

## 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25年 5月1日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592240

研究課題名（和文） ミッドカインを標的にした口腔癌の新規診断法の確立と治療法の開発

研究課題名（英文） Establishment of the new diagnostic procedure of oral cancer which targeted midkine and development of the therapy

研究代表者

太田 和俊（OTA KAZUTOSHI）

熊本大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20336209

研究成果の概要（和文）：悪性腫瘍組織で過剰発現が認められるミッドカイン蛋白が、口腔扁平上皮癌患者の腫瘍組織や血中でも過剰発現が見られ、口腔扁平上皮癌の腫瘍マーカーとして有効な検査法であることを証明した。さらに口腔扁平上皮癌患者の血中ミッドカイン値は生命予後とも相関することを発見した。その作用機序としてはミッドカインが細胞周期を抑制し血管新生を促進することで抗癌剤耐性に強く関与している事が考えられた。ミッドカイン発現抑制による薬剤耐性の変化は癌治療の新たな治療戦略となる可能性を秘めていると推察される。

研究成果の概要（英文）：We demonstrated that serum midkine concentrations were a useful marker of oral squamous cell carcinoma (OSCC), because midkine protein overexpressed in OSCC tissues and blood of OSCC patients. Furthermore, we showed that the increased S-MK concentrations in OSCC patients were strongly associated with poor survival. We suggested that mechanism by which for midkine inhibited a cell cycle and promoted angiogenesis was involved in anticancer drug resistance. The drug-resistant change by the midkine expression suppression may be a novel treatment strategy of the cancer therapy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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、ミッドカイン、口腔癌、腫瘍マーカー、薬剤耐性

## 1. 研究開始当初の背景

口腔扁平上皮癌の病態解析・治療研究は、これまでも多くの研究施設で行われ、診断能力や治療技術の向上が得られてきた。しかし、その生命予後は未だ満足できる成績ではなく、癌の早期発見や新たな治療法の確立が期待されていた。その中で分泌蛋白であるミッドカイン

(MK) が、さまざまな悪性腫瘍組織や担癌患者血中において過剰発現が報告されはじめていた。MKは細胞増殖能や抗アポトーシス、血管新生能などの様々な作用を持つ成長因子で、腫瘍の悪性度や生存率との相関も報告され始めていた。そこで口腔扁平上皮癌患者の癌組織と血中MK値を計測し、癌組織、血中ともに

過剰発現していることを発見した。

## 2. 研究の目的

- (1) 口腔癌のスクリーニングや、再発・後発転移の早期診断マーカーとして MK を含めた検査法を樹立すること
- (2) 抗癌剤耐性口腔扁平上皮癌に対する MK の病態解析を行うことで治療法への道を探求すること

## 3. 研究の方法

本研究は以下の2項目から構成されるため、項目別に述べる。

- (1) MK を標的とした口腔癌の腫瘍マーカーとしての検討  
口腔扁平上皮癌、前癌病変（上皮性異形成）、良性腫瘍患者、健常者の血清を用いて血清 MK 値を計測し、腫瘍マーカーとしての特異度についての検討を行った。同時に、SCC 抗原や CYFRA、などの既存の腫瘍マーカーも計測し、組み合わせることによりマルチマーカーとしての有効性についても検討した。さらに SELDI-TOF-MS を用いて口腔癌腫瘍マーカーの網羅的解析を行い、MK のマルチマーカーとしてのより高い可能性についても検討した。
- (2) 抗癌剤耐性口腔扁平上皮癌に対する MK の病態解析
  - ① シスプラチン耐性ヒト口腔扁平上皮癌細胞株 (Sa-3R 細胞) と親株 (Sa-3 細胞) の MK 発現量を比較検討し、次にミッドカイン siRNA を Sa-3R 細胞と Sa-3 細胞にトランスフェクションし、MK の遺伝子抑制と導入効率を確認した。その後、シスプラチン (COOP) を投与し、細胞の生存能を MTT アッセイで確認し、コントロール siRNA 導入群と比較検討した。さらに細胞より RNA を抽出し細胞周期関連遺伝子についても検討を行った。
  - ② Sa-3R 細胞をヌードマウスの皮下に移植しモデルマウスを作成する。モデルマウスを 5 群 (MK siRNA 投与群、MK siRNA + CDDP 投与群、コントロール siRNA 投与群、コントロール siRNA + CDDP 投与群、CDDP 投与群) に分類し、MK siRNA を腹腔内に投与し腫瘍の大きさを経時的に計測する。実験結果をふまえて siRNA の投与時期、投与量、投与方法について検討を行い、

20 日後に屠殺し、腫瘍の大きさや重量を計測した。さらに細胞周期関連蛋白、アポトーシス関連蛋白の抗体を用いて免疫染色を行い群間で比較検討した。

## 4. 研究成果

- (1) MK を標的とした口腔癌の腫瘍マーカーとしての検討  
良性腫瘍や前癌病変を有する患者の血清 MK 値の測定、健常人の血清 MK 値と年齢における検討を行った結果、健常人より良性腫瘍や前癌病変患者での血清ミッドカイン血清 MK 値は高い事が判明した。さらに健常人においても加齢に従い血清 MK 値は上昇する傾向にあることが判明した。次に口腔癌患者と健常人の血清を用いて既存の腫瘍マーカー (SCC 抗原、CYFRA21-1) を計測し、MK 値と組み合わせることで診断率の向上が得られるか検討した。その結果、SCC 抗原、CYFRA21-1 で高値を示す検体のほとんどが MK 値も高値を示し、腫瘍マーカーとして特異度の上昇には寄与したが感度を低下させる結果となった。そこで SELDI-TOF-MS を用いて口腔癌患者血清中で過剰に発現している蛋白を検索し、炎症性蛋白をはじめとした様々な蛋白の過剰発現を確認した。その中でも血清濃度が測定可能であった CRP や IL-6 や SALL4、p53 濃度と MK 値の組み合わせを検討したが有意に診断率の向上、特異度の向上につながるような蛋白はなかった。これらの結果、血中 MK 値は、単独使用での検索が最も適当だろうと考えられた。
- (2) 抗癌剤耐性口腔扁平上皮癌に対するミッドカインの病態解析
  - ① Sa-3R 細胞と Sa-3 細胞を用いて、MK 発現の抑制と抗癌剤による治療効果の検討を行った結果、Sa-3 細胞より Sa-3R 細胞のほうが MK mRNA の発現量は少なく細胞上清中の MK 蛋白量も少ないことが判明した。その理由を解明するため Sa-3 細胞より siRNA を用いて MK の発現を抑制したところ細胞周期を促進する cyclin D、cyclin E の mRNA 発現が減少し、細胞周期を抑制する p21、p15、p19 の mRNA 発現が増加していた。さらに siRNA で MK 発現を抑制した Sa-3 細胞に CDDP を投与したところ MTS アッセイで有意に増殖抑制がみられた。以上の結果を総括すると、Sa-3R 細胞では、

Sa-3 細胞が CDDP 耐性を獲得するに当たり MK を減少させ細胞周期を抑制し細胞増殖を抑え CDDP の細胞内への取り込み量を減少することで Sa-3R は耐性を獲得しているのではないかと考えられた。そこで MK が細胞周期のどの部位で作用するかフローサイトメトリーを用いて実験を行い、MK を作用させた細胞では G0/G1 期の割合よりも S 期の割合が高くなる事が判明した。この結果より抗癌剤耐性癌に対して MK を作用させると細胞周期が活性化し、抗癌剤の効力向上につながるのではないかと推察された。

② Sa-3R 細胞をヌードマウスの皮下に移植し CDDP と MK siRNA を腹腔内に投与した結果、MK siRNA + CDDP 投与群では CDDP 単独投与群に比較し、腫瘍は縮小傾向を示したが有意差は得られなかった。そこで実験で得られた腫瘍組織の免疫染色を行うと、Ki-67、p53、pRB、cyclinD では両群間に明らかな差は見られず、VEGF の MK 免疫染色において CDDP 単独投与群に比較し MK siRNA + CDDP 投与群では陽性率がやや低い結果が得られた。これらの結果は、MK は抗癌剤耐性扁平上皮癌において細胞周期を抑制するだけでなく血管新生を抑制することでも腫瘍を抑制したと考えられた。これらの結果より MK 発現抑制による薬剤耐性の変化は癌治療の新たな治療戦略となる可能性を秘めていると考えられた。

#### 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 5 件)

- ① Sueyoshi T, Jono H, Shinriki S, Ota K, Ota T, Tasaki M, Atsuyama E, Yakushiji T, Ueda M, Obayashi K, Mizuta H, Ando Y. Therapeutic approaches targeting midkine suppress tumor growth and lung metastasis in osteosarcoma. *Cancer Lett.*;316(1):23-30, 2012. 査読有
- ② Ota T, Jono H, Ota K, Shinriki S, Ueda M, Sueyoshi T, Nakatani K, Hiraishi Y,

Wada T, Fujita S, Obayashi K, Shinohara M, Ando Y. Downregulation of midkine induces cisplatin resistance in human oral squamous cell carcinoma. *Oncol Rep.*;27(5):1674-1680, 2012. 査読有

- ③ Shinriki S, Jono H, Ueda M, Ota K, Ota T, Sueyoshi T, Oike Y, Ibusuki M, Hiraki A, Nakayama H, Shinohara M, Ando Y. : Interleukin-6 signalling regulates vascular endothelial growth factor-C synthesis and lymphangiogenesis in human oral squamous cell carcinoma. *J Pathol.* 225(1):142-50. 2011 査読有
- ④ Ota K, Fujimori H, Ueda M, Jono H, Shinriki S, Ota T, Sueyoshi T, Taura M, Taguma A, Kai H, Shinohara M, Ando Y : *Int J Oncol.* 37(4):797-804. 2010 査読有
- ⑤ Ota T, Ota K, Jono H, Fujimori H, Ueda M, Shinriki S, Sueyoshi T, Shinohara M, Ando Y. : Midkine expression in malignant salivary gland tumors and its role in tumor angiogenesis. *Oral Oncol.* 46(9):657-61. 2010 査読有

[学会発表] (計 2 件)

- ① Ota K, Ueda M, Shinriki S, Yoshida R, Yasunaga M, Shinohara M, Ando Y: Overexpression of the novel oncogene SALL4 in oral squamous cell carcinoma. 27th ICMFS World Congress. 6 March, 2013, Bad Hofgastein, Austria.
- ② 太田和俊、吉田遼司、植田光晴、神力 悟、太田智子、末吉貴直、城野博史、安東由喜 男、篠原正徳：口腔扁平上皮癌における Zinc finger 蛋白 Sall4 発現について

の検討 第49回日本癌治療学会学術集  
会 平成23年10月28日 名古屋国際会  
議場 名古屋 ポスター

6. 研究組織

(1) 研究代表者

太田 和俊 (OTA KAZUTOSHI)  
熊本大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：20336209

(2) 研究分担者

篠原 正徳 (SHINOHARA MASANORI)  
熊本大学・生命科学研究部・教授  
研究者番号：90117127

(3) 研究分担者

安東 由喜雄 (ANDO YUKIO)  
熊本大学・生命科学研究部・教授  
研究者番号：20253742