

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K17234

研究課題名（和文）核-細胞間輸送に關与する受容体を標的とした口腔がん治療の基礎研究

研究課題名（英文）Basic research on oral cancer treatment targeting receptors involved in transport between the nucleus and cells

研究代表者

仲川 洋介（Nakagawa, Yosuke）

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：00714875

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、核外輸送タンパクであるEXP01阻害剤を使用することで、がん抑制遺伝子産物を核内から核外に輸送する機能を減弱させて、放射線照射や抗がん薬との併用により殺細胞効果に増感を生じるか、がんの増殖抑制や促進遺伝子の発現に変化を認めるか分子生物学的視点からの検討を行うことを目的とした。

放射線や5-FU単独作用時と比較し、EXP01阻害剤を併用することでDNA二本鎖切断が増加することで効率的なアポトーシスが誘導され、殺細胞効果に増感がもたらされると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

既存の口腔がん治療である放射線や抗がん剤に、核外輸送タンパクであるEXP01阻害剤を併用することで増感効果がもたらされるのか否かを検討した研究は見当たらず、新規性が高い研究と考えられる。

本研究は細胞レベルでの初期段階の研究であるが、既存の薬剤および治療方法の組み合わせで新たな治療方法を模索することは、新規の薬剤や治療機器を生み出すことに比べ費用的にもコストがかからず社会的な意義も大きいと考える。

研究成果の概要（英文）：In this study, we used an EXP01 inhibitor, which is a nuclear export protein, to attenuate the ability to transport cancer-suppressing gene products from the nucleus to the nucleus, and killed cells by irradiation or in combination with anticancer drugs. We examined whether the effect would be sensitized. Furthermore, the purpose of this study was to investigate whether changes in cancer growth suppression and promotion gene expression were observed from the viewpoint of molecular biology.

Compared with radiation and 5-FU alone, the combined use of EXP01 inhibitor increased DNA double-strand breaks, which induced efficient apoptosis. As a result, it was considered that the cell-killing effect was sensitized.

研究分野：外科系歯学

キーワード：口腔がん治療 核外輸送蛋白 EXP01阻害剤

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

核外輸送タンパク (exportin 1 = XPO1/CRM1) は、がん抑制遺伝子産物を核内 から核外に輸送することでそれらの機能を減弱させ、結果としてがん細胞の増殖に寄与していると考えられている。これまでに、核外輸送タンパクを阻害する薬剤として leptomycin B が開発され、近年では新たな阻害薬を用いたがん治療の臨床研究も試みられている。

一方で p53 をはじめとするがん抑制遺伝子および遺伝子産物は、これまでの研究から放射線や抗がん剤の感受性に大きな影響を与え、効率的なアポトーシス誘導にも重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。

2. 研究の目的

今回の研究では、本研究では、核外輸送タンパクである XPO1 の阻害薬を使用することで、がん抑制遺伝子産物を核内から核外に輸送する機能を減弱させて、放射線照射や抗がん薬との併用により殺細胞効果に増感を生じるか否か、またアポトーシス誘導などに関して分子生物学的視点からの検討を行うことを目的とした

3. 研究の方法

(1) ヒト扁平上皮がん細胞株 (SAS 細胞) を用いて、核外輸送タンパク (exportin 1) の阻害薬 (Eltanexor) の細胞処理時間、処理濃度の決定を行うことから開始した。

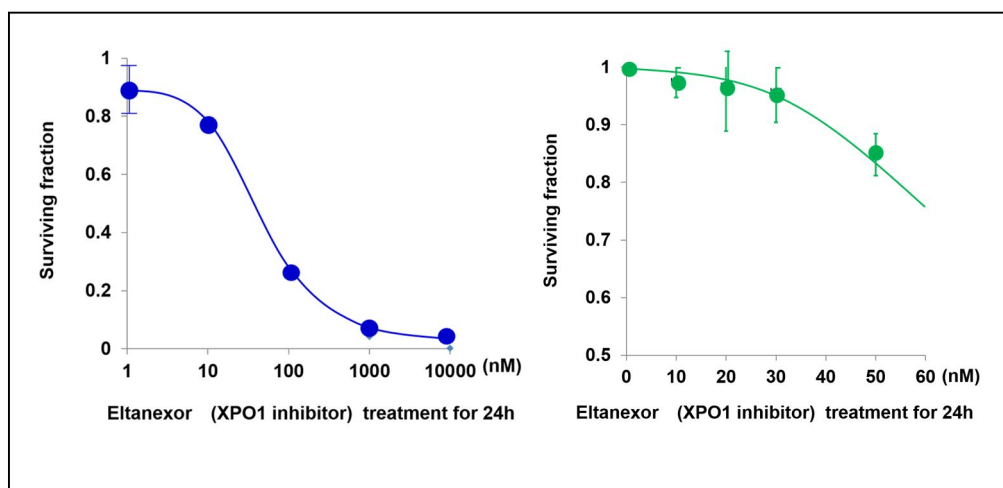
(2) SAS 細胞を用いて、X 線照射単独時と exportin 1 阻害薬併用時および 5-FU 単独作用時と exportin 1 阻害薬併用時での細胞生存率についてコロニー形成法を用いて算出した。

(3) 5-FU 単独作用時と exportin 1 阻害薬併用時でのフローサイトメトリーを用いて細胞周期の変化を検討した。

(4) 5-FU 単独作用時と exportin 1 阻害薬併用時でのアポトーシスの増加の有無を Hoechst 染色にて検討を行った。

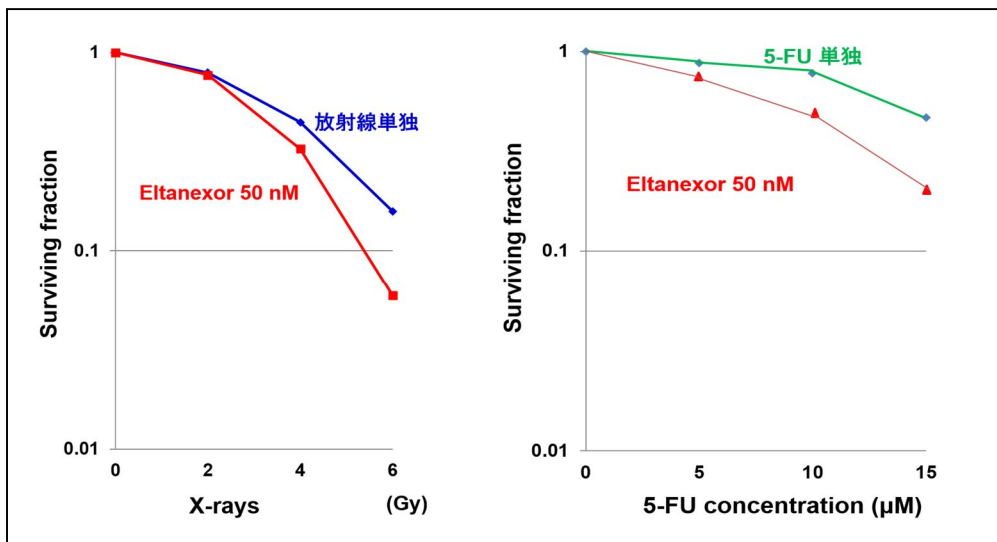
4. 研究成果

(1) 濃度を振り分けた XPO1 阻害剤の単剤処理を 24 時間行い、細胞生存率をコロニー形成法にて算出した。阻害剤単独で IC50 を超えない濃度として、本研究では XPO1 阻害剤を併用で使用する場合は 50nM で 24 時間処理を行うこととした。



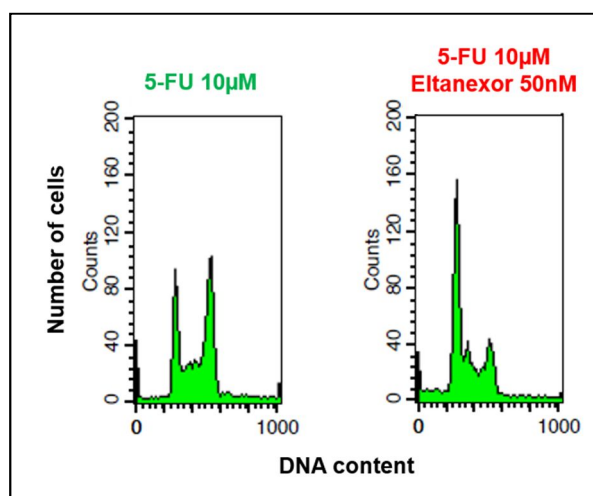
(2) 放射線 4Gy 照射単独時で約 40%、6Gy 照射単独時には約 15% の生存率であったが、照射直前に XPO1 阻害剤を添加し放射線 4Gy 照射時には約 20%、6Gy 照射時には約 5% の生存率まで低下を認め、XPO1 阻害剤併用で増感効果を認める結果となった。さらに、2 時間前に XPO1 阻害剤を添

加すると、さらに放射線照射の増感効果を認める結果であった。また、5-FUにおいてもEXP01阻害剤併用時で増感効果を認める結果となった。

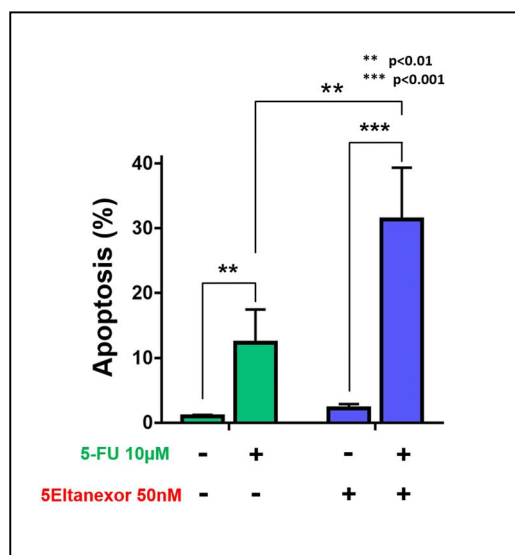


(3) フローサイトメトリーにて、5-FU単独作用時では作用24時間後にS期での細胞周期の停止を認められたが、exportin1阻害剤併用時では細胞周期の明らかな停止は認めなかった。

また、exportin1阻害剤併用時ではSubG1領域の割合が5-FU単独時と比較し約2倍となった。



(4) Hoechst染色にてアポトーシスの増加に関して検討を行ったところ、5-FU単独作用時と比較しexportin1阻害剤併用時では、著明な増加を認めた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Ito SS, Nakagawa Y, Matsubayashi M, Sakaguchi YM, Kobashigawa S, Matsui TK, Nanaura H, Nakanishi M, Kitayoshi F, Kikuchi S, Kajihara A, Tamaki S, Sugie K, Kashino G, Takahashi A, Hasegawa M, Mori E, Kirita T. | 4. 巻 295(37) |
| 2. 論文標題 Inhibition of the ATR kinase enhances 5-FU sensitivity independently of nonhomologous endjoining and homologous recombination repair pathways. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry | 6. 最初と最後の頁 12946-12961 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA120.013726 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 下辻寛子、上田順宏、仲村秀明、仲川洋介、高橋佑佳、桐田忠昭 | 4. 巻 第65巻5号 |
| 2. 論文標題 舌粘膜下血腫を契機として診断に至った後天性血友病Aの1例 | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 日本口腔外科学会雑誌 | 6. 最初と最後の頁 345-350 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Yosuke Nakagawa, Atsuhisa Kajihara, Akihisa Takahashi, Akiho S Murata, Masaya Matsubayashi, Soichiro S Ito, Ichiro Ota, Takahiko Nakagawa, Masatoshi Hasegawa, Tadaaki Kirita, Takeo Ohnishi, Eiichiro Mori | 4. 巻 34 |
| 2. 論文標題 BRCA2 protects mammalian cells from heat shock | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 International Journal of Hyperthermia | 6. 最初と最後の頁 795-801 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Yosuke Nakagawa, Atsuhisa Kajihara, Tadaaki Kirita, Eiichiro Mori | 4. 巻 34 |
| 2. 論文標題 Heat Meets DNA: DNA Damage and Repair | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Thermal Medicine | 6. 最初と最後の頁 15-22 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3191/thermalmed.34.15 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 仲川 洋介、伊藤 宗一郎、桐田 忠昭、森 英一郎 |
| 2. 発表標題 ATR阻害による温熱感受性の増強 |
| 3. 学会等名 第22回 菅原・大西記念 癌治療増感シンポジウム in 奈良 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 伊藤 宗一郎、仲川 洋介、桐田 忠昭、森 英一郎 |
| 2. 発表標題 ATR阻害は5-FUの感受性を増強する |
| 3. 学会等名 第22回 菅原・大西記念 癌治療増感シンポジウム in 奈良 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 伊藤宗一郎、仲川洋介、桐田忠昭 |
| 2. 発表標題 口腔がん細胞における選択的ATR阻害による温熱増感効果の検討 |
| 3. 学会等名 第39回一般社団法人 口腔腫瘍学会総会・学術大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 木村健人、仲川洋介、中山洋平、有川 翔、栗原都、下村弘幸、桐田 忠昭 |
| 2. 発表標題 下顎骨内に発生した神経鞘腫の 1 例 |
| 3. 学会等名 第51回（公社）日本口腔外科学会 近畿支部学術集会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名 伊藤宗一郎、仲川洋介、桐田忠昭 |
| 2. 発表標題 DNA修復機構を標的とした口腔がん治療の基礎的研究 |
| 3. 学会等名 第43回日本頭頸部癌学会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Soichiro Ito、 Yosuke Nakagawa、 Tadaaki Kirita |
| 2. 発表標題 ATR inhibition by VE-821 sensitizes human oral cancer cells to 5-Fluorouracil |
| 3. 学会等名 IAOO 2019, 7th WORLD CONGRESS of the International Academy of Oral Oncology Roma, Italy (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Yosuke Nakagawa、 Soichiro Ito、 Nobuhiro Ueda、 Nobuhiro Yamakawa、 Tadaaki Kirita |
| 2. 発表標題 Inhibition of homologous recombination pathway enhances heat sensitivity in human oral cancer cells |
| 3. 学会等名 IAOO 2019, 7th WORLD CONGRESS of the International Academy of Oral Oncology Roma, Italy (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|------------------------------------|
| 1. 発表者名 伊藤宗一郎、 仲川洋介、 桐田忠昭、 森英一郎 |
| 2. 発表標題 ATR阻害剤VE-821は温熱感受性を増強する |
| 3. 学会等名 日本ハイパーサーミア学会 第36回大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 仲川洋介 |
| 2. 発表標題 BRCA2 Protects Mammalian Cells From Heat Shock |
| 3. 学会等名 日本ハイパーサーミア学会 第36回大会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Yosuke Nakagawa, Soichiro Ito, Tadaaki Kirita |
| 2. 発表標題 ATR inhibition sensitizes human oral cancer cells to 5-fluorouracil. |
| 3. 学会等名 13th Asian Congress on Oral & Maxillofacial Surgery 2018, Taipei Taiwan. (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

| |
|---|
| 奈良県立医科大学口腔外科学講座 https://nara-oms.com/ 奈良県立医科大学口腔外科学講座 http://www.nara-oms.com/ 奈良県立医科大学 http://nara-oms.com |
|---|

| | | |
|---------------------------|-----------------------|----|
| 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 |
|---------|---------|
|---------|---------|