

平成 21 年 5 月 1 日現在

研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18390532
 研究課題名 (和文) 癌細胞の殺癌細胞遺伝子の操作による抗癌剤のアポトーシス増強に関する研究

研究課題名 (英文) Augmentation of apoptosis in OSCC using oncogene therapy.

研究代表者

越後 成志 (Echigo Seishi)
 東北大学・大学院歯学研究科・教授
 研究者番号 70005114

研究成果の概要：

口腔扁平上皮癌細胞株 (HSC-3, -4)、および p53 野生型の肺癌細胞株 A549、乳癌細胞株 MCF-7 を用いて、エピジェネティクス制御化合物である Zebularine (ZEB) と suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) と各種抗癌剤 (CDDP, 5-FU, VP-16) の併用効果によるアポトーシス誘導効果、およびそのメカニズムを検討した。

本年度の研究より、以下の興味深い新知見が明らかとなった。ZEB や SAHA による抗癌剤の増強作用は、併用する抗癌剤、細胞種により異なった。CDDP/SAHA の組み合わせは、HSC-3 細胞のアポトーシスを有意に増強した。この増強には、SAHA が小胞体にストレスを与え、小胞体経路のアポトーシスが関与していることが示唆された。一方、5-FU/ZEB の組み合わせでは、逆に 5-FU の細胞毒性を減弱し、そのメカニズムとして ZEB による CREB のリン酸化が関与していることが示唆された。本研究により、口腔癌の抗癌剤感受性にはエピジェネティクス制御が関与し、ZEB や SAHA と抗癌剤の併用は薬剤感受性増強に有効であることが示唆された。しかし、その併用効果は、併用する抗癌剤の種類、細胞種により異なり、抗癌剤の代謝や抗腫瘍効果の作用機序に依存していることが推察された。本研究成果は、薬剤併用による思いがけない副作用を回避するために非常に重要な意義をもつ。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2007 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	6,300,000	1,890,000	8,190,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：口腔外科学一般 (含病態検査学)

1. 研究開始当初の背景

口腔扁平上皮癌の治療は、外科療法や放射線療法と並んで癌化学療法等で行われているが、これらの組み合わせによる口腔癌治療での治療効果は数多く認められてい

る。しかしながら、摂食、咀嚼、嚥下などの多くの重要な機能を持つ口腔に発生した癌を治癒させるためには癌を切除し、遊離組織移植や皮弁による形態と機能の再

建をはかる外科療法によっているのが現状である。口腔癌の治療に限らず癌の治療は外科的切除を中心とした療法よりも癌化学療法あるいは免疫療法により治癒させることができれば、機能の温存、QOLの向上からいって優れていると思われる。本研究は、このような状況を踏まえて、新たな視点に立った抗癌剤の併用療法を開発するために、ヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤に注目し、この阻害剤による抗癌作用の増強の可能性を追求する。

2. 研究の目的

本研究では、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤を用いて、癌細胞の殺癌細胞遺伝子を操作することにより抗癌剤の作用を高め、癌細胞に効率的にアポトーシスを誘導することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ヒストン脱アセチル化酵素阻害で処理した各種抗癌剤のアポトーシス誘導

細胞株は、口腔扁平上皮癌細胞株(HSC-2, -3, -4)と舌癌由来細胞株(SAS)、およびp53野生型の肺癌細胞株A549を用いる。ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤(HDAC阻害剤)はNaB, SAHA, MS-275を使用する。

DNAメチル化酵素阻害剤(DNMT阻害剤)はDecitabine, Azacitidine, Zebularineを使用する。HDAC阻害剤またはDNMT阻害剤存在下シスプラチン, 5-FU, タキソテールによる抗腫瘍効果を観察し、併用効果のみられる至適条件(各種薬剤濃度、組み合わせ、投与時間)を検討する。細胞毒性はMTT assay, アポトーシスはTUNEL法で解析する。

(2) ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の処理法によるアポトーシス誘導の変動及びヒストン脱アセチル化酵素阻害剤と癌細胞の細胞周期との関連の検討。

至適条件下のアポトーシス誘導について、以下の件を解析する。

Sub-G1測定によるアポトーシス誘導率、フローサイトメトリー法による細胞周期の測定。特に、阻害剤や抗癌剤による細胞周期停止は重要な意味をもつので、詳細に検討する。カスパーゼカスケードの解析は、アポトーシスの要因を知る上で重要であるので、本研究では、Caspase-3, -8, -9について調べる。

(3) アポトーシスにおけるミトコンドリアの役割

細胞内のミトコンドリアがアポトーシスの中心的位置にあることが確認されている。本研究においても、ミトコンドリアが関与し、重要な役割を担っている可能性が大きいと、以下の実験によりミトコンドリアの役割について検討する。

活性酸素(ROS)の生成、膜電位の変化、チトクロームCの放出、チトクロームCによるCaspase-9の活性化。

(4) MAPキナーゼおよびPI3/Aktキナーゼの解析

多種類のキナーゼがアポトーシス経路に関与し、これをコントロールすることが指摘されている。このうち、併用効果の機構としてMAPキナーゼ(p38, ERK, JNK)がBcl-2ファミリー分子をリン酸化し、アポトーシスを促進している可能性を検討する。

(5) 転写因子の制御

活性化NF-kappa Bは転写因子としてアポトーシスの促進あるいは抑制遺伝子の重要な制御因子となる。特に、抗癌剤に対するアポトーシス感受性に深く関与することが予想されるので、併用によるNF-kappa Bの活性化レベルを各処理群で比較検討する。方法は、a)ゲルシフトアッセイ法、

b)NF-kappa Bの認識配列を含むオリゴヌクレオチドをコーティングした96穴プレートを用いたELISA用キットを用いる。転写因子CREBについてもb)と同様の方法でその活性を測定する。

(6) 関連アポトーシス因子の同定

抗癌剤によるアポトーシスの誘導に、Bcl-2ファミ (Bcl-2, Bcl-XL, Bax, Bid), IAPファミリー (XIAP, IAP-1, IAP-2), TRAFファミリーなどのアポトーシス関連蛋白が関与している。本実験系の併用効果でこれらの因子にどのような変化が観察されるのかをReal-time PCR法、フローサイトメトリー法、ウエスタンブロット法などで解析する。

4. 研究成果

HSC-3細胞では、CDDP単独処理に比較してZEBの前処理またはSAHAの同時処理でCDDPによる細胞毒性が有意に増強した。CDDP単独で30%、CDDP/ZEBまたはCDDP/SAHAで80%のアポトーシス誘導が確認された。一方、5-FUの処理では、5-FU/SAHAでアポトーシス誘導の増強が観察されたが、5-FU/ZEBは逆に5-FUの細胞毒性を減弱するという、興味深い知見が得られた。CDDP/SAHAによる抗腫瘍効果の増強は、SAHAが小胞体にストレスを与え、小胞体経由のアポトーシスが関与していることが示唆された。一方、5-FU/ZEBの組み合わせでは、逆に5-FUの細胞毒性を減弱し、そのメカニズムとしてZEBによるCREBのリン酸化が関与していることが示唆された。本研究結果により、口腔癌の抗癌剤感受性にはエピジェネティクス制御が関与し、ZEBやSAHAと抗癌剤の併用は薬剤感受性増強に有効であることが示唆された。しかし、その併用効果は、併用する抗癌剤の種類、細胞種により異なり、抗癌剤の代謝や抗腫瘍効果の作用機序に依存していることが推察された。本研究

成果は、薬剤併用による思いがけない副作用を回避するために非常に重要な意義をもつ。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計5件)

①Suzuki M, Endo M, Shinohara F, Echigo S and Rikiishi H. Enhancement of cisplatin cytotoxicity by SAHA involves endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in oral squamous cell carcinoma cells. *Cancer Chemo. Pharma.* (Online Pub. 2009 Feb.) 査読有り

②Suzuki M, Shinohara F, Endo M, Sugazaki M, Echigo S and Rikiishi H. Zebularine suppresses the apoptotic potential of 5-fluorouracil via cAMP/PKA/CREB pathway against human oral squamous cell carcinoma cells. *Cancer Chemo. Pharma.* (Online Pub. 2008 Oct.) 査読有り

③ Suzuki M, Shinohara F, Nishimura K, Echigo S and Rikiishi H. Epigenetic regulation of chemosensitivity to 5-fluorouracil and cisplatin by zebularine in oral squamous cell carcinoma. *Int. J. Oncology* (31) 1449-1456, 2007 査読有り

④Suzuki M, Shinohara F, Nishimura K, Sato Y, Echigo S and Rikiishi H. Epigenetic regulation of susceptibility to anti-cancer drugs in HSC-3 cells. *Interface Oral Health Science* 279-280, 2007 査読有り

⑤Rikiishi H, Shinohara F, Sato T, Sato Y, Suzuki M and Echigo S. Chemosensitization of oral squamous cell carcinoma cells to cisplatin by histone deacetylase inhibitor, Suberoylanilide hydroxamic acid. *Int. J. Oncology* (30) 1181-1188, 2007 査読有り

[学会発表] (計4件)

①Maiko Suzuki, Fumiaki Shinohara, Manabu Endo, Masaki Sugazaki, Seishi Echigo and Hidemi Rikiishi. Effects of Zebularine on the apoptosis of 5-Fluorouracil via cAMP/PKA/CREB pathway against human oral

squamous cell carcinoma cells. The 3rd International Symposium for interface Oral Health Science.

2009年1月15～16日 仙台

②鈴木麻衣子、篠原文明、遠藤学、菅崎将樹、越後成志、力石秀実

口腔癌の血管新生とエピジェネティクス制御。第50回歯科基礎医学会。

2008年9月23～25日 東京

③遠藤学、鈴木麻衣子、篠原文明、菅崎将樹、越後成志、力石秀実

エピジェネティクス制御剤による血管新生の抑制。日本細菌学会東北支部総会。

2008年8月21～22日 十和田

④鈴木麻衣子、篠原文明、菅崎将樹、越後成志、力石秀実

口腔癌の VEGF 産生とエピジェネティクス制御。第5回東北大学バイオサイエンスシンポジウム。2008年5月19日 仙台

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

越後 成志 (Echigo Seishi)

東北大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号: 70005114

(2) 研究分担者

力石 秀実 (Rikiishi Hidemi)

東北大学・大学院歯学研究科・准教授

研究者番号: 70091767

(3) 連携研究者