

機関番号： 11301

研究種目： 若手研究 (B)

研究期間： 2009 ~ 2010

課題番号： 21791967

研究課題名 (和文)

VEGF-C/-D を標的とした頸部リンパ節転移抑制: エピジェネティカルアプローチ

研究課題名 (英文)

Epigenetic regulation of VEGF-C/-D in cervical lymph node metastasis.

研究代表者

篠原 文明 (SHINOHARA FUMIAKI)

東北大学・病院・助教

研究者番号： 80400258

研究成果の概要 (和文)：

口腔扁平上皮癌細胞株(HSC-3)において、DNMT 阻害剤 (ZEB; Zebularine) の血管新生因子 (VEGF-A) について解析した。SAHA、ZEB ともに VEGF-A の産生を抑制した。このメカニズムとして、ZEB による Hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) が分解されるが、これが PI3K/Akt や p53 のシグナルの経路を介さないことが示唆された。

また、癌の増殖、血管新生・転移に関連する EGFR のアンタゴニスト、Cetuximab の効果を各種抗癌剤 (5-FU、CDDP) と併用し解析した。HSC-3、HSC-4 において、抗癌剤単独処理に比較して 5-FU と Cetuximab を併用することで、アポトーシスが増強したが、一方で CDDP との併用では増強は認めなかった。この増強のメカニズムとして PI3K/Akt 経路の関与が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

In this study, we used the novel DNA methyltransferase inhibitor zebularine (Zeb) to investigate epigenetic influences on the secretion of VEGF-A in the OSCC cell line HSC-3. Our study revealed that neither the PI3K/Akt nor the p53 signaling pathway is required for Zeb-induced hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) degradation.

In addition, we investigated the effects of EGFR antagonist Cetuximab on apoptosis induced by anti-cancer drug (5-FU or CDDP) in HSC-3 cells. In this study, we found that Cetuximab significantly enhanced the apoptosis of HSC-3 or HSC-4 cells treated by 5-FU, but not CDDP. These results suggested the mechanism depends on the PI3K/Akt signaling pathway.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：口腔外科学一般 (含病態検査学)

1. 研究開始当初の背景

癌のリンパ行性転移のメカニズムは複

雑で、様々な因子が関与しているが、その一つにリンパ管新生 (lymphangiogenesis)

がある。リンパ管新生因子には、VEGF-C, VEGF-D, その受容体である VEGFR-3 などがある。リンパ管は血管とともに生体内の恒常性の維持や免疫応答など生理的に重要な役割を担っているだけでなく、炎症や悪性腫瘍の転移など病的状態に関与している重要な器官である。口腔癌においても、VEGF-C や VEGF-D の発現が転移に重要な因子として報告されている。しかし、Lymphangiogenesis の研究の歴史は浅く、リンパ管新生による癌転移メカニズムには不明な点が多い。

一方、腫瘍の異常な脈管形成にはエピジェネティクス制御の破綻が関与していることが知られている。エピジェネティクス制御は、遺伝子発現の on/off の機能を担い、ゲノムの遺伝子操作による高次元の生命情報を可能にしている。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、癌の血管新生や転移機構に関わることが報告されている。

2. 研究の目的

口腔癌のエピジェネティクス制御が癌の lymphangiogenesis やリンパ節転移に重要な役割を演じていることは確実であるが、そのメカニズムは、現在のところ不明である。癌のエピジェネティクスを随意に制御できれば、より効果的な転移抑制が期待できる。例えば、エピジェネティクス制御剤で癌のリンパ管新生因子や転移因子の発現を抑制できれば、手術療法とエピジェネティクス制御剤の併用でリンパ節転移を効果的に抑制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) (Decitabine, Zebularine) やヒストン脱ア

セチル化酵素 (histone deacetylase; HDAC) (SAHA, TSA) など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、細胞分化の誘導、アポトーシスの誘導などと密接な関係が報告されている。

本研究では、エピジェネティクス制御の攪乱による口腔癌の lymphangiogenesis に伴う転移を抑制するためには、①口腔癌のエピジェネティクス制御を知り、②癌の転移因子にどう影響しているかを解析する。

3. 研究の方法

(1) In vitroにおけるリンパ管新生抑制効果の評価

口腔扁平上皮癌細胞株 (HSC-2, -3, -4) と舌癌由来細胞株 (SAS) を用いて、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (HDAC 阻害剤; NVP-LAQ824, NaB, SAHA, MS-275) と DNA メチル化酵素阻害剤 (DNMT 阻害剤; Decitabine, Azacitidine, Zebularine) の抗腫瘍効果とリンパ管新生因子 (VEGF-C, D, VEGFR-3 など) の血管新生因子の産生・発現の抑制を評価する。抗腫瘍効果はアポトーシス誘導能を指標とし、TUNEL 染色で評価する。リンパ管新生因子の遺伝子発現については real-time PCR, タンパク発現については ELISA, ウェスタンブロット法で解析する。

(2) In vitroにおける上皮成長因子受容体と抗癌剤併用による効果の検討

癌の増殖、血管新生・転移に関連する上皮成長因子受容体 (EGFR; epidermal growth factor receptor) のアンタゴニストの一つ、Cetuximab と各種抗癌剤 (CDDP、5-FU) を併用し、抗腫瘍効果の検討を TUNEL 法で、EGFR シグナル分子の関与については Western blot 法で解析する。

(3) In vitroにおけるリンパ管新生モ

デルの確立とリンパ管新生抑制効果の評価

血管内皮細胞 (HUVECまたはHMVEC) と口腔癌細胞株をco-cultureし、口腔癌細胞による血管 (リンパ管) 内皮細胞のリンパ管新生誘導に対するエピジェネティクス制御化合物の効果を検討する。エピジェネティクス制御化合物のHUVECまたはHMVECの生物学的効果への影響として、tube formation assay, motility assayで評価する。

(4) マウス腫瘍モデル (異種腫瘍モデル) の確立

SCID マウスに、ヒト口腔扁平上皮癌細胞 (HSC-2、HSC-3、HSC-4、SAS 細胞 ; 1×10^6 cells) をそれぞれ側腹部に皮下注射後、腫瘍が約1週間で 100 mm^3 の大きさに形成された場合に異種の担癌マウスとして使用する。

(5) 担癌マウスにおける背部皮下法によるリンパ管新生の検討

マウス腫瘍モデル (異種腫瘍モデル) で、ヒト口腔扁平上皮癌細胞株によるリンパ管新生を背部皮下法 (dorsal air sac assay ; DAS assay) にて検討する。リンパ管新生因子 (VEGF-C, -D, VEGFR-3) の発現を免疫染色、real-time PCR、ウエスタンブロット法等で解析する。

(6) リンパ節転移モデルの作成

ヒト口腔扁平上皮癌細胞 (HSC-2、HSC-3、HSC-4、SAS細胞) または、口腔癌患者のリンパ節転移層からcell lineを樹立し、SCIDマウスで口腔癌のリンパ節転移モデルを作成する。

(7) リンパ節転移モデルにおけるエピジェネティクス制御剤の治療効果

リンパ行性転移が確立したモデルマウスをHDAC阻害剤またはDNMT阻害剤単独、ある

いは抗癌剤との併用で治療する。腫瘍増殖の抑制・転移の抑制など、治療効果がみられた腫瘍組織を採取し、転移抑制効果を免疫染色、PCR、ウエスタンで検討する。

4. 研究成果

口腔扁平上皮癌細胞株(HSC-3、HSC-4)において、HDAC 阻害剤(SAHA)または DNMT 阻害剤 (ZEB; Zebularine) の血管新生因子 (VEGF-A, VEGF-C) の産生について ELISA 法で解析した。その結果、血管新生因子に対する効果として、SAHA、ZEB ともに VEGF-A, VEGF-C の産生を抑制した。この制御のメカニズムとして、ZEB による Hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) が分解されるが、これが PI3K/Akt や p53 のシグナルの経路を介さないことが示唆された。このことから、正常な酸素分圧状態の腫瘍細胞において、ZEB が HIF-1 α タンパクの安定性や、HIF-1 α が活性化する VEGF のような標的分子に影響を与えることが考えられた。この結果から、ZEBのようなエピジェネティクス制御化合物が血管新生因子を制御し、抗癌剤と併用することにより、より有効な抗癌剤治療の可能性が示唆された。

また、癌の増殖、血管新生・転移に関連するEGFRのアンタゴニスト、Cetuximabの効果を各種抗癌剤 (5-FU、CDDP) と併用し解析した。HSC-3、HSC-4において、抗癌剤単独処理に比較して5-FUとCetuximabを併用することで、アポトーシスが增強したが、一方でCDDPとの併用では增強は認めなかった。この增強のメカニズムとしてPI3K/Akt経路の関与が示唆された。抗癌剤とEGFRの分子標的薬剤であるCetuximabの併用が癌抑制に有効であることが示唆された。また、PI3K/Akt経路の関与が示唆されたが、各種癌細胞のEGFRシグナル分子の遺伝子異常やエピジェネティクス変異、Cetuximabの感受性との関連性については更なる解析が必要である。

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 3 件)

- ① Suzuki M, Endo M, Shinohara F, Echigo S and Rikiishi H. Differential apoptotic response of human cancer cells to organoselenium compounds. Cancer Chemo. Pharma. (66)475-484 2010 査読有り
- ② Suzuki M, Endo M, Shinohara F, Echigo S and Rikiishi H. Enhancement of cisplatin cytotoxicity by SAHA involves endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in oral squamous cell carcinoma cells. Cancer Chemo. Pharma. (64)1115-1122 2009 査読有り
- ③ 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. (64)223-232 2009 査読有り

[学会発表] (計 4 件)

- ① Suppressive effects of Zebularine on 5-FU sensitivity in cancer cells
Maiko Suzuki, Manabu Endo, Fumiaki Shinohara
第 68 回 日本癌学会学術総会 横浜
2009 年 10 月 1 日
- ② Up-regulation of 5-FU sensitivity by Cetuximab in oral squamous cell carcinoma
Manabu Endo, Maiko Suzuki, Fumiaki Shinohara
第 68 回 日本癌学会学術総会 横浜
2009 年 10 月 3 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

篠原 文明 (SHINOHARA FUMIAKI)

東北大学・病院・助教
研究者番号：80400258

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：