

平成 21 年 5 月 8 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2007～2008

課題番号：19890028

研究課題名（和文）エピジェネティック理論を導入した口腔癌の化学療法感受性の増強

研究課題名（英文）Augmentation of drug sensitivity in OSCC by epigenetical theory.

研究代表者

菅崎 将樹（SUGAZAKI MASAKI）

東北大学・病院・医員

研究者番号：50444013

研究成果の概要：以下の研究成果を得た。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。このことから、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。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,320,000	0	1,320,000
2008 年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,670,000	405,000	3,075,000

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：エピジェネティクス、口腔癌、DNMT 阻害剤

## 1. 研究開始当初の背景

口腔癌の主な治療法は手術療法と放射線療法である。化学療法は口腔癌の標準的な治療法ではないが、最近、放射線療法の向上や術後の転移の予防を期待してシスプラチンと 5-FU を併用した化学療法が行われている。し

かしながら、化学療法には、依然として薬剤耐性と副作用という重大な問題があり、その抗腫瘍効果には疑問点が多い。申請者は口腔外科臨床に従事し、口腔癌治療に併用する化学療法について再検討する必要性を実感している。申請者は臨床に従事しながら、この

問題を解決するべく 2007 年 4 月からエピジェネティクス制御剤を用いた新しい化学療法の基本研究に着手した。

癌は様々な要因により薬剤耐性になるが、その一つに癌のエピジェネティクス制御がある。エピジェネティクス(epigenetics)制御とは、クロマチンへの後天的な修飾により遺伝子発現を制御することであり、DNA のメチル化とヒストンのアセチル化がある。エピジェネティクス制御の重要な役割は、ゲノム上の多数の遺伝子を選択的に活性化または不活性化することである。エピジェネティクス制御の異常は、発生、再生、遺伝の異常、発癌などさまざまな病態を引き起こし、癌の血管新生や、抗癌剤耐性の要因であることも報告されている。薬剤耐性因子(例えば多様な発癌因子や抗癌剤そのもの)は、生体のエピジェネティクス制御を攪乱し、口腔癌の性質を巧みに変化させる。その結果、口腔癌患者の薬剤感受性は一様ではなくなり、予想外の薬剤耐性癌の出現や重篤な副作用の発症など、今後、従来の化学療法では対応できない口腔癌患者が増えることが危惧される。口腔癌のエピジェネティクス制御が薬剤耐性や副作用に重要な役割を演じていることは確実であるが、果たしてどのように関わっているのか、そのメカニズムは、現在のところ不明である。エピジェネティクス制御の攪乱による口腔癌の巧みな変化に対応していくためには、①口腔癌のエピジェネティクス制御を知り、②抗癌剤の効果にどう影響しているかを解析することが必須である。癌のエピジェネティクスを恣意的に制御できれば、従来の化学療法+ $\alpha$ としてエピジェネティクス制御化合物を利用し、最小限の副作用で最大の治療効果を期待することができ、予想外の薬剤耐性癌の出現にも対応できる可能性がある。エピジェネティクス制御化合物

として、DNA メチル化酵素 (DNA methyltransferase; DNMT) とヒストン脱アセチル化酵素 (histone deacetylase; HDAC) の特異的阻害剤がある。いずれも細胞に対する効果はまだ不明な点が多いものの、細胞周期の停止、細胞分化誘導、アポトーシス誘導などと密接な関係が報告されている。Trichostatin A などの HDAC 阻害薬は白血病など多くの細胞系で分化誘導活性を示すとともに Ras, Sis などの癌遺伝子で形質転換した細胞の形態を正常化するなどの生物活性をしめす。このため近年 HDAC 阻害剤や脱メチル化剤を癌治療薬として用いる可能性が浮上している。以上の背景から抗癌剤とエピジェネティクス制御化合物を併用することで、抗癌剤の効果を増強し、さらに副作用の軽減が期待できると確信し、本研究を着想するに至った。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、①口腔癌のエピジェネティクス制御メカニズムを解析・検討し、②従来の化学療法+ $\alpha$ としてエピジェネティクス制御化合物を口腔癌治療に応用し、③最小の副作用で最大の抗腫瘍効果が得られるエピジェネティクス制御型化学療法を確立することである。

## 3. 研究の方法

口腔癌細胞株を用いて抗癌剤とエピジェネティクス阻害剤との併用効果を検討し、併用の最適条件を決定しその分子生物学的解析をする。

【1】抗癌剤とHDAC阻害剤・DNMT阻害剤の併用効果の検討

1-1. 細胞毒性・アポトーシス誘導の確認  
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。

#### 1-2. 併用によるアポトーシス誘導の解析

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。

カスパーゼ活性の測定

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。

#### 1-3. 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. 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。本研究結果は、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1件)

Suzuki 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

[学会発表] (計1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

[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

菅崎 将樹 (SUGAZAKI MASAKI)

東北大学・病院・医員

研究者番号：50444013

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者