

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19791482

研究課題名（和文）

エピジェネティクス制御化合物を用いた口腔癌の血管新生と微小転移の抑制

研究課題名（英文）

Suppression of angiogenesis and metastasis on OSCC using epigenetical agents.

研究代表者

篠原 文明（SHINOHARA FUMIAKI）

東北大学・病院・助教

研究者番号：80400258

研究成果の概要：

本研究では各種癌細胞株を用いて、エピジェネティクス制御剤(SAHA、ZEB)と各種抗癌剤(5-Fu、CDDP)を併用し、抗腫瘍効果と、血管新生因子の産生について解析した。抗癌剤単独処理に比較し、エピジェネティクス制御剤を併用することで、アポトーシスが增強する一方で、血管新生因子(VEGF-A、VEGF-C)の産生を抑制した。この抑制メカニズムとして、ZEBによるHIF-1 $\alpha$ の分解と、また、エピジェネティクス制御剤によるVEGFの抑制が、抗癌剤誘導性のアポトーシス増強に直接関与しているわけではないことが示唆された。エピジェネティクス制御剤は口腔癌の薬剤感受性増強や癌の血管新生抑制に有効であることが示唆された。しかし、エピジェネティクス制御剤の効果は、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、臨床応用に向けて、更なる解析が必要である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	0	2,300,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	300,000	3,600,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯科・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

口腔癌の根治をめざすうえで癌の浸潤・転移、再発が最大の障害となっている。本研究では、血管新生抑制効果をもつエピジェネティクス制御剤と抗癌剤を併用し、従来の化学療法では対応できなかった口腔癌の血管新生・転移の抑制をめざしている。

癌細胞による転移の形成は、①原発病巣での癌細胞増殖および血管新生、②浸潤および

脈管への侵入、③血流中での生存、④標的臓器への着床、⑤血管外への遊走、⑥標的臓器での増殖と血管新生、という多段階の反応から成立する。この転移形成のステップには、増殖因子、血管新生因子、浸潤関連分子、接着分子などが重要な役割を演じている。血管新生にかかわる主な因子としてVEGF (vascular endothelial growth factor), bFGF (basic fibroblast growth factor),

MMPs (matrix metalloproteinases) などが知られている。なかでも、VEGFは最も強力な血管新生因子であり、血管内皮細胞の遊走・増殖・管腔形成の促進や、血管透過性の亢進を誘導し、口腔癌をはじめとする多くの固形癌の血管新生において重要な役割を担っている。

申請者は口腔外科臨床に携わり、口腔癌の局所再発や頸部リンパ節転移をきたした予後不良の症例に直面し、再発・転移問題の重大さを痛感している。口腔癌の治癒を期待できる主要な治療法は手術療法と放射線療法であり、癌のリンパ節転移を予防するために術前・術後に化学療法が併用されることがある。口腔癌に対する化学療法として、現在、シスプラチン、カルボプラチン、5-FU、パクリタキセル、ドセタキセル等、様々な抗癌剤が用いられ、これらの有用性が報告されている。しかし、その一方で、薬剤耐性癌細胞の出現や後発転移・局所再発の問題はいまだに解決されていない。これらの抗癌剤の口腔癌細胞に対する抗腫瘍効果の作用機序について不明な点も多く、口腔癌の血管新生や微小転移に及ぼす影響については未知である。浸潤・転移の予防を目的として化学療法を併用する以上、抗癌剤が口腔癌の血管新生や転移に及ぼす影響の解明は必須であり、口腔癌治療に併用する化学療法の意義を再検討する必要があると考える。

## 2. 研究の目的

本研究では、エピジェネティクス制御剤と抗癌剤の併用が口腔癌の血管新生に及ぼす影響を解析し、口腔癌の血管新生の抑制と血行性転移の予防に効果的な化学療法の開発を目的とする。

以下の研究に取り組む。

1) ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤とDNAメチル化酵素 (DNMT) 阻害剤などのエピジェネティクス制御化合物を各種抗癌

剤と併用して、ヒト口腔扁平上皮癌細胞株の血管新生に対する作用をin vitroで検討する。口腔癌細胞株の血管新生を抑制する最適な薬剤の組み合わせ、投与方法のプロトコールをin vitroで確立する。

2) ヒト口腔癌細胞の移植が可能なSCIDマウスに、癌細胞株を移植し、in vitroのプロトコールを参考にin vivoでの移植腫瘍細胞の増殖、腫瘍周囲血管新生、リンパ節転移に対する併用効果を検討する。

3) 2) の検討で得られた、腫瘍増殖の抑制・転移の抑制効果が得られる最適条件下で治療された腫瘍組織を採取し、腫瘍の血管新生とアポトーシスの誘導について、腫瘍免疫学的手法を用いて解析する。

4) 腫瘍組織の血管新生関連遺伝子のアセチル化の亢進、脱メチル化を定量し、併用療法による腫瘍のエピジェネティクス制御を解析する

5) 以上の実験結果に基づき、エピジェネティクス制御化合物を用いた血管新生抑制と転移の抑制をめざした新しい口腔癌化学療法のシステムを提唱する。

## 3. 研究の方法

(1) In vitroにおける血管新生抑制効果の評価

口腔扁平上皮癌細胞株 (HSC-2, -3, -4) と舌癌由来細胞株 (SAS) を用いて、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (HDAC阻害剤; NVP-LAQ824, NaB, SAHA, MS-275) とDNAメチル化酵素阻害剤 (DNMT阻害剤; Decitabine, Azacitidine, Zebularine) 各種抗癌剤 (シスプラチン、カルボプラチン、5-FU、パクリタキセル、ドセタキセル) と併用し、抗腫瘍効果の検討と、VEGF, bFGF, などの血管新生因子の産生抑制をELISA, ウェスタンブロット法で解析する。HDAC阻害剤またはDNMT阻害剤存在下によ

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。

#### (2) マウス腫瘍モデル（異種腫瘍モデル）の確立

SCIDマウスに、抗癌剤に対する感受性が異なることが既に知られているヒト口腔扁平上皮癌細胞株（HSC-2、HSC-3、HSC-4、SAS細胞； $1 \times 10^6$  cells）をそれぞれ側腹部に皮下注射後、腫瘍が約1週間で  $100 \text{ mm}^3$  を異種のヒト担癌マウスとして使用する。

#### (3) マウス腫瘍転移モデル（異種腫瘍モデル）の確立

SCIDマウスに、上記ヒト口腔扁平上皮癌細胞株をそれぞれ尾静脈に注射し、肺もしくは肝臓に腫瘍が血行性遠隔転移するモデルを作製する。

#### (4) ヒト担癌マウスにおける背部皮下法による血管新生の検討

マウス腫瘍モデル（異種腫瘍モデル）で、ヒト口腔扁平上皮癌細胞株による血管新生を背部皮下法（dorsal air sac assay；DAS assay）にて検討する。

#### (5) 担癌マウスにおける抗癌剤治療効果

作成したヒト担癌マウスに、各種抗癌剤（シスプラチン、カルボプラチン、5FU、パクリタキセル、ドセタキセル）と、HDAC阻害剤またはDNMT阻害剤を併用して治療し、抗腫瘍効果と血管新生の程度をDAS assayで検討する

#### (6) 腫瘍転移モデルにおける血行性転移抑制効果

血行性転移が確立したモデルマウスに、各種抗癌剤とHDAC阻害剤またはDNMT阻害剤を併用し、治療し、転移抑制効果と奏効率を検討する。

#### (7) 血管新生因子、アポトーシス関連分子の同定

腫瘍増殖の抑制・転移の抑制など、治療効果がみられた腫瘍組織を採取し、腫瘍のアポトーシスの誘導、血管新生因子（VEGF、bFGF、MMPs、angiopoietin-2、Tie-2など）とアポトーシス関連タンパク（IAPファミリー、Bcl-2ファミリー、カスパーゼなど）と、その遺伝子発現について、免疫染色、real-time PCR、ウェスタンブロット法等を用いてどのような変化が表れているか解析する。

#### (8) 転写因子、遺伝子のアセチル化、脱メチル化の同定

アポトーシスの抑制や促進にかかわる転写因子（NF- $\kappa$ B、p53、IRF-1）の発現変化を、各転写因子が認識するオリゴヌクレオチドをコーティングしたプレートを用いたELISAキットにて測定する。腫瘍組織のDNAメチル化とヒストンタンパクのメチル化、アセチル化は、免疫沈降法を用いて解析する。

## 4. 研究成果

抗癌剤単独処理に比較して抗癌剤（CDDP, 5-FU）と SAHA や zebularine (ZEB) を併用することで、アポトーシスが増強した。血管新生因子に対する効果として、SAHA、ZEBともに VEGF-A、VEGF-C の産生を抑制した（図1）。この抑制メカニズムとして、ZEBによる HIF-1 $\alpha$  の分解が示唆された。VEGF-A を阻害

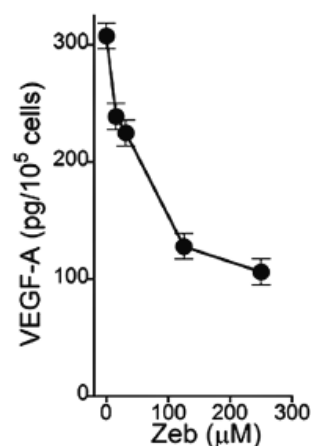


図1

するモノクローナル抗体 (Bevacizumab) と CDDP との併用によるアポトーシス増強作用は確認されなかった。このことから、ZEB, SAHA は VEGF を抑制し、かつアポトーシス増強作用をもつが、VEGF の抑制が直接、抗癌剤誘導性のアポトーシス増強に関与しているわけではないことが示唆された。

#### 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 6 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

③Suzuki M, Shinohara F and Rikiishi H. Zebularine-induced reduction in VEGF secretion by HIF-1 $\alpha$  degradation in oral squamous cell carcinoma. Mole. Med. Repo. (1) 465-471, 2008 査読有り

④ 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

⑤Suzuki 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

⑥Rikiishi 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 3 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 3<sup>rd</sup> International Symposium for interface Oral Health Science. 2009年3月15日

②鈴木麻衣子、篠原文明、遠藤学、力石秀実 エピジェネティクス制御剤を用いた癌血管新生の抑制。第 38 回免疫学会総会。2008 年 12 月 1 日

③鈴木麻衣子、篠原文明、西村謙太郎、力石秀実。Zebularineによる抗癌剤感受性のエピジェネティクス制御。第 37 回免疫学会総会。2007 年 11 月 22 日

[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：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

篠原 文明 (SHINOHARA FUMIAKI)

東北大学・病院・助教

研究者番号：80400258

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：