A431細胞をマウスに移植し、ED-71に経口投与した。その結果、ED-71投与群の腫瘍増殖は有意に抑制された。ED-71は口腔扁平上皮癌細胞に対して増殖抑制を示し、血管新生抑制を介して抗腫瘍活性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>の異性体であるED-71は現在、商品名エディロールとして骨粗鬆症の治療薬として使用されている。我々は、ED-71が、転写因子NF- $\kappa$ Bシグナル伝達経路を抑制することにより、SCC/OSCC細胞のHBp17/FGFBP発現が抑制されることを明らかにした。ED-71は口腔扁平上皮癌細胞に対して増殖抑制効果を示し、さらに血管新生抑制を介して抗腫瘍活性を示すことが明らかとなり、ED-71を用いた口腔扁平上皮癌治療の有用性が考えられた。

研究成果の概要(英文)： In this study, we examined the potential anti-tumor effect of ED-71, an analog of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, for squamous cell carcinoma cells in vitro and in vivo. The cell lines used were oral squamous cell carcinoma cell lines (NA and UE) established from oral cancer patients, and an epidermoid carcinoma(A431). The growth assay in serum-free culture revealed that ED-71 inhibited the growth of the cancer cell lines in a dose-dependent manner. Oral administration of ED-71 significantly inhibited the growth of A431-derived tumors in athymic nude mice. Immunohistochemical analysis revealed that the expression of HBp17/FGF-BP1, FGF-2, CD31, and Ki-67 in the tumors of ED71-treated group was down-regulated in comparison to control.

These results suggest that ED-71 possesses potential anti-tumor activity for SCCs both in vitro and in vivo. This compound may act directly on the tumor cells or on endothelial cells by modulating the tumor microenvironment.

研究分野：口腔外科学

キーワード：HBp17/FGFBP-1 ビタミンD3

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

HBp17/FGFBP-1 (heparin binding protein17/fibroblast growth factor binding protein-1) は、外陰部扁平上皮癌細胞株 A431 細胞の培養上清より分離精製された 17kDa の分泌タンパクであり、扁平上皮細胞で特異的に発現され、FGF-1、-2 と可逆的に結合し、FGFs のスイッチ分子として標的細胞での FGFs の安定性・遊離・活性化に深く関与していると考えられている。さらに、HBp17/FGFBP-1 は、口腔扁平上皮癌(OSCC)で高発現され、OSCC の増殖や血管新生に密接に関与していることが報告されている。

活性型ビタミン D<sub>3</sub>(1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>、以下、活性型 VD<sub>3</sub>)は骨代謝において重要な働きをするとともに、心臓病や癌の予防効果も報告されている。また、活性型 VD<sub>3</sub>は、NF- $\kappa$ B シグナル伝達経路を抑制することにより、上皮細胞の増殖を制御していることが報告されている。著者の研究室の先行研究で、活性型 VD<sub>3</sub>が NF- $\kappa$ B シグナル伝達経路を介し、OSCC における HBp17/FGFBP-1 の発現を抑制することを明らかにしてきた。

## 2. 研究の目的

本研究では、OSCC 細胞に対する活性型 VD<sub>3</sub>類似化合物 ED-71(中外製薬から供与)の、*in vitro* および *in vivo*における抗腫瘍効果を検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

腫瘍細胞として、OSCC 由来細胞株 Ho-1-u-1(UE)、Ho-1-n-1(NA)および A431 細胞を用いた。すべての細胞培養は DMEM と Ham-F12 培地を 1:1 の比率で混合した DF 基礎栄養培地に、insulin (10 $\mu$ g/ml)、transferrin (5 $\mu$ g/ml)、2-mercaptoethanol (10 $\mu$ M)、2-aminoethanol (10 $\mu$ M)、sodium selenite (10nM)、oleic acid (4.7 $\mu$ g/ml: 500  $\mu$ g/ml の fatty acid-free bovine serum albumin と結合)の 6 因子を加えた無血清培地 DF6F を用いた。ED-71 の各細胞の増殖に及ぼす影響を検討するため、各細胞を 24 穴プレートに 10<sup>4</sup>/ml/well の細胞密度で播種し、同時に ED-71 (0-40nM)および活性型 VD<sub>3</sub> (0-40nM)を添加し 6 日間培養後、コールターカウンターにて細胞数を測定した。種々の濃度の ED-71 及び活性型 VD<sub>3</sub>で細胞を処理後、経時的に蛋白及び RNA を抽出し、HBp17/FGFBP-1 遺伝子・蛋白の発現を定量 PCR 法 (qPCR) およびウエスタンブロット法 (WB) にて検討し、HBp17/FGFBP-1 発現に及ぼす ED-71 及び VD<sub>3</sub>の濃度依存的及び経時的影響を検討した。さらに、HBp17/FGFBP-1 遺伝子プロモーター配列をルシフェラーゼ遺伝子の上流に組み込み、NA 及び A431 細胞に遺伝子導入後、ED-71 によるレポーター活性について検討した。また、UE、NA 細胞に ED-71 (0.4nM)を添加し、12 時間後に RNA 及び蛋白を抽出し、HBp17/FGFBP-1、FGF-2、ビタミン D<sub>3</sub> レセプター (VDR) 及び NF- $\kappa$ B 関連分子群 (I $\kappa$ B、p65、p50) の遺伝子・蛋白発現を qPCR 及び WB にて検討した。さらに、NA 細胞に VDRi を遺伝子導入し VDR 発現を抑制した NA 細胞を用いて、ED-71 の HBp17/FGFBP-1 発現に及ぼす影響を検討した。対照として scramble siRNA 導入細胞を用いた。また、ED-71 の、NA 細胞の遺伝子発現に及ぼす影響を、DNA マイクロアレイ法を用いて検討した。NA 及び A431 細胞における Serpin B1 遺伝子の発現に及ぼす ED-71 の影響を qPCR にて検討した。

ヌードマウス移植腫瘍を用いて、*in vivo*での ED-71 の抗腫瘍効果を検討した。1 X10<sup>6</sup> の A431 細胞を BALB/c nu/nu、8 週齢の雄性マウスの背部皮下に移植し、対照群 (0.5% Tween80/MQ)、ED-71-1 (0.1  $\mu$ g/kg) 群、ED-71-2 (0.5  $\mu$ g/kg) 群の 3 群 (各群 5 匹) に、移植初日より 4 日毎に gavage needle を用いて ED-71 を経口投与した。4 日おきに腫瘍の長径と短径を計測し、腫瘍体積=(短径)<sup>2</sup>×(長径)×1/2 の計算式で腫瘍体積を算定し、移植 28 日後に腫瘍組織を摘出し種々の検討を行った。

## 4. 研究成果

活性型 VD<sub>3</sub> 及び ED-71 は、DF6F を用いた無血清培養系で、濃度依存的に NA、UE 細胞の増殖を抑制した(図 1)。ED-71 の IC<sub>50</sub> は活性型 VD<sub>3</sub> の約 1/100 であった。UE、NA 及び A431 細胞における HBp17/FGFBP-1 遺伝子の発現は ED-71 濃度依存的に抑制され、経時的には ED-71 処理 12 時間後に最も強く抑制された。レポーターアッセイにおいて、HBp17/FGFBP-1 遺伝子プロモーター配列を遺伝子導入した NA 細胞と A431 細胞では、ED-71 によりレポーター活性が約 50% 低下した。また、FGF-2、VDR、p65 及び p50 の発現は、ED-71 により影響を受けなかったが、I B の発現は有意に増大した。一方、siVDR 導入細胞では、ED-71 による I B 遺伝子の発現誘導及び HBp17/FGFBP-1 遺伝子の発現抑制は認められなかった。DNA マイクロアレイ解析の結果、ED-71 はその主たる代謝酵素である CYP24A1 の遺伝子発現を強く誘導し、さらに Serpin B1 遺伝子の発現を約 8 倍誘導した。NA 及び A431 細胞における Serpin B1 遺伝子の発現は、ED-71 により有意に増大した。

ヌードマウス移植 A431 細胞由来腫瘍の増殖は、ED-71-2 (0.5 μg/kg) 群で有意に抑制された(図 2)。また、同群では HBp17/FGFBP-1 及び FGF-2 遺伝子・蛋白の発現は低下し、さらに、CD31 陽性血管密度及び Ki67 陽性増殖細胞数も有意に低下した。

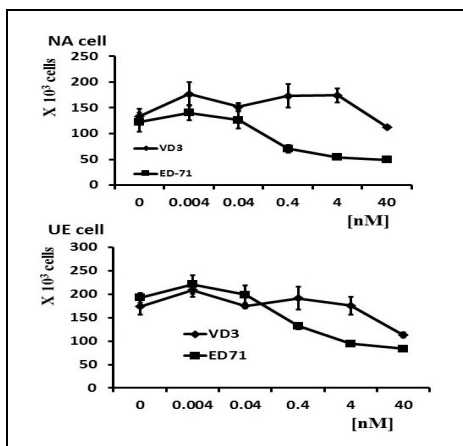


図 1

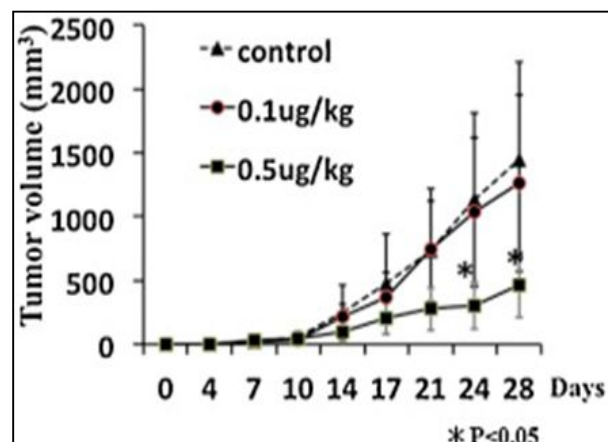


図 2

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 2 件)

Eldecalcitol (ED-71), an analog of 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, inhibits the growth of squamous cell carcinoma (SCC) cells in vitro and in vivo by down-regulating expression of heparin-binding protein 17/fibroblast growth factor-binding protein-1 (HBp17/FGFBP-1) and FGF-2. Shintani T, Takatsu F, Rosli SNZ, Usui E, Hamada A, Sumi K, Hayashido Y, Toratani S, Okamoto T. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2017 Oct;53(9):810-817 査読有

.Eldecalcitol (ED-71), an analog of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> as a potential anti-cancer agent for oral squamous cell carcinomas. Shintani T, Rosli S.N.Z, Takatsu F, Choon Y.F. Hayashido Y, Toratani S, Usui E, Okamoto T. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2016 Nov;164:79-84. 査読有

### 〔学会発表〕(計 2 件)

活性型ビタミン D<sub>3</sub>(1, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>)とその誘導体エルデカルシトール(ED-71)の扁平上皮癌に対する抗腫瘍効果の検討; 鷹津冬良, 新谷智章, Rosli S.N.Z., 笛吹恵美子, 岡本哲治; 第 70 回 NP0 法人日本口腔科学会学術集会 2016

活性型ビタミン D<sub>3</sub>(1, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>)とその誘導体-エルデカルシトール(ED-71)の口腔扁平上

皮膚に対する抗腫瘍効果の検討；鷹津冬良，新谷智章，Rosli S.N.Z.，笛吹恵美子，岡本哲治；

第 52 回日本口腔組織培養学会学術大会・総会 2016

〔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：  
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：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：岡本 哲治

ローマ字氏名：Okamoto Tetsuji

所属研究機関名：広島大学

部局名：医歯薬保健学研究科(歯)

職名：教授

研究者番号(8桁)：00169153

研究分担者氏名：林堂 安貴

ローマ字氏名：Hayashido Yasutaka

所属研究機関名：広島大学

部局名：医歯薬保健学研究科(歯)

職名：講師

研究者番号(8桁)：70243251

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：笛吹 恵美子

ローマ字氏名：Usui Emiko

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。