

機関番号：16101
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2009年～2010年
 課題番号：21792005
 研究課題名（和文） 新規血管新生因子 MSF を標的とした siRNA と抗癌剤を併用した口腔癌治療法の開発
 研究課題名（英文） Development of oral cancer therapy using anti cancer drug and siRNA against MSF, a novel angiogenic factor.
 研究代表者 大江 剛（O O E G O U）
 徳島大学・病院・助教
 研究者番号：60432762

研究成果の概要（和文）：

Migration Stimulation Factor (MSF) は癌細胞に対する細胞遊走促進作用および血管新生作用を介して癌の進展に寄与している。そこで、MSF が抗癌剤との併用療法において新規分子標的となりうるかについて検討したところ、MSF siRNA と抗癌剤の併用療法は *in vitro* では細胞増殖抑制効果は相加的に過ぎなかった。また、口腔扁平上皮癌細胞株 B88 担癌ヌードマウスモデルにおいて、MSF siRNA 単独処理、抗癌剤単独処置、MSF siRNA + 抗癌剤処理で比較検討したところ、いずれの処理においても腫瘍増殖の抑制効果を認めた。

研究成果の概要（英文）：

Migration Stimulating Factor (MSF) enhanced cancer progression by stimulating of cancer migration and angiogenic. In vitro study, combination therapy of siRNA against MSF (MSF siRNA) and anti cancer drug demonstrated additive effect. In vivo study, treatment with MSF siRNA only or combination therapy of MSF siRNA and anti cancer drug showed anti cancer effect against nudemice bearing B88, oral SCC.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
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：歯学・外科系歯学

キーワード：臨床腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

薬剤による血管新生阻害を癌治療に用いる

という概念は、約 35 年前に Judah Folkman によって初めて提唱された。腫瘍増殖は血流供給に依存しているため、血管新生阻害は腫瘍への栄養路を絶つことによって抗腫瘍効果を現わすであろうという発想であった (N Eng J Med 285: 1182-1186, 1971)。しかし、現在までに種々の血管新生阻害剤を用いた研究が行われてきたが、いずれも単独では生存期間の延長を認めていない。近年、転移性大腸癌患者に対して、抗 vascular endothelial growth factor (VEGF) ヒト化モノクロナル抗体であるベバシズマブと旧来の抗癌剤との組み合わせ投与の効果を検討する第Ⅲ相試験が行われ、抗癌剤単独や血管新生阻害剤単独ではなく、抗癌剤との併用によって初めて、生存期間が約 5 か月延長することが報告されている (N Eng J Med 350: 2335-2342, 2004)。このベバシズマブと抗癌剤の組み合わせは、米国やいくつかの国では今や転移性大腸癌における標準的な治療法となっており、さらに乳癌と肺非小細胞癌に対しても、同様に有望な結果が出ている (N Eng J Med 355: 2542-2550, 2006)。これらの治験では抗癌剤に血管新生阻害剤を併用することで、抗癌剤の投与量を少なくし副作用を軽減するのみならず、相乗的な治療効果も認められている。これは血管新生阻害剤が一般的な抗癌剤の増感剤となりうることを示唆している。

MSF はフィブロネクチンのアイソフォームで、乳癌や前立腺癌において癌細胞や周囲間質細胞で発現している 70 kDa のタンパクであり、2003 年に英国 Dundee 大学の Schor 教授らによりクローニングされた (Cancer Res 63: 8827-8836, 2003)。MSF は (1) 線維芽細胞、血管内皮細胞ならびに癌細胞の migration 促進、(2) 血管新生の誘導、(3) 線維芽細胞のヒアルロン酸合成の促進など種々の生理活性を有している (図 1)。申請者は既に口腔癌患者の生検材料を用いた免疫組織学的検索 (図 2) にて、ほとんどの口腔癌において MSF が発現していること、MSF の発現が患者の生存率ならびに腫瘍の大きさと相関していることを見いだした。さらに MSF 高発現群においては低発現群と比較して、腫瘍血管のマーカーである CD105 陽性腫瘍内血管密度が有意に上昇していることを明らかにした (第 31 回頭頸部癌学会で発表)。

さらに、MSF の口腔癌に対する直接的な作用を、当教室が有する 4 種類の口腔癌細胞株 (BHY, TYS, HNT, HSC3 細胞) の MSF 遺伝子をノックダウンすることで検討した。まず、これらの細胞株が MSF mRNA を発現していること、癌細胞の培養上清中に MSF タンパクが

分泌されていることを確認した。次に、MSF に対する siRNA を導入し、MSF 遺伝子をノックダウンすることによって、口腔癌細胞の①増殖能 (図 3) および②遊走能 (図 4) が低下すること、また軟寒天培地上で細胞増殖が低下することより、③MSF が足場非依存性の増殖に関与していること (図 5)、④MSF が接触増殖抑制に影響を与えることを明らかにした。これらの結果より MSF の抑制は口腔癌の新規分子標的治療の可能性を有していると申請者は考えた (第 66 回日本癌学会学術総会で発表)。

2. 研究の目的

申請者は現在までに、MSF に対する siRNA が口腔癌に直接的に作用し、抗腫瘍活性を發揮することを明らかにした。前述のごとく MSF は血管新生作用を有していることより、MSF をターゲットとした分子標的治療が血管新生阻害を介した抗腫瘍効果も発現する可能性を有している。一般に血管新生阻害剤は抗癌剤の作用を増強することが知られているので、本研究では MSF に対する siRNA と抗癌剤の併用による口腔癌に対する新規の複合的治療法の開発を目的とする。

3. 研究の方法

(1) MSF のノックダウンと抗癌剤の併用が細胞増殖に与える影響を検討する

当教室の有する 4 種類の口腔癌細胞株 (BHY, TYS, HNT, HSC3 細胞) の MSF 遺伝子を siRNA でノックダウンした後に 96 穴プレートに 1×10^3 個/well で培養し、各種抗癌剤を添加し 0、1、3、5 および 7 日目の細胞数を MTT assay にて検索する。すなわち、MSF siRNA 単独処理、抗癌剤単独処理、MSF siRNA + 抗癌剤処理、無処理の 4 群で細胞増殖を比較検討する。なお、抗癌剤は現在口腔癌に対して適応のある S-1 (5, 10, 50, 100, 500 mg/ml)、Docetaxel (5, 10, 50, 100, 500 nM)、CDDP (1, 5, 10, 25, 50 μ g/ml)、PEP (1, 5, 10, 25, 50 μ g/ml) を用いる。

(2) MSF のノックダウンと抗癌剤の併用が血管新生に与える影響を検討する

MTT assay で各種抗癌剤の至適濃度を決定し、MSF 遺伝子のノックダウンと抗癌剤の併用が血管新生に与える影響を検討する。まず、上記 4 群の培養上清を回収する。96 穴プレートに 1×10^3 個/well で播種した血管内皮細胞 HuVEC に回収した培養上清を 1/2、1/4、1/8、1/16 および 1/32 の割合で希釈して添加し 0、1、3、5 および 7 日目の細胞数を MTT assay にて検索する。

また、ボイデンチャンバーを用いた

migration assay で培養上清の血管内皮細胞の遊走能に対する作用を検討する。すなわち upper chamber に 5×10^4 個を無血清培養液 (0.1% 牛胎児血清アルブミン含有) に懸濁し播種する。Lower chamber に上記培養上清を 1/2、1/4、1/8、1/16 および 1/32 の割合で希釈して添加し培養する。ポジティブコントロールとして 10% 血清含有培養液を使用する。チャンバーの細胞播種面を綿棒で拭うことで非遊走細胞を除去し、非細胞播種面である細胞遊走面をヘマトキシリン・エオジン染色する。顕微鏡下に遊走細胞数を計測し血管内皮細胞の遊走能を検討する

(3) 動物実験モデルにて治療プロトコルを確立する

上記実験にて *in vitro* で最も抗腫瘍効果が高かった抗癌剤を動物実験に用いる。ヌードマウス背部皮下に口腔扁平上皮癌培養細胞 BHY を移植後担癌マウスとし、MSF siRNA および抗癌剤を用いた実験的治療を行う。MSF siRNA 投与は Malvy らのプロトコルに従い行う。すなわち 3×10^6 個の BHY 細胞を 5 週齢 BALB/c 雌ヌードマウス背部皮下に移植し担癌状態とし、腫瘍径が約 7mm となる 1 週間後より、MSF siRNA を $150 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $50 \mu\text{l}$ /マウスで腫瘍周囲に週 2 回投与する (J Am Assoc Pharm Sci: on line publication, 2006)。コントロール群は同様のスケジュール、量にてコントロール RNA を投与する。MSF siRNA 局所投与の効果判定は 28 日目に屠殺したマウスの残存腫瘍を MSF に特異的な抗体で染色し、免疫組織学的に検討する。また抗癌剤は S-1 ($10\text{mg}/\text{kg}$ 、週 5 回経口投与)、Docetaxel ($10\text{mg}/\text{kg}$ 、週 2 回腹腔内投与)、CDDP ($3\text{mg}/\text{kg}$ 、週 2 回腹腔内投与) をあるいは PEP ($1\text{mg}/\text{kg}$ 、週 2 回腹腔内投与) 投与する。MSF siRNA 投与前 (週 2 回) に腫瘍サイズ (長径および短径) ならびに体重を測定し治療効果の判定に用いる。腫瘍体積は $0.5 \times \text{長径} \times \text{短径}^2$ の計算式で算出する。治療開始から 3 週間後に屠殺し、残存腫瘍における血管新生抑制効果を免疫組織染色学的に検討する。すなわち血管新生因子として VEGF、IL-1 α 、IL-6 および IL-8 の発現および腫瘍血管のマーカーである CD105 陽性腫瘍内血管を血管数、血管密度の観点から検討する。

また、リンパ節転移能を有する口腔扁平上皮癌培養細胞 B88 を 5×10^6 個咬筋に移植した同所性移植モデルにて同様の治療プロトコルの抗腫瘍効果を検討する

4. 研究成果

Migration stimulating Factor (MSF) は癌

細胞に対する細胞遊走促進作用および血管新生作用を介して癌の進展に関与している。そこで、平成 21 年度に MSF が抗癌剤との併用療法において新規分指標的となりうるかについて検討したところ、MSF siRNA と抗癌剤の併用療法は、*in vitro* では、細胞増殖抑制効果は相加的に過ぎなかった。しかしながら、血管新生抑制効果を発現していたことより、*in vivo* での抗腫瘍効果について検討した。

口腔扁平上皮癌細胞株 B88 担癌ヌードマウスモデルにおいて、MSF siRNA 単独処理、抗癌剤 (TXT, CDDP, 5-FU) 単独処理、MSF siRNA+抗癌剤処理で腫瘍増殖抑制効果について比較検討したところ、いずれの処理においても抑制効果を認めた。

また、その時の残存腫瘍における血管新生抑制効果を検討した。VEGF, IL-1 α , IL-6, IL-8 の発現を免疫組織学的に検討したところ、有意差は認めないが MSF siRNA+抗癌剤処理において、上記サイトカインの発現低下傾向を認めた。

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 3 件)

1. Migration-stimulating factor as a novel biomarker in salivary gland tumours. Aljorani LE, Bankfalvi A, Carey FA, Harada K, Ohe G, Jones SJ, Ellis IR, Schor SL, Schor AM. J Oral Pathol Med. 2011 (査読有り)

2. Multi-functional modulation of IGD motogenic potential in MSF (migration stimulating factor). Ellis IR, Jones SJ, Staunton D, Vakonakis I, Norman DG, Potts JR, Milner CM, Meenan NA, Raibaud S, Ohe G, Schor AM, Schor SL. Exp Cell Res 316, 2465-2476, 2010 (査読有り)

3. Migration Stimulating Factor (MSF) promotes fibroblast migration by inhibiting AKT. Ellis IR, Jones SJ, Lindsay Y, Ohe G, Schor AM, Schor SL, Leslie NR. Cell Signal. 22, 1655-1659, 2010 (査読有り)

[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：
種類：
番号：
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

大江 剛 (OOE GOU)

徳島大学・病院・助教

研究者番号：60432762

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：