

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09719

研究課題名(和文) カテキンによる血管内皮増殖因子受容体の分解機構解明と口腔癌分子標的薬治療への応用

研究課題名(英文) Elucidation of the degradation mechanism of vascular endothelial growth factor receptor by catechin and its application to oral cancer targeted drug treatment

研究代表者

吉村 仁志 (Hitoshi, Yoshimura)

福井大学・学術研究院医学系部門・教授

研究者番号：40362917

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：口腔扁平上皮癌細胞株のマウス移植モデルを用いてEGCGとアバスタチンの効果を検討した。EGCGは腹腔内投与し、アバスタチンは腫瘍周囲に皮下注射した。腫瘍のサイズを評価し、また組織化学的に検討した。EGCG投与では、腫瘍体積の増大は抑制され、アバスタチン投与はさらに相乗的に抑制した。細胞分裂について抗Ki67抗体にて評価し、コントロール群に比較しEGCG投与群やアバスタチン投与群では抑制され、EGCG+アバスタチン投与群ではさらに抑制された。血管新生について抗CD31抗体にて評価し、コントロール群に比較しEGCG投与群やアバスタチン投与群では抑制され、EGCG+アバスタチン投与群ではさらなる抑制を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔扁平上皮癌は口腔領域で最も一般的な悪性腫瘍の1つである。現在までのさまざまな治療戦略にもかかわらず、生存率は十分には改善されていない。このため治療への新しいアプローチを開発することは重要となる。今回の我々の結果は、血管新生の抑制を介した腫瘍治療におけるEGCGの有用性を示唆したと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The effects of EGCG and Avastin were investigated using a mouse transplantation model of an oral squamous cell carcinoma cell line. EGCG was administered intraperitoneally, and Avastin was injected subcutaneously around the tumor. Tumor size was evaluated and histochemically examined. Administration of EGCG suppressed the increase in tumor volume, and administration of Avastin further suppressed it synergistically. Cell division was evaluated with anti-Ki67 antibody, and was suppressed in the EGCG-administered group and Avastin-administered group, and further suppressed in the EGCG + Avastin-administered group compared to the control group. Angiogenesis was evaluated with anti-CD31 antibody, and compared with the control group, it was suppressed in the EGCG-administered group and Avastin-administered group, and further suppressed in the EGCG + Avastin-administered group.

研究分野：口腔癌

キーワード：口腔癌 EGCG アバスタチン

1. 研究開始当初の背景

口腔癌は頭頸部悪性腫瘍の1つであり、再発のリスクが高い疾患である。過去の統計学的報告では、世界における年間の発生例は30万症例で、男性に多く発生する傾向が示されている。頭頸部癌において、全症例のほぼ50%が口腔に発生する。舌が最も多く、そして歯肉、頬粘膜、口底、口蓋、となり口唇にも発生する。口腔癌の病因に寄与する重要な危険因子は、アルコール摂取とタバコの喫煙とされている。組織学的に、口腔癌の90%以上が口腔扁平上皮癌 (OSCC) となっている。OSCC 患者の5年生存率は、数十年間で改善はみられるものの、外科手術、放射線療法、化学療法などの治療の進歩にもかかわらず、十分ではない。生存率の低さは、局所領域の再発と局所リンパ節転移に起因しているとされている。OSCC は依然として治療が困難な疾患であり、新規の抗増殖治療法を開発することは重要な課題となっている。

2. 研究の目的

緑茶は世界的に一般的な飲料となっているが、健康への有用性に関してさまざまな研究がなされている。疫学的研究においては、緑茶は口腔癌も含めて癌に対する予防効果を持つことを明らかにされてきている。緑茶の生物活性は、乾燥重量の30%を占めるポリフェノール成分に起因している。緑茶中のポリフェノールには、エピガロカテキン-3-ガレート (EGCG)、エピガロカテキン (EGC)、エピカテキン-3-ガレート (ECG)、エピカテキン (EC) など、多くのカテキンが含まれており、EGCG が最も効果的なポリフェノールとされている。EGCG の使用は、肺癌、肝臓癌、乳癌、結腸直腸癌、前立腺癌、皮膚癌のようないくつかの癌タイプにおいて、細胞培養での実験や動物の腫瘍モデルで癌の進行を抑制することが示されている。それにもかかわらず、特に実験動物モデルにおいて、ヒト OSCC 細胞に対する EGCG の効果を扱った研究はほとんどない。またこれらの効果について、特に血管新生への影響を評価するため、抗 VEGF 抗体製剤であるアバスタチンとの併用療法についての有用性を検討したいと考えた。本研究では、ヒト OSCC 細胞株を用いて *in vitro* にて細胞増殖への影響を調べ、また血管新生の抑制作用について *in vivo* 異種移植マウスモデルに対する EGCG とアバスタチン (Bevacizumab) の効果を評価することを目的とした。これらにより、口腔癌治療のための EGCG の治療の可能性について検討を行う。

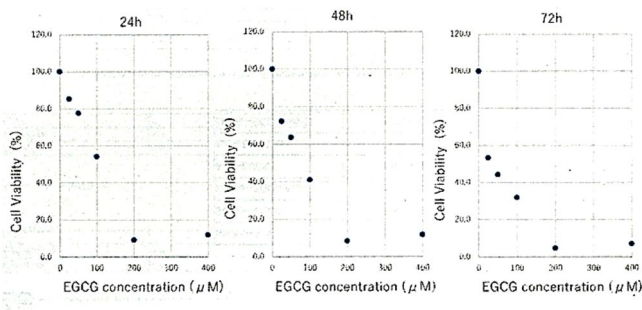
3. 研究の方法

in vitro および *in vivo* において、ヒト OSCC に対する EGCG とアバスタチンの併用療法による治療的可能性を評価した。*in vitro* 実験では、HSC-1, HSC-3, HSC-4, HeLa, NRS-1 の腫瘍細胞を用いて、MTS アッセイによる生存率を、EGCG の作用時間および用量の影響について検討した。またアバスタチンの腫瘍増殖に対する効果を確認した。*in vivo* 実験ではヌードマウスでの異種移植片実験を行った。口腔扁平上皮癌の細胞株である HSC2, HSC-3, HSC-4 のうち最も低分化とされる HSC-3 を、担体となる物質と混和した上でヌードマウスの背部に移植した。コントロール群、EGCG 投与群、アバスタチン投与群、EGCG+アバスタチン投与群に分けた。カテキンは腹腔内への投与経路を選択し、アバスタチンは腫瘍周囲の皮下注での投与経路を選択した。週2回腫瘍のサイズを確認し、1か月後にマウスから癌組織を取り出し、4% PFA で固定後、パラフィン切片を作製した。HE と Ki 67 による増殖活性と、CD31 による血管内皮細胞への影響について免疫組織化学的検討を行った。

4. 研究成果

EGCG とアバスタチンによる *in vitro* で腫瘍細胞の増殖抑制効果

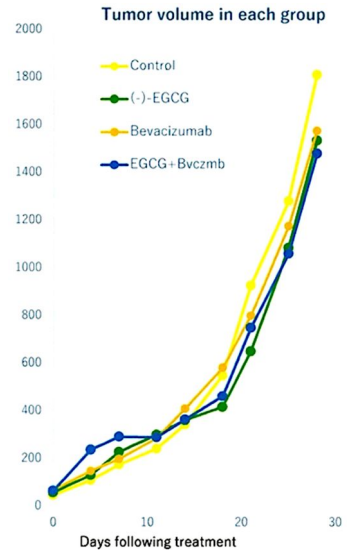
HSC-3 細胞を種々の濃度の異なる濃度の EGCG と共に培養した。細胞生存率に基づいて、阻害率を MTS アッセイにより評価した。EGCG は用量および時間に依存して細胞生存率を有意に阻害した。我々は、HSC-1, HSC-3, HSC-4, HeLa, NRS-1 細胞でも同様の実験を行い、これらについても抑制効果を示すことが明らかにされた。一方でアバスタチンは増殖に対する抑制効果を示さないことが明らかとなった。



EGCG とアバスタチンによる in vivo での HSC-3 細胞の腫瘍増殖抑制

HSC-3 細胞をヌードマウスの背中に皮下移植した。HSC-3 細胞移植の 2 週間後、75 mg/kg の EGCG または生理食塩水を 1 週間に 2 回 4 週間腹腔内投与した。またアバスタチンは 10 mg/ml を 25 μ L ずつまたは生理食塩水を 1 週間に 2 回 4 週間腫瘍の頭側と尾側にそれぞれ投与した。EGCG を腹腔内投与した場合には、腫瘍体積の評価において腫瘍細胞の増殖は有意に抑制され、アバスタチンの投与も同様に抑制効果を示し、さらに両者の併用により相乗的に抑制を示した。一方でマウスの体重は有意には減少しなかった。in vitro データと一致して、EGCG は異種移植モデルにおいて腫瘍増殖を有意に阻害した。

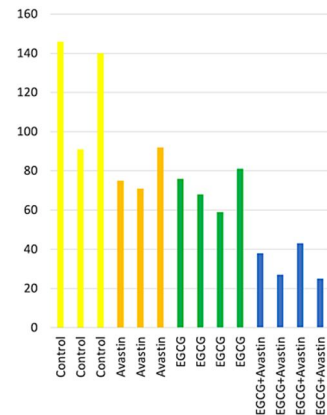
(黄色：コントロール群，緑：EGCG 群
オレンジ：アバスタチン群，青 EGCG+アバスタチン群)



EGCG とアバスタチンによる in vivo での HSC-3 細胞の分裂抑制

細胞分裂について抗 Ki67 抗体を用いて調べたところ、コントロール群に比較して、EGCG 投与群やアバスタチン投与群では抑制され、また EGCG+アバスタチン投与群では、さらなる抑制が認められた。

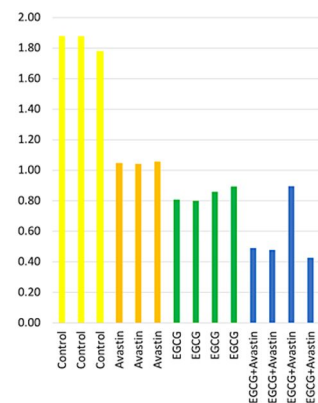
(黄色：コントロール，オレンジ：アバスタチン，
緑：EGCG，青 EGCG+アバスタチン)



EGCG とアバスタチンによる in vivo での HSC-3 細胞の血管新生抑制

血管新生について抗 CD31 抗体を用いて調べたところ、コントロール群に比較して、EGCG 投与群やアバスタチン投与群では抑制され、また EGCG+アバスタチン投与群では、さらなる抑制が認められた。

(黄色：コントロール，オレンジ：アバスタチン，
緑：EGCG，青 EGCG+アバスタチン)



考察

今回我々は、口腔扁平上皮癌細胞株のマウス腫瘍移植モデルにおける、カテキンの一種である EGCG の腫瘍増殖抑制効果と、それに加えて抗 VEGF 抗体製剤であるアバスタチンの相乗効果を検討した。EGCG とアバスタチンがヒト OSCC 細胞において in vitro および in vivo で抗腫瘍効果をもたらすことを実証した。OSCC 腫瘍の有意な増殖阻害が、体重の減少無しに EGCG とアバスタチンの投与マウスにおいて認められた。したがって、我々は EGCG が OSCC 治療のための有用な薬剤となりうると考えた。口腔癌治療に対する EGCG の有用性を明らかにするために、さらなる研究、特に分子レベルおよび臨床レベルでの研究を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉村仁志, 吉田寿人, 松田慎平, 山本哲嗣, 領家 崇
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌におけるEGCGによる細胞増殖抑制およびアポトーシスの誘導についての検討
3. 学会等名 第39回日本口腔腫瘍学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉村仁志, 大田圭一, 白銀陽一郎, 糸井勇人, 領家 崇, 山本哲嗣, 吉田寿人, 松田慎平
2. 発表標題 上顎に生じたエナメル上皮癌の1例
3. 学会等名 第40回日本口腔腫瘍学会総会・学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉村仁志, 糸井勇人, 領家 崇, 吉田寿人, 島田美那子, 松田慎平
2. 発表標題 多発性骨髄腫患者にみられた下顎骨関節突起の病的骨折の1例
3. 学会等名 第33回日本顎関節学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hitoshi Yoshimura, Shinpei Matsuda, Hayato Itoi, Takashi Ryoke, Jun-ichi Akutsu, Hisato Yoshida
2. 発表標題 The use of a piezoelectric device for the removal of a sequestrum extending the inferior alveolar nerve in patients with medication-related osteonecrosis of the jaws
3. 学会等名 14th Asian Congress on Oral & Maxillofacial Surgery (ACOMS)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉村仁志, 大場誠悟, 山本哲嗣, 領家 崇
2. 発表標題 外傷後の多数歯欠損を伴う顎顔面変形治癒に対して下顎枝矢状分割術と骨移植及びインプラント治療をした1例
3. 学会等名 第31回特定非営利活動法人日本顎変形症学会総会・学術大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関