

## 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3月31日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592557

研究課題名（和文） 癌遺伝子AKT1を分子標的とした新規口腔癌治療

研究課題名（英文） Targeting oncogene AKT1 for novel oral cancer therapy

研究代表者

中城 公一（NAKASHIRO KOICHI）

愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：90314880

研究成果の概要（和文）：癌遺伝子 Akt1 に対する合成 small interfering RNA (siAkt1) は、アテロコラーゲンと混合し生体内へ投与することにより、選択的にヒト口腔扁平上皮癌移植腫瘍組織に送達されることが明らかとなった。また、siAkt1 の治療効果を予測する方法として血清オステオポンチン値および *in vitro* 感受性試験の有用性を示した。以上の結果より、ヒト口腔扁平上皮癌細胞では Akt1 が癌遺伝子として重要な機能を担っており、Akt1 が新しい治療標的になる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Synthetic small interfering RNA targeting oncogene Akt1 (siAkt1) was specifically delivered human oral squamous cell carcinoma (OSCC) xenografted tumors by atelocollagen-mediated systemic administration. Furthermore, we showed the usefulness of serum osteopontin and *in vitro* sensitivity test to predict the clinical effect of siAkt1. These results suggest that Akt1 functions as a critical oncogene in human OSCC cells and targeting Akt1 appears a novel approach for treatment with oral cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011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：口腔外科学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：口腔癌、AKT1、RNA干渉

## 1. 研究開始当初の背景

当科における口腔癌の進行病期別疾患特異的3年生存率は Stage I 100%, Stage II 100%, Stage III 77%, Stage IV 73% (2001-2007年) である。口腔癌においてリンパ節転移は重要な予後因子で、その正確な診断は治療を行う上で極めて重要である。われわれは2001年よりリンパ節転移診断にセンチネルリン

パ節生検を用いているため、より正確に頸部リンパ節転移の有無を診断することができる。すなわち、診断精度の高い検査方法により正確な進行病期の把握が可能となり、より適切な治療が行えるのである。そのため、早期癌 (Stage I, II) の治療成績は十分満足できるレベルに達している。一方、進行癌 (Stage III, IV) の治療成績は75%前後であり、

これを向上させるためには新規治療法の開発が必須である。

口腔癌の増殖、浸潤、転移において重要な機能を担っている癌遺伝子すなわち口腔癌のアキレス腱となる遺伝子を同定し、分子標的とすることにより治療あるいは癌との共存が期待できる。そこで、われわれはマイクロアレイを用いてヒト口腔扁平上皮癌組織 10 検体およびヒト口腔扁平上皮癌細胞 10 株全てに共通して発現亢進の認められる癌遺伝子として Akt1 を同定した。さらに、低濃度で十分に Akt1 の発現を抑制できる合成 small interfering RNA (siAkt1) を見出し、ヒト口腔扁平上皮癌細胞、唾液腺癌細胞、前立腺癌細胞に対する siAkt1 の抗腫瘍活性を明らかにした。さらに、合成 siRNA の生体内への投与方法についてはリポソームや高分子ミセルを用いたデリバリーシステムの開発が進んでいるが、われわれはアテロコラーゲンを用いて siAkt1 の腫瘍周囲および静脈内投与による抗腫瘍活性をヒト口腔癌細胞ヌードマウス背部皮下移植腫瘍モデルを用いて確認した。

## 2. 研究の目的

本研究では、これまでの研究成果をさらに発展させることにより、Akt1 を分子標的とした新規口腔癌治療の確立および siAkt1/アテロコラーゲン製剤の医薬品化を目指した。

(1) 口腔癌組織より腫瘍細胞を分離し、*in vitro* の系にて siAkt1 を導入し、その増殖阻害効果を検証できる方法を確立する。Akt1 に対する実際の分子標的治療に際しては、治療対象とする個々の口腔癌が Akt1 によりその増殖が支持されていることを確かめることが必須である。

(2) Akt1 により発現調節を受ける可溶性分泌蛋白質を同定する。同蛋白質の血清濃度をモニターすることにより siAkt1 が Akt1 の発現を生体内において実際に抑制していることを確認することが可能となる。

(3) siAkt1 のアテロコラーゲンを担体とした生体への全身投与における動態および安全性について明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 口腔癌組織を用いた siAkt1 の抗腫瘍効果予測法の確立

手術標本より口腔癌原発および転移腫瘍組織の一部を採取し、腫瘍細胞を分離培養した。無血清培地下での腫瘍細胞

の増殖を確認後、siAkt1 をリバーストランスフェクションし、3 日後に生細胞数を WST-8 にて定量した。対照群と siAkt1 処理群の吸光度を比較することにより、個々の腫瘍細胞の siAkt1 に対する感受性を評価した。

(2) Akt1 により発現制御を受ける可溶性分泌蛋白質の同定

培養ヒト口腔扁平上皮癌細胞に標的配列の異なる siAkt1 を 2 種類個々に導入した。48 時間後に total RNA と蛋白質を抽出し、Akt1 の蛋白質発現抑制率を Western blot 法にて評価した。80% 以上の抑制効果が得られていることを確認したのちに、その total RNA を用いてマイクロアレイ解析を行い、発現変動が認められる遺伝子群のうち標的配列の異なる siAkt1 導入群に共通して認められるものを Akt1 により発現制御を受けている遺伝子群として同定した。その中より可溶性分泌蛋白質をコードする遺伝子を同定した。

(3) siAkt1/アテロコラーゲン製剤の生体内全身投与における動態と安全性評価

siAkt1 をアテロコラーゲン 0.1% (低用量)、0.2% (高用量) と混合し、マウス尾静脈内に投与した。投与 5 日後に剖検し、器官および組織の肉眼的および病理組織学的評価を行った。さらに、腫瘍組織、肺、肝、腎における内在性 Akt1 蛋白質の発現量を Western blot 法にて評価した。また、核酸投与によるインターフェロン応答を評価するために、肺、肝、腎より total RNA を抽出し、リアルタイム定量化 RT-PCR 法にてインターフェロン $\gamma$  応答遺伝子の mRNA の発現量を評価した。

## 4. 研究成果

(1) 口腔癌組織を用いた siAkt1 の抗腫瘍効果予測法の確立

口腔扁平上皮癌 10 症例を用いて検討したところ全症例において siAkt1 による細胞増殖抑制効果 (38~94%) が確認された。また、全例において Akt1 蛋白質の発現抑制効果が認められた。

(2) Akt1 により発現制御を受ける可溶性分泌蛋白質の同定

標的配列の異なる siAkt1 導入群に共通して認められる発現変動遺伝子で、かつ可溶性分泌蛋白質をコードする遺伝子の一つとして Osteopontin を同定した。

(3) siAkt1/アテロコラーゲン製剤の生体内全身投与における動態と安全性評価

高用量 (0.2%) 投与群においては腎臓、肺に不溶化したアテロコラーゲンの塞栓が観察され、一部の動物では死亡が認められたが、低用量 (0.1%) 投与群では若干の塞栓は確認できるもののそれによる著しい機能的および器質的変化は認められなかった。また、ヌードマウス尾静脈内に投与された siAkt1 は選択的にヒト口腔扁平上皮癌細胞背部皮下移植腫瘍組織に送達され、RNA 干渉 (RNAi) 効果と抗腫瘍活性を示した。一方、主要臓器 (肺、肝、腎) においては RNAi 効果およびインターフェロン応答は全く認められなかった。

#### 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 13 件)

1. Nishikawa Y, Miyazaki T, Nakashiro K, Yamagata H, Isokane M, Goda H, Tanaka H, Oka R, Hamakawa H. Human FAT1 cadherin controls cell migration and invasion of oral squamous cell carcinoma through the localization of  $\beta$ -catenin. *Oncol Rep* 26:587-592, 2011. 査読有
2. Zhang T, Hamada K, Hyodo M, Itoh H, Goda H, Nakashiro K, Hamakawa H. Gene therapy for oral squamous cell carcinoma with IAL. 3B promoter-driven oncolytic adenovirus-infected carrier cells. *Oncol Rep* 25:795-802, 2011. 査読有
3. Shintani S, Hamakawa H, Nakashiro K, Shirota T, Hatori M, Tanaka M, Kuroshita Y, Kurokawa Y. Friend leukaemia insertion (Fli)-1 is a prediction marker candidate for radiotherapy resistant oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg* 39:1115-1119, 2010. 査読有
4. Shintani S, Nakashiro K, Hamakawa H, Shirota T, Hatori M., Kawamoto K, Sasaki A. Genome-wide cDNA microarray screening to reveal gene-expression profiles correlated to chemosensitivity of oral squamous cell carcinoma cell lines. *Asian J Oral Maxillofac Surg* 22:7-11, 2010. 査読有
5. Sasaki T, Nakashiro K, Tanaka H, Azuma K, Goda H, Hara S, Onodera J, Fujimoto I, Tanji N, Yokoyama M, Hamakawa H. Knockdown of Akt isoforms by RNA silencing suppresses the growth of human prostate cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Biochem Biophys Res Commun* 399:79-83, 2010. 査読有
6. Nakashiro K, Nishikawa H, Hamakawa H. Spindle cell carcinoma after irradiated oral squamous cell carcinoma treated with S-1. *Asian J Oral Maxillofac Surg* 22:175-179, 2010. 査読有
7. Azuma K, Nakashiro K, Sasaki T, Goda H, Onodera J, Tanji N, Yokoyama M, Hamakawa H. Anti-tumor effect of small interfering RNA targeting the androgen receptor in human androgen-independent prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 391:1075-1079, 2010. 査読有
8. Hamada K, Zhang T, Desaki J., Nakashiro K, Itoh H, Tani K, Koyama Y, Hamakawa H. Carrier cell-mediated cell lysis of squamous cell carcinoma cells by squamous cell carcinoma antigen 1 promoter-driven oncolytic adenovirus. *J Gene Med* 12:545-554, 2010. 査読有
9. Cao F, Hata R, Zhu P, Nakashiro K, Sakanaka M. Conditional deletion of Stat3 promotes neurogenesis and inhibits astrogliogenesis in neural stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 394:843-847, 2010. 査読有
10. Nishikawa T, Nakashiro K, Sumida T, Sugita A, Hamakawa H. Mandibular osteoblastic metastasis of poorly differentiated carcinoma of the thyroid gland. *Int J Oral Maxillofac Surg* 39:301-304, 2010. 査読有
11. Nishikawa T, Nakashiro K, Sumida T, Miyagawa M, Hamakawa H. 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography computed tomography for the diagnosis of cervical lymph-node metastases of oral squamous cell carcinoma. *Asian J Oral Maxillofac Surg* 21:88-95, 2009. 査読有
12. Ishikawa T, Nakashiro K, Klosek SK, Goda H, Hara S, Uchida D, Hamakawa H. Hypoxia enhances CXCR4 expression by activating HIF-1 in oral squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 21:707-712, 2009. 査読有
13. Klosek SK, Nakashiro K, Hara S, Goda H, Hasegawa H, Hamakawa H. CD151 regulates HGF-stimulated

morphogenesis of human breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 379:1097-1100, 2009. 査読有

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 中城公一, ヒト口腔扁平上皮癌細胞の癌遺伝子依存, 第 55 回日本口腔外科学会総会・学術大会, 2010 年 10 月 27 日, 幕張
2. 中城公一, 合田啓之, 住田知樹, 浜川裕之, 口腔扁平上皮癌の原発およびリンパ節転移腫瘍における癌関連遺伝子発現プロファイル, 第 54 回日本口腔外科学会総会・学術大会, 2009 年 10 月 9 日-11 日, 札幌
3. 中城公一, 合田啓之, 住田知樹, 浜川裕之, 口腔扁平上皮癌における癌関連遺伝子発現の経時的変化, 第 33 回日本頭頸部癌学会総会, 2009 年 6 月 10 日-12 日, 札幌

〔産業財産権〕

○出願状況(計 3 件)

名称: マイクロRNA又はその発現系を含む組成物

発明者: 中城公一, 浜川裕之, 田中宏史

権利者: 愛媛大学

種類: 特許

番号: 特願 2011-113348

出願年月日: 2011 年 5 月 20 日

国内外の別: 国内

名称: マイクロRNAのアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む組成物

発明者: 中城公一, 浜川裕之, 田中宏史

権利者: 愛媛大学

種類: 特許

番号: 特願 2010-254021

出願年月日: 2010 年 11 月 12 日

国内外の別: 国内

名称: 頸部リンパ節転移分析方法及び頭頸部癌の腫瘍マーカー

発明者: 中城公一, 浜川裕之, 合田啓之

権利者: 愛媛大学

種類: 特許

番号: 特願 2009-292611

出願年月日: 2009 年 12 月 24 日

国内外の別: 国内

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

中城 公一 (NAKASHIRO KOICHI)

愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号: 90314880