

機関番号：16401

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390480

研究課題名 (和文) 口腔癌に対する低酸素標的療法を組み入れた化学・放射線療法の基礎的・臨床的検討

研究課題名 (英文) Effects of hypoxia-targeted therapies combined with chemo-radiotherapy in oral squamous cell carcinoma cells

研究代表者

山本 哲也 (YAMAMOTO TETSUYA)

高知大学・教育研究部医療学系・教授

研究者番号：00200824

研究成果の概要 (和文)：口腔扁平上皮癌 (OSC) に対する抗癌剤の作用に及ぼすNO供与体の併用効果を検討した。OSC細胞に対する5-FUの増殖抑制効果は、正常酸素および低酸素分圧下いずれの条件においてもNO供与体であるNOC-18の併用により増強された。マウス背部皮下に形成された腫瘍の増殖は、5-FUあるいはニトログリセリン (NTG) 単剤投与でも有意に抑制されたが、両者を併用することにより最も強く抑制され、その際、腫瘍組織におけるHIF-1 α およびHIF-1 α 標的遺伝子産物 (VEGF、GLUT-1) の発現が有意に低下した。さらに、口腔扁平上皮癌症例において、化学・放射線療法と並行してNTGを投与した群では非投与群に比べ化学・放射線療法の臨床効果が増強される傾向が認められた。以上より、NO供与体と抗癌剤との併用はOSCの治療上検討すべき方法であることが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：We investigated the effect of the nitric oxide (NO) donor on the antitumor activity of chemotherapeutic drugs to oral squamous cell carcinoma (OSC) cells. The antitumor effect of 5-FU to OSC cells was enhanced by the combination with NO donor, NOC-18 under both normoxic and hypoxic conditions. The growth rates of tumor xenografts implanted into the subcutaneous tissues of back of the nude mice were moderately attenuated by the treatment with 5-FU or nitroglycerin (NTG) alone and the rates were strongly reduced by the combination of 5-FU and NTG. The expression levels of HIF-1 α protein and its target gene products (VEGF and GLUT-1) were significantly decreased by the combination with 5-FU and NTG. Furthermore, clinical effects of chemoradiotherapy in patients with OSC were enhanced by the combination with NTG. These results suggest that the combination with NO donor and chemotherapeutic drugs is considerable in the treatment of OSC.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2009年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2010年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
総計	1,4900,000	4,470,000	19,370,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：低酸素、口腔癌、一酸化窒素

1. 研究開始当初の背景

固形癌はその異常な増殖のために血液・酸素供給が不十分となり、腫瘍内には低酸素領域が生じるが、癌細胞はこの低酸素環境に適応して生き延びる能力を有するだけではなく、その低酸素ストレスにより悪性度が高まり、抗癌剤や放射線に対し抵抗性となることが知られている。近年、低酸素を標的とした治療戦略として、低酸素応答のマスター遺伝子である低酸素誘導因子 (HIF-1 α) を標的とした遺伝子治療や HIF-1 α シグナル伝達阻害剤などが考案されているが、導入効率や細胞毒性などの点から実用化するには解決すべき点が多く有り、また、一部臨床応用されているものでも期待した程の効果が得られていないのが実情である。

ところで、一酸化窒素 (NO) は種々の生物活性を有するフリーラジカルであるが、その供与体は、1) 低酸素環境にある腫瘍細胞のミトコンドリアのチトクロームCオキシダーゼに結合することにより、ミトコンドリア呼吸鎖複合体を阻害し、細胞内酸素消費を減少させ、細胞内酸素濃度を高める、2) Prolyl-hydroxylase 活性を増強することにより、HIF-1 α と pVHL との結合を促進し、HIF-1 α のユビキチン化・分解を促進する、3) 腫瘍局所の循環を増加させ、腫瘍内酸素分圧を上昇させる作用を有することなどが報告されている。これらの作用は、NO 供与体が低酸素標的薬となり得る可能性を示唆しており、抗癌剤・放射線と併用することによりそれらの治療効果を増強させることができるのではないかとと思われる。

2. 研究の目的

口腔扁平上皮癌において抗癌剤と NO 供与体とを併用することにより抗癌剤の抗腫瘍効果が増強されるか否かを検証する。

3. 研究の方法

1) 正常酸素分圧 (20%O₂) および低酸素分圧 (1%O₂) 下で培養した口腔扁平上皮癌 (OSC) 細胞株を NO 供与体 (NOC-18) で処理し、HIF-1 α およびその標的遺伝子産物 (VEGF、GLUT-1) の発現、細胞増殖、アポトーシス誘導に及ぼす影響を検討した。

2) BALB/c マウスの背部皮下に OSC-4 細胞を移植して腫瘍を形成させた後、皮下に埋め込んだアルゼット浸透圧ポンプを用いてニトログリセリン (NTG) を持続投与するとともに 5-FU を腹腔内投与し、経時的に腫瘍径を計測し、その後、腫瘍組織における HIF-1 α および HIF-1 α 標的遺伝子産物の発現を免疫組織化学的に検討した。

3) 口腔扁平上皮癌症例において、化学・放射線療法と併用して NTG を投与し、臨床病理組織学的効果を非投与群と比較検討した。

4. 研究成果

1) 口腔扁平上皮癌細胞株における 5-FU と NOC-18 との併用効果

a) 5-FU の細胞増殖抑制効果に及ぼす低酸素の影響

5-FU は濃度依存的に OSC-2、-4、-5、および-6 の細胞増殖を抑制したが、これらの4細胞株のうち、OSC-2、-4、および-6 における 5-FU の抗腫瘍効果は、定常酸素分圧と比較して低酸素分圧下で培養することにより著明に減弱した (図 1)。

b) NOC-18 の HIF-1 α 発現に及ぼす影響

NOC-18 は全ての細胞株において、定常酸素分圧および低酸素分圧いずれの条件下でも HIF-1 α の発現を強力に抑制した (図 2A)。さらに、NOC-18 処理によりその標的遺伝子産物である VEGF および GLUT-1 の mRNA レベルは低下した (図 2B)。

c) OSC 細胞の細胞増殖に及ぼす 5-FU と NOC-18 の併用効果

定常酸素分圧および低酸素分圧いずれの条件下においても、5-FU による OSC 細胞の増殖抑制作用は NOC-18 の添加により増強された (図 3)。

d) 5-FU による OSC 細胞のアポトーシス誘導に及ぼす NOC-18 の併用効果

定常酸素分圧および低酸素分圧いずれの条件下においても、5-FU は OSC 細胞にアポトーシスを誘導したが、NOC-18 を添加しても 5-FU によるアポトーシス誘導の増強は認められなかった (図 4)。

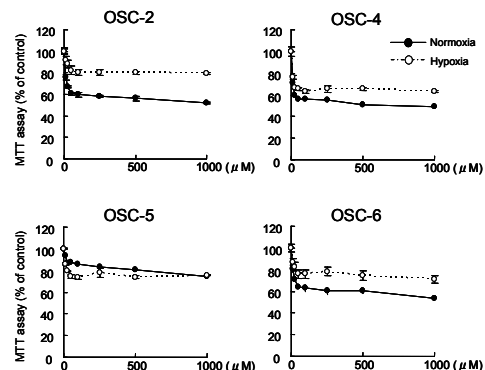


図 1: OSC 細胞の 5-FU に対する感受性に及ぼす低酸素の影響

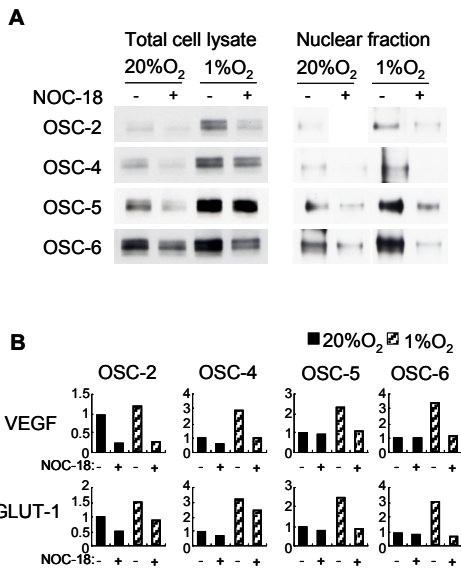


図 2 : OSC 細胞株の HIF-1 α およびその標的遺伝子産物の発現に及ぼす NOC-18 の影響

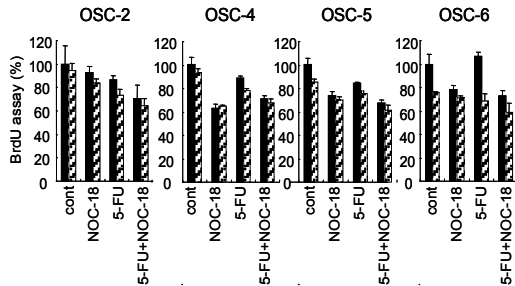


図 3 : OSC 細胞の増殖に及ぼす 5-FU と NOC-18 の併用効果

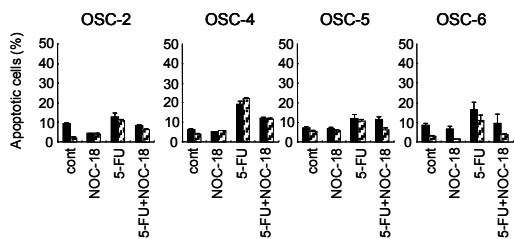


図 4 : 5-FU による OSC 細胞のアポトーシス誘導に及ぼす NOC-18 の併用効果

2) BALB/C ノードマウス背部皮下への移植腫瘍における 5-FU と NTG との併用効果

a) 腫瘍増殖に及ぼす 5-FU と NTG との併用効果

5-FU あるいは NTG 単独投与群いずれにおいても腫瘍の増殖は抑制されたが、5-FU と NTG との併用処理を行った群で最も強い増殖抑制効果が認められた (図 5)。

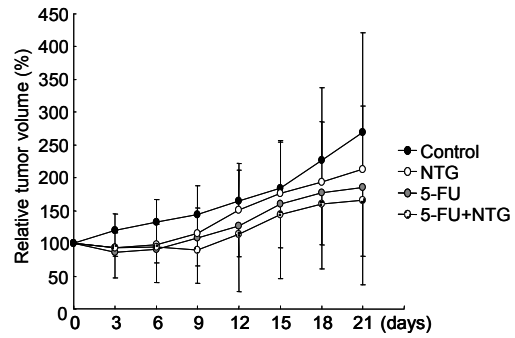


図 5 : 移植腫瘍の増殖に及ぼす 5-FU と NTG の併用効果

b) 移植腫瘍に及ぼす 5-FU と NTG の病理組織的併用効果

コントロールの腫瘍は一部癌真珠を伴いながら胞巣状に増殖しているが、5-FU 単独ないしは 5-FU と NTG との併用処理を行った腫瘍では中心部は広範囲に壊死に陥っていた (図 6)。

図 6 : 5-FU と NTG との病理組織的併用効果

c) 腫瘍組織における HIF-1 α およびその標的遺伝子産物の発現

腫瘍組織における HIF-1 α の発現は、コントロールの腫瘍では、胞巣を形成する腫瘍の細胞質に比較的強く認められたが、NTG 単独処理、また、5-FU 処理の腫瘍においてはほとんど認められなかった。さらに、両者併用群では壊死した細胞に HIF-1 α の発現が認められたが、胞巣を形成する腫瘍細胞には認められなかった (図 7A)。HIF-1 α の標的遺伝子である VEGF および GLUT-1 の染色パターンは HIF-1 α の発現パターンと同様の傾向を示していた (図 7B, 7C)。

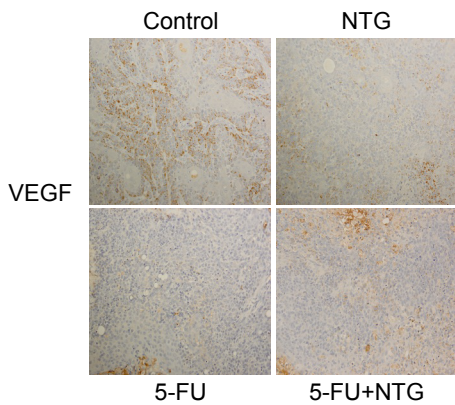


図 7:移植腫瘍における HIF-1 α およびその標的遺伝子産物の発現

d) 移植腫瘍における HIF-1 α およびその標的遺伝子産物の mRNA 発現

移植腫瘍における HIF-1 α およびその標的遺伝子である VEGF および GLUT-1 の mRNA レベルを検討したところ、NTG 単独および 5-FU 単独で処理した腫瘍における HIF-1 α および VEGF、GLUT-1 の mRNA レベルはコントロールと比較して低下していたが、5-FU および NTG の両者で処理しても併用効果は認められなかった(図8)

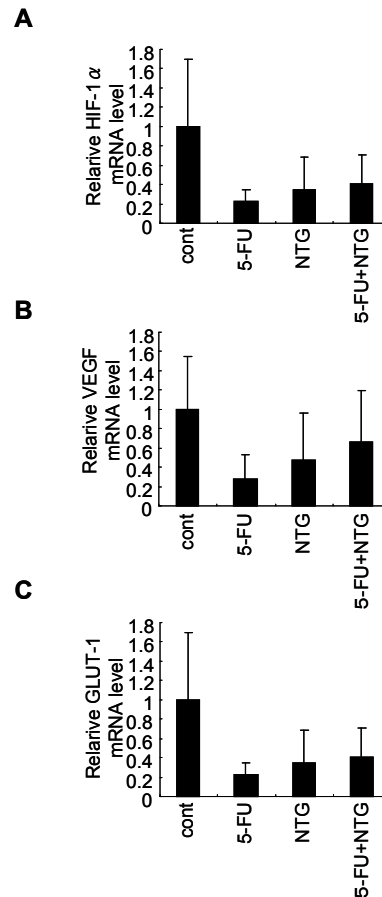


図 8:移植腫瘍における HIF-1 α およびその標的遺伝子産物の mRNA の発現

3) 口腔扁平上皮癌症例における化学・放射線療法と NTG との併用効果

口腔扁平上皮癌症例において、化学・放射線療法と併用して NTG を投与し、臨床的效果を非投与群と比較検討したところ、投与群では非投与群に比べ化学・放射線療法の臨床的效果がやや優れる傾向が認められた(表1)。

Clinical effect	CR	PR	SD
NTG 投与群	4 (44.4%)	4 (44.4%)	1 (11.2%)
NTG 非投与群	20 (35.1%)	36 (63.1%)	1 (1.8%)

表 1 : 口腔扁平上皮癌症例における NTG と併用した化学・放射線療法の臨床的效果

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)

Sasabe E, Yang Z, Ohno S, Yamamoto T.
Reactive oxygen species produced by the
knockdown of manganese-superoxide
dismutase up-regulate hypoxia-inducible
factor-1 α expression in oral squamous
cell carcinoma cells. Free Radic Biol Med
査読有 2010 48(10):1321-9.

〔学会発表〕(計1件)

笹部衣里、大野清二、北村直也、山田朋弘、
山本哲也 口腔扁平上皮癌に対する抗癌剤
と一酸化窒素併用療法に関する基礎的検討
第64回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会平
成22年6月24日、札幌市

〔その他〕

ホームページ等

http://www.kochi-ms.ac.jp/~fm_dntst/index.htm

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 哲也 (YAMAMOTO TETSUYA)
高知大学・教育研究部医療学系・教授
研究者番号：00200824

(2) 研究分担者

笹部 衣里 (SASABE ERI)
高知大学・教育研究部医療学系・助教
研究者番号：40363288

佐竹 秀太 (SATAKE HIDETAKA)
高知大学・教育研究部医療学系・助教
研究者番号：10304685

植田 栄作 (UEDA EISAKU)
高知大学・教育研究部医療学系・講師
研究者番号：10203431
(平成20年度のみ)

立石 善久 (TATEISHI YOSHIHISA)
高知大学・教育研究部医療学系・助教
研究者番号：20372732
(平成20年度のみ)