

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：32710

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K19251

研究課題名（和文）口腔癌に対するレプチンアンタゴニストペプチドの腫瘍抑制効果の検討

研究課題名（英文）Tumor Suppressive Effect of Leptin Antagonist Peptide on Oral Cancer

研究代表者

梅木 泰親（Umeki, Hirochika）

鶴見大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：10552408

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では口腔癌に対してレプチンアンタゴニストペプチドを治療薬として応用することができるか否かについて明らかにすることを目的として、まず、ヒト口腔癌症例におけるレプチン受容体の発現について検討した。口腔癌患者より生検もしくは外科的切除時に口腔癌組織の採取を行い、組織切片を作製し、免疫組織化学的にレプチン受容体の発現分布について、生検または切除術時に含まれる正常な部位の組織と比較した。癌近傍の上皮組織および周囲上皮異形成部におけるレプチン受容体陽性細胞数と比較して、正常組織ではレプチン受容体陽性細胞数が少ない傾向が認められ、上皮の異型性とレプチン受容体陽性細胞との関連が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では口腔癌に対してレプチンアンタゴニストペプチドを治療薬として応用することができるか否かについて明らかにすることを目的とした。世界的なコロナウイルス感染症拡大の影響により、当初予定していた検討を期限内で計画通りに実施することは困難であったが、限りある資源を有効に活用し、可能な限り検討を実施した結果、口腔癌に対するレプチンアンタゴニストペプチドの治療薬としての応用に向けて、基礎的なデータを得ることができた。超高齢社会を迎えたわが国における、より低侵襲で治療に伴う弊害の少ない新たな治療法の開発に向けて、有用な研究であった。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to clarify whether leptin antagonist peptides can be applied as a therapeutic agent for oral cancer. Tissue samples were obtained from patients with oral cancer at the time of biopsy or surgical resection. The distribution of leptin receptor expression was compared immunohistochemically with that of normal tissues. Compared to the number of leptin receptor-positive cells in the vicinity of the cancer and in the surrounding epithelial dysplasia, the number of leptin receptor-positive cells tended to be lower in the normal tissue. These results suggest an association between epithelial dysplasia and leptin receptor-positive cells.

研究分野：口腔外科学

キーワード：口腔癌 レプチン受容体 レプチンアンタゴニスト

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会を迎えたわが国では今後も悪性腫瘍罹患率の増加が予想され、口腔癌も同様に増加すると思われる。わが国における口腔癌の各ステージでの標準治療は外科的治療、放射線療法、化学療法であるが、これらの治療により引き起こされる機能障害や副作用は、患者の大きな負担となり、治療後のQOLの低下を招くことから、より低侵襲で、治療に伴う弊害の少ない新たな治療法の開発が必要である。最近、ホルモン療法やHER2に対する分子標的薬の効果が期待しにくいトリプルネガティブ乳癌ではレプチン受容体の発現が高いことが確認され、そのモデルマウスにおいてレプチン受容体のアンタゴニストペプチドを作用させたところ、従来の化学療法群に比べて平均生存期間が延長したとの報告があった。また、口腔癌の腫瘍細胞においてもレプチン受容体が正常組織と比較して有意に多く発現していることが報告された。

申請者らはこれまで正常口腔粘膜においてレプチン受容体が発現していることやレプチンの投与により口腔粘膜創傷治癒が促進されることを世界ではじめて報告してきた。これらの研究およびレプチンが血管新生促進作用を有すること、口腔癌の腫瘍細胞におけるレプチン受容体の発現が正常組織より多いことが報告されている事実などから、同ペプチドを口腔癌に応用することで、腫瘍細胞の増殖を抑制することが可能ではないのかという発想に至った。

2. 研究の目的

本研究では口腔癌に対してレプチンアンタゴニストペプチドを治療薬として応用することができるか否かについて明らかにすることを目的とした。まず、口腔癌組織におけるレプチン受容体の発現を確認する。さらに、*in vitro* において口腔癌細胞におけるレプチン受容体の発現を確認するために、数種類のヒト口腔扁平上皮癌細胞におけるレプチン受容体の発現について検討する。加えて、レプチンおよびレプチンアンタゴニストペプチドを作用させることで、ヒト口腔癌細胞の増殖、分化に影響を及ぼすか否かについて検討する。最後に、*in vivo* においてレプチンアンタゴニストペプチドがヒト口腔癌細胞の増殖抑制効果を有するかについて検討するために、マウス背部に口腔癌モデルを作製し、同ペプチドを全身投与することで、口腔癌治療薬として応用することができるかどうかについて検討する。

3. 研究の方法

(1) ヒト口腔癌症例におけるレプチン受容体の発現の検討

対象口腔癌患者より切除された組織を用いて、4%パラホルムアルデヒドにて固定後、パラフィン包埋し組織切片を作製する。作製した組織切片にH-E染色を行い、組織を観察するとともに、レプチン受容体についてその発現分布につき免疫組織化学的に検討する。また、生検または切除術時に含まれる正常な部位の組織をコントロールとしてレプチン受容体の発現の多少につき関して比較検討する。なお、対象患者は生検により口腔癌と診断され切除術を予定している患者のうち、組織提供について十分な説明を行い、十分な理解と自発的同意を得られた患者を対象として、パラフィン包埋した組織切片を試料とする(研究開始前に鶴見大学歯学部倫理審査委員会の承認を得る)。

(2) 各種ヒト口腔癌細胞におけるレプチン受容体の発現の検討

ヒト口腔癌細胞におけるレプチン受容体の発現につき確認することを目的に、ヒト舌癌細胞、ヒト歯肉癌細胞、ヒト口底癌細胞、ヒト口腔癌細胞、ヒト口腔扁平上皮癌細胞など各種細胞をRIKEN等より入手し、培養し、定量的PCR法、ウエスタンブロット法(レプチン受容体(Ob-Ra~Ob-Re)などの分子を指標とする)、免疫細胞化学染色法などを用いて、レプチン受容体の発現につき確認する。このとき、それぞれの癌細胞に対応する正常のヒト口腔粘膜細胞(RIKEN、Lonzaなどより入手予定)と比較検討する。また、同時にレプチンの発現を検討することにより、ヒト口腔癌細胞においてレプチンが産生されているかについても併せて検討する。

(3) ヒト口腔癌細胞に対するレプチンの影響に関する検討

レプチンの口腔癌細胞に対する影響を確かめることを目的に、前記2の検討においてレプチン受容体の有意な発現を認めたヒト口腔扁平上皮癌細胞を用いて、培養時にレプチンを添加し細胞に作用させる。レプチン添加群、非添加群にわけて、ヒト口腔扁平上皮癌細胞の増殖、分化についてクリスタルバイオレット法、定量的PCR法、ウエスタンブロット法(ケラチン4、ケラチン10、トランスグルタミナーゼなどの分子を指標とする)などを用いて検討する。また、同時にレプチン添加群におけるSTAT1、3のリン酸化について検討することによりレプチン経路であるのかについても併せて検討する。加えて正常口腔粘膜細胞を対象に同様の検討を行い、比較検討する。

(4) ヒト口腔癌細胞に対するレプチンアンタゴニストペプチドの影響に関する検討

レプチンアンタゴニストペプチドの口腔癌細胞に対する影響を確認することを目的に、上記3で用いたヒト口腔扁平上皮癌細胞の培養時にレプチンアンタゴニストペプチドを添加し細胞に作用させる。レプチンアンタゴニストペプチド添加群、非添加群にわけて、ヒト口腔扁平上皮癌細胞の増殖、分化についてクリスタルバイオレット法、定量的PCR法、ウエスタンブロット法(ケラチン4、ケラチン10、トランスグルタミナーゼなどの分子を指標とする)などを用いて検討する。加えて正常口腔粘膜細胞を対象に同様の検討を行い、比較検討する。

(5) *in vivo*における口腔癌に対するレプチンアンタゴニストペプチドの増殖抑制効果の検討

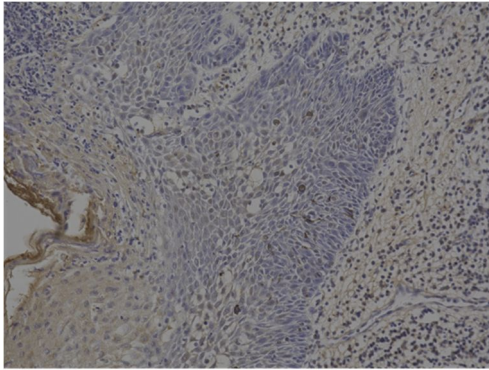
上記3、4において用いたヒト口腔扁平上皮癌細胞をヌードあるいはSCIDマウスの背部皮膚に移植し、口腔癌モデルを作成する。腫瘍形成あるいは硬結などの発現を確認したところで、この口腔癌モデルマウスに対し、レプチンアンタゴニストペプチド、PBSあるいは抗癌剤として知られるシスプラチンを腹腔内注射あるいは皮下注射にて全身投与し、モデルマウスの腫瘍径の経時的変化、生存日数をペプチド投与群、非投与群(PBS投与群)、シスプラチン投与群の3群で比較検討することで、このレプチンアンタゴニストペプチドによる口腔癌細胞の増殖抑制効果、すなわち口腔癌の治療薬として応用可能か否かについて検討する。

また、口腔癌の再発や後発転移の抑制を視野に、レプチンアンタゴニストペプチドが口腔癌細胞の増殖を予防的に抑制可能か否かについて確かめることを目的に、上記口腔癌モデルマウスを作成時にヒト口腔扁平上皮癌細胞を移植すると同時にレプチンアンタゴニストペプチドを腹腔内注射あるいは皮下注射にて全身投与し、上記と同様の検討を行う。このときのペプチドの濃度は乳癌の検討で有意差を認めた0.1~1mg/kg/dayあるいはその前後の濃度を数種設定して投与し、より効果のある濃度の検討も行う。また、シスプラチンは1mg/kg/dayを投与する。

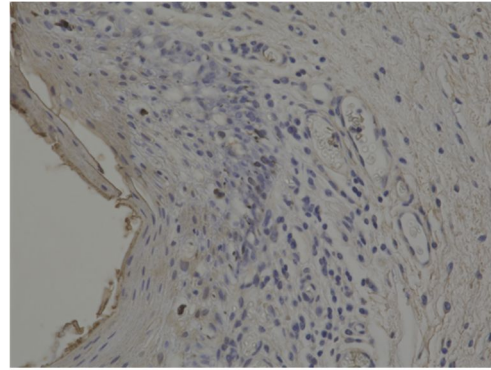
4. 研究成果

まず、ヒト口腔癌症例におけるレプチン受容体の発現を検討した。鶴見大学歯学部附属病院を受診し治療の対象となった口腔癌患者より生検もしくは外科的切除時に口腔癌組織の採取を行

い、採取された組織を用いて、組織切片を作製した。H-E染色を行い、組織を観察するとともにレプチン受容体についてその発現分布につき免疫組織化学的に検討を行った。また、生検または切除術時に含まれる正常な部位の組織をコントロールとしてレプチン受容体の発現の多少につき比較検討を行った。口腔癌切除組織検体の免疫組織染色においては、癌近傍の上皮組織および周囲異形成部におけるレプチン受容体陽性細胞数と比較して、正常組織ではレプチン受容体陽性細胞数が少ない傾向が認められ、上皮の異型性とレプチン受容体陽性細胞との関連が示唆された。



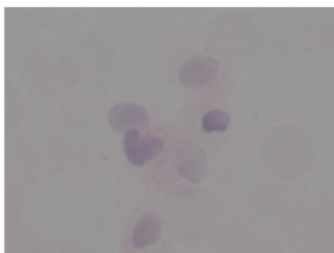
舌癌切除検体の癌近傍組織



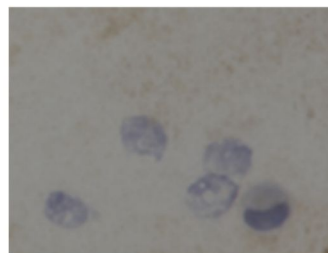
舌癌切除検体の周囲組織

一方、検討途中で新型コロナウイルス感染症拡大防止のため緊急事態宣言が発出されたことにより、受診患者の減少および不要不急の手術が自粛されていた期間があった影響で、必要数の検体が確保できなかった。

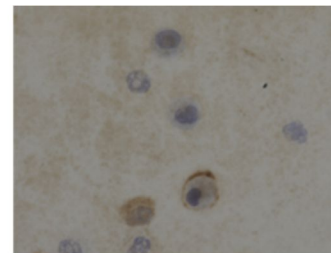
ヒト口腔癌細胞におけるレプチン受容体の発現に関する検討については、新型コロナウイルス感染症拡大の影響により世界的に実験用プラスチック製品や試薬のサプライチェーンが影響を受け、必要な実験用品や試薬が入手できず、期限内での予定していた検討の実施は困難であった。一部実施できた検討において、ヒト口腔癌細胞においてレプチン受容体陽性と思われる細胞が認められたものの数が少なく、染色も安定した結果とならなかったため、確認できず統計的な検討を行うことが困難であった。検討に用いる細胞数や染色条件の検討を行うことで安定した結果が得られると考えられる。



ヒト口腔扁平上皮癌細胞
(H-E染色)



ヒト口腔扁平上皮癌細胞
(免疫染色)



ヒト口腔扁平上皮癌細胞
(免疫染色)

レプチンの口腔癌細胞に対する影響を確かめることを目的に実施予定であった、レプチン受容体の有意な発現を認めたヒト口腔扁平上皮癌細胞を用いて、培養時にレプチンを添加し細胞に作用させる検討についても同様に新型コロナウイルス感染症拡大の世界的な影響により予定して検討の期限内での実施は困難であった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------