

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24年 5月 29日現在

機関番号：3 0 1 1 0

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2 0 0 9～2 0 1 1

課題番号：2 1 5 9 2 3 9 7

研究課題名（和文）

口腔癌に対する特異的かつ至適な血管新生阻害療法の確立

研究課題名（英文）

Establishment of optimal anti-angiogenic therapy against cancer of oral cavity

研究代表者

小林 正伸 (KOBAYASHI MASANOBU)

北海道医療大学・看護福祉学部・教授

研究者番号 8 0 2 4 1 3 2 1

研究成果の概要（和文）：

低酸素環境下で発現亢進してくる遺伝子を網羅的に探索し、低酸素環境下での口腔癌細胞の生存と増殖を可能にしている遺伝子としてアドレノメジュリン遺伝子とがん遺伝子pim-1の発現を同定とした。マウスモデルでの腫瘍増殖とアドレノメジュリンによって刺激される血管新生が、アドレノメジュリン阻害ペプチドによって抑制された。

研究成果の概要（英文）：

By the method of DNA microarray system, which can detect the genes expressed under under hypoxia, we identified the genes of adrenomedullin and pim-1. Tumor growth of cancer cells of oral cavity in a mouse model system and the angiogenesis stimulated by adrenomedullin was inhibited by adrenomedullin-antagonist.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
21年度	1,900,000	570,000	2,470,000
22年度	900,000	270,000	1,170,000
23年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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、血管新生、血管新生阻害剤、腫瘍増殖

1. 研究開始当初の背景

1990年代初期までには、解糖系酵素、血管新生、造血、浸潤能などに関与する多くの遺伝子産物が低酸素によって発現誘導されることが報告され (Semenza et al., J Biol. Chem., 1994) 転写誘導因子 (Hypoxia inducible factor-1, HIF-1) が1995年に同定された (Wang and Semenza, J Biol. Chem., 1995)。その後、多くの癌細胞がHIF-1を過剰発現していることが次々と報告され (Akakura et al., Cancer Res., 2001; Semenza, Biochem. Pharmacol., 2002)、HIF-1発現がヒト癌細胞の生体内増殖に必須であることが示された (Carmeliot et al., Nature, 1998)。その後、HIF-1を標的とする治療法の開発 (低分子化合物、遺伝子治療)、HIF-1の標的

遺伝子を阻害する治療法などが開発されてきた。しかし、VEGF阻害剤のbevacizumab (Avastin) の臨床的有用性がかろうじて認められたのみで、画期的な治療法として確立されたものはいまだない。しかも、有効性が示されたbevacizumabでさえ、なぜ血管新生阻害療法と抗癌剤の併用が効果的であるのか明確ではない (Ruegg et al., Bulletin du Cancer, 2007)。また血管新生阻害療法に対する抵抗性がどのように獲得されてくるのかも新しい課題として浮上してきている。申請者は、癌細胞が低グルコース環境下で発現亢進してくる遺伝子群の探索、癌細胞が低酸素・低グルコース環境下で発現亢進してくる遺伝子の探索を行った結果、両群ともに数十個の遺伝子が亢進することを明らかにし、その一部の遺伝子がア

ポトーシス抵抗性に関与することを明らかにしている (Exp Cell Res., 2007; Cancer Res., 2007)。これらの結果は、低酸素環境以外にも低グルコース環境という重要な環境因子があり、これらを同時に解析していくことの重要性を示唆していた。

## 2. 研究の目的

本研究では、血管内皮細胞の低酸素・低グルコース環境に対する適応応答機構の存在を確認し、癌に対する最適な抗血管療法を開発するためのバイオマーカー、探索システムを確立することを目的とした。

基礎的研究にてまず皮膚由来正常血管内皮細胞株や口腔癌移植ヌードマウスからの腫瘍組織由来血管内皮細胞株を樹立した。ついで、これらの血管内皮細胞株と癌細胞株の低酸素下、低グルコース下、低酸素+低グルコース下での増殖アポトーシスを正常酸素分圧下+正常グルコース濃度下と比較した。その結果、癌細胞株では低グルコース濃度下では正常グルコース濃度下に比較して細胞増殖が抑制され、アポトーシス細胞は逆に増加していた。一方血管内皮細胞株 (皮膚由来正常血管内皮細胞株や口腔癌移植ヌードマウスからの腫瘍組織由来血管内皮細胞株) では低グルコース濃度下でも増殖の抑制はなく、アポトーシス細胞も増加していなかった。これらの基礎的実験結果は、癌細胞に比較して血管内皮細胞のほうが低グルコースというストレスによる増殖抑制やアポトーシス誘導に対してより抵抗性であることを示している。

そこで本研究では、以下の点を明らかにする。

1) 血管内皮細胞がどのような機構で低グルコース誘導増殖抑制に耐性なのか、アポトーシス誘導に耐性なのかを明らかにする。

2) 血管内皮細胞株と癌細胞株が低グルコース環境下で抗癌剤や血管新生阻害剤に対して感受性があるのかどうかを明確にする。

3) 正常血管内皮細胞株と各種癌組織由来血管内皮細胞株にて低グルコースや抗癌剤、血管新生阻害剤に対する感受性に差があるのか否かを明らかにする。

4) 低グルコース下での抗癌剤や抗血管薬の血管内皮細胞に対する効果が生体内での抗癌剤や血管新生阻害剤の血管新生に対する効果とより相関することを確認する。

5) 上記の血管新生阻害の効果判定システムを用いて各種血管新生阻害剤候補薬の効果を測定する。

## 3. 研究の方法

(1) 血管内皮細胞株の樹立と特徴の解析  
ヌードマウスにヒト癌細胞株を移植し、一定の大きさに増殖したら摘出する。  
コラゲナーゼにてsingle cell suspensionにして、ヒト癌細胞をジフテリアトキシンにて選択的に殺して排除する。  
その後immunobeadsを用いてレクチンや抗CD31抗体にて血管内皮細胞のみを選択する。  
選択操作を2回以上行った後、抗CD31抗体にて純度を確認する。  
すでに口腔癌由来血管内皮細胞株を1系樹立

している。

- (2) 癌細胞株5株、正常細胞株2株、血管内皮細胞株3株の各種条件下での増殖の検討  
正常酸素分圧 (21%) + 正常グルコース濃度 (100mg/dl)  
正常酸素分圧 (21%) + 低グルコース濃度 (13mg/dl)  
低酸素分圧 (1%) + 正常グルコース濃度 (100mg/dl)  
低酸素分圧 (1%) + 低グルコース濃度 (13mg/dl)

上記の各条件下で48-72時間培養し、MTS assayにて細胞増殖能を検討する。

- (3) 癌細胞株、正常細胞株、血管内皮細胞株の各種条件下でのアポトーシスの検討  
上記の条件下でのアポトーシスをFACS two color analysisとDNA ladder assayにて検討する。

- (4) 癌細胞株、正常細胞株、血管内皮細胞株の各種条件下でのDNAマイクロアレイ解析  
基礎的検討にて癌細胞株における各種条件下でのmRNA発現の比較は、DNAマイクロアレイにて網羅的に検討しており (例えば低グルコース下では69種類の遺伝子が正常グルコース濃度下に比較して2倍以上に発現亢進することを見出している)、血管内皮細胞株においても各種条件下でのmRNA発現をDNAマイクロアレイにて検討する。

- (5) 癌細胞株、正常細胞株、血管内皮細胞株の各種条件下での増殖因子産生の検討  
低酸素環境下においてはHIF-1が活性化して様々の増殖因子の転写が活性化して血管新生などが進行することが良く知られている。

低グルコース環境下で血管内皮細胞が癌細胞に比較してアポトーシスしにくい理由の一つとして増殖因子が血管内皮細胞特異的に産生されている可能性を考えた。

増殖因子 (VEGF, FGF, EGF, adrenomedullin) のmRNA発現をreal-time PCRにて比較する。

差を認めたものに関しては、蛋白発現、分泌を比較する。また、レセプター発現をreal-time PCRにて比較する。

- (6) DNA microarrayにて同定された遺伝子の機能解析

- (7) 各種条件下での血管内皮細胞株の血管新生阻害剤に対する感受性の検討

正常酸素分圧 (21%) + 正常グルコース濃度 (100mg/dl)  
正常酸素分圧 (21%) + 低グルコース濃度 (13mg/dl)  
低酸素分圧 (1%) + 正常グルコース濃度 (100mg/dl)  
低酸素分圧 (1%) + 低グルコース濃度 (13mg/dl)

以下同じ条件で行なう

- (8) 各種条件下での抗癌剤+血管新生阻害剤の併用効果の検討

- (9) 低グルコース条件下で血管新生阻害剤も

しくは抗癌剤＋血管新生阻害剤に対して感受性をあげる薬剤の探索

#### 4. 研究成果

1) 低酸素環境下で発現亢進してくる遺伝子を網羅的に探索し、低酸素環境下での口腔癌細胞の生存と増殖を可能にしている遺伝子の同定を試みた。

DNA microarray法にて、1%酸素濃度の低酸素環境下で培養した口腔癌細胞からRNAを抽出して、正常酸素分圧化で培養した細胞のRNAと比較した。

その結果、pim-1と呼ばれるセリンスレオニンカイネーゼの発現が、低酸素下で亢進していた。pim-1は白血病細胞において発現亢進していることが報告されていたが、固形癌での報告はなかったため、まずRNAレベルでの発現、蛋白レベルでの発現をいくつかの癌細胞株を用いて検討した。

正常酸素分圧下でのpim-1の発現は、RNAレベルでも蛋白レベルでも認められなかったが、低酸素分圧下ではほとんどの癌細胞が発現していた。

低酸素環境下でのpim-1の発現の意義を検討するために、pim-1の強制発現株の樹立とsiRNAによる発現抑制を試みた。その結果、pim-1の強制発現株では低酸素・低グルコース下で誘導されるアポトーシスが抑制されること、抗癌剤で誘導されるアポトーシスが抑制されることから、pim-1の発現がアポトーシス抑制に働いている可能性が示唆された。

siRNAによってpim-1発現を抑制すると、低酸素・低グルコース下で誘導されるアポトーシスや抗癌剤によるアポトーシスに対する感受性が亢進した。以上の結果より、低酸素環境下ではpim-1セリンスレオニンカイネーゼが誘導されてアポトーシスに大勢となることが示唆された。

現在、pim-1の下流にて働く遺伝子を探索している。

これらの結果から、癌細胞に特異的に発現するpim-1発現を抑制できれば、抗癌剤や血管新生阻害剤の効果を増幅できる可能性が示された。

2) 低酸素環境下で発現亢進してくる遺伝子を網羅的に探索し、低酸素環境下での口腔癌細胞の生存と増殖を可能にしている遺伝子の同定を試みた。

DNA microarray法にて、1%酸素濃度の低酸素環境下で培養した口腔癌細胞からRNAを抽出して、正常酸素分圧化で培養した細胞のRNAと比較した。

その結果、アドレノメジュリン遺伝子の発現が亢進していた。アドレノメジュリンは52個のアミノ酸からなるペプチドで、血管内皮細胞の増殖を刺激することが既に報告されている分子であった。アドレノメジュリン阻害ペプチドがアドレノメジュリンの血管内皮細胞増加効果を抑制すること、血管内皮細胞増殖抑制を介して腫瘍細胞の生体内増殖を抑制することを見いだしてい

たので、口腔がん細胞の生体内増殖に対する効果を検討した。

まず、アドレノメジュリン阻害ペプチド発現ベクターを構築して口腔がん細胞に導入したところ、アドレノメジュリン阻害ペプチド発現ベクター導入口腔がん細胞の生体内増殖は抑制された。

この抑制効果のメカニズムを確認するために、口腔がん細胞移植マウスから腫瘍組織特異的血管内皮細胞株を樹立した。腫瘍組織特異的血管内皮細胞株はアドレノメジュリンの存在下で増殖が刺激され、アドレノメジュリン阻害ペプチドによって抑制された。さらに、腫瘍組織特異的血管内皮細胞株の遊走が刺激され、アドレノメジュリン阻害ペプチドによって遊走が阻害された。これらの結果は、アドレノメジュリンが低酸素環境下で産生されて血管内皮細胞の遊走と増殖が刺激され、血管新生がおこることを示唆し、アドレノメジュリンによって刺激される血管生が、アドレノメジュリン阻害ペプチドによって抑制されることを示唆する。

#### 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)

1. Kobayashi T, Ishida J, Musashi M, Ota S, Yoshida T, Shimizu Y, Chuma M, Kawakami Asaka M, Tanaka J, Imamura M, Kobayashi M, H, Itoh H, Edamatsu H, Sutherland LC, Brachmann RK. P53 transactivation is involved in the antiproliferative activity of the putative tumor suppressor RBM5. *Int J Cancer* 128:304-318, 2011.

査読あり

2. Tsuchiya K, Hida K, Hida Y, Muraki C, Ohga N, Akino T, Kondo T, Miseki T, Nakagawa K, Shindoh M, Harabayashi T, Shinohara N, Nonomura K, Kobayashi M. Adrenomedullin antagonist suppresses inhibitory effects on tumor endothelial cells and endothelial progenitor mobilization. *Int J Oncol.* 2010 36:1379-86.

査読あり

3. Chen J, Kobayashi M, Darmanin S, Qiao Y, Gully C, Zhao R, Yeung SC, Lee MH. Pim-1 plays a pivotal role in hypoxia-induced chemoresistance. *Oncogene*, 2009 28:2581-92.

4. Chen J, Kobayashi M, Darmanin S, Qiao Y, Gully C, Zhao R, Kondo S, Wang H, Wang H, S-C Yeung S-C and Lee M-H. Hypoxia-Mediated Up-Regulation of Pim-1 Contributes to Solid Tumor Formation. *Am J Pathol.*, 2009 175:400-11.

査読あり

5. Onuma K, Sato Y, Ogawara S, Shirasawa N, Kobayashi M, Yoshitake J, Yoshimura T, Iigo M, Fujii J and Okada F. Nano-Scaled Particles of Titanium Dioxide Convert Benign Mouse Fibrosarcoma Cells into

Aggressive Tumor Cells.  
Am J Pathol.. 2009;175:2171-2183.  
査読あり

〔学会発表〕（計0件）

〔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：

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

小林 正伸 (KOBAYASHI MASANOBU)  
北海道医療大学・看護福祉学部・教授  
研究者番号：80241321

### (2) 研究分担者

永易 裕樹 (NAGAYASU HIROKI)  
北海道医療大学・歯学部・教授  
研究者番号：90265075

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

