

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 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791972

研究課題名（和文）口腔癌転移阻止を目的とした分子標的治療の研究

研究課題名（英文）Molecular targeting therapy targeting for inhibition of metastasis on oral squamous cell carcinoma

研究代表者

濱田 正和（HAMADA MASAKAZU）

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：80506361

研究成果の概要（和文）：

21 世紀の癌治療の重要なツールは癌の分子標的治療である。しかし、口腔扁平上皮癌において頻度の高いリンパ節転移や遠隔転移に着目した研究は少ない。caspase 非依存的にアポトーシスを誘導する safingol と分子標的治療薬の中でも新規の GGTI との併用は safingol は抗腫瘍効果、GGTI-298 は浸潤能を抑制する働きを認めたため、抗癌剤耐性の克服、転移の抑制に対して大いに貢献できると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

An important tool of cancer therapy in 21th century is a molecular targeting therapy. However there are a little studies to focused on distant metastasis and lymph node metastasis which occur frequently on oral squamous cell carcinoma. Combinations of safingol, which induced apoptosis caspase independent manner and GGTI-298, new molecular target drug, exhibited synergistic effect. GGTI-298 and safingol inhibited cell growth synergistically and increased the number of apoptotic cells. Combination of safingol and GGTI-298 may be a candidate for the treatment of oral SCC targeting for anticancer drug resistance and suppression of metastasis because safingol have antitumor effect and GGTI-298 suppress metastasis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系歯学・口腔外科学一般

キーワード：口腔癌、分子標的治療

1. 研究開始当初の背景

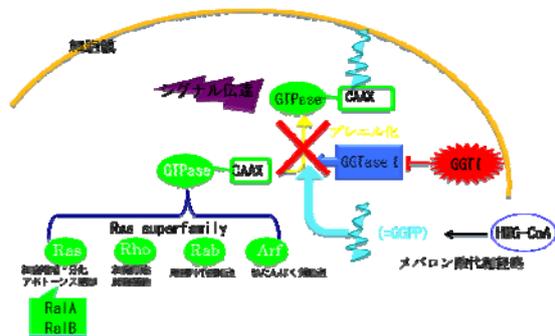
癌の分子標的治療は、癌に特徴的な分子の機能を解明し、その成果をもとに特定の分子を標的として薬剤などを作用させる治療法

で、その対象は、癌遺伝子産物、シグナル伝達系増殖因子、サイトカイン、転写因子、細胞周期など多岐にわたっている。これまで増殖因子レセプターに対するチロシンキナーゼ阻害剤や抗体を中心に実用化がされてき

た。今後、他のプロテインキナーゼ、ファルネシルトランスフェラーゼ、プロテアソーム、分子シャペロン、ヒストンデアセチラーゼなどを分子標的とした研究が進むと考えられる。

Ras は非常に多くのシグナル伝達の基点をなす重要な分子であり、細胞の癌化に重要な役割を果たしているため、癌治療の重要な分子標的となる。Ras スーパーファミリーの低分子量 G タンパク質はその効果を発揮するためには、ファルネシルトランスフェラーゼ (FTase) あるいはグラニルグラニルトランスフェラーゼ (GGTase) などの転移酵素により翻訳後修飾 (プレニル化) を受ける必要がある。これらを阻害するのが FTase 阻害剤 (FTI) と GGTase 阻害剤 (GGTI) である。特に最近、抗癌作用を発揮するためには、低分子量 G タンパク質のファルネシル化阻害よりグラニルグラニル化阻害が重要であることが報告されている。Ras 下流の低分子量 G タンパク質として RalA、RalB が細胞浸潤の阻害に重要な役割を果たすことも報告されている。口腔扁平上皮癌におけるこれら Ras スーパーファミリーの役割はまだ明らかになっていない。

低分子量GTPタンパク質のプレニル化



PKC の発現は腫瘍の発癌、浸潤、抗癌剤耐性に重要な働きをするとされている。高分化型口腔扁平上皮癌細胞では PKC の発現レベルは PKC α 、 β I の発現が高いと報告されており、分子標的として注目されている。さらに PKC α は細胞運動、フィロポディア形成を制御することも知られている。

これまで、研究代表者は PKC の分子種を分子標的とした研究を行ってきた。PKC α 阻害剤 safinolol、PKC α と PKC β の阻害剤 dequalinium chloride、PKC α 、PKC β I、PKC μ の阻害剤 G66976、6 種の PKC 分子種を阻害する PKC 阻害剤 staurosporine を用いて口腔扁平上皮癌細胞に対する抗腫瘍効果を測定し、safingol が caspase 非依存的にアポトーシスを誘導すること、このアポトーシスではミトコンドリアから核内へ移行する

endonuclease G が重要な役割を果たすことを明らかとした。さらに、safingol は浮遊した口腔癌細胞の死 (Anoikis) を誘発することも明らかにしている。

2. 研究の目的

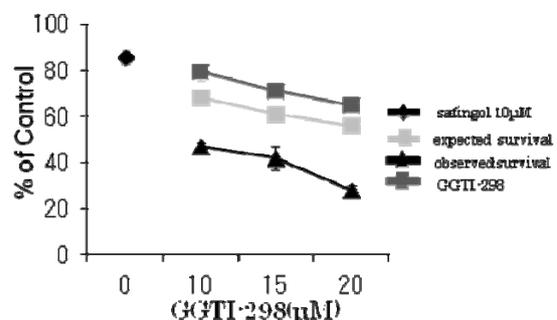
Ras は、がん遺伝子として発見された低分子量 G タンパク質で、そのスーパーファミリーは腫瘍細胞の遊走や浸潤に深く関与することが示されており、分子標的として注目されている。さらに、細胞運動を制御するものとして PKC が知られている。本研究は、これら Ras スーパーファミリーと PKC に着目して口腔扁平上皮癌の浸潤転移を抑制し、腫瘍細胞を死滅させる分子標的治療の開発を目指した。

3. 研究の方法

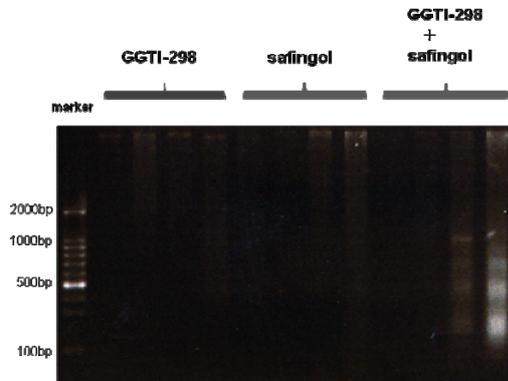
各種ヒト口腔扁平上皮癌細胞を用いて、PKC 阻害剤とファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤、グラニルグラニルトランスフェラーゼ阻害剤、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤との併用効果を MTT 法にて行った。細胞周期は FCM、断片化 DNA の検出をアガロースゲル電気泳動、細胞遊走能は Transwell chamber assay と Wound healing assay にて、細胞浸潤能は Matrigel invasion assay にて測定した。低分子量 G タンパク質及び細胞周期関連タンパク質の検出をイムノブロット法、アクチン細胞骨格はパロイジンで蛍光免疫染色し共焦点蛍光顕微鏡にて観察した。

4. 研究成果

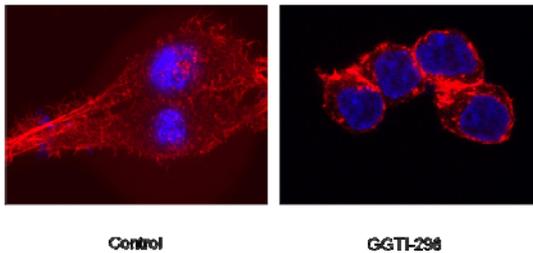
PKC 阻害剤とファルネシルトランスフェラーゼ (FTase) 阻害剤、グラニルグラニルトランスフェラーゼ (GGTase I) 阻害剤、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤との併用効果を MTT 法にて検討を行ったところ、特に safingol と GGTase I 阻害剤である GGTI-298 で併用薬剤の相乗効果を認めた。



また GGTI-298 と safinol を併用することで、それぞれの単独処理ではみられなかったアポトーシスを示す subG₁ の増加と DNA ラダーの顕著な増加がみられた。



そこで次に GGTaseI 阻害剤単独の口腔扁平上皮癌細胞に対する影響を検討した。口腔扁平上皮癌細胞を処理したところ、細胞突起の伸長と細胞の円形化が認められ、さらに共焦点蛍光顕微鏡で観察するとアクチンストレスファイバーの消失が観察された。



細胞の運動能について、wound healing assay を行ったところ、GGTI 存在下では、傷害部位への細胞の遊走が阻害され、修復が遅延した。低分子量 G たんぱく質をイムノブロットにて検出すると、RalA、RhoA については経時的にプレニル化されていない unprenyl 化タンパクの増加がみられた。caspase 非依存的にアポトーシスを誘導する safinol と分子標的治療薬の中でも新規の GGTI との併用は safinol は抗腫瘍効果、GGTI-298 は浸潤能を抑制する働きを認めるため、抗癌剤耐性の克服、転移の抑制に対して大いに貢献できると考えられた。

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 Shintani M, Takahashi G, Hamada M, Okunaga S, Iwai S, Yura Y. Effect of ultrasound in herpes simplex virus infection in cell culture. *Virol J.* 8(1) : 446. 2011 査読有

- ② 岩井聡一, 米川敦子, 原田知恵, 濱田正和, 片桐涉, 中澤光博, 由良義明 口腔扁平上皮癌細胞の浸潤能と遊走能における Wnt-beta-catenin 経路の関与 日本口腔外科学会雑誌 57(10) : 533-541. 2011 査読有
- ③ Masakazu Hamada, Tetsuei Miki, Soichi Iwai, Hidetaka Shimizu, Yoshiaki Yura. Involvement of RhoA and RalB in geranylgeranyltransferase I inhibitor-mediated inhibition of proliferation and migration of human oral squamous cell carcinoma cells. *Cancer Chemother Pharmacol.* 68(3) : 559-569. 2011 査読有
- ④ 濱田正和, 野田隆之, 岩井聡一, 由良義明 口腔癌の分子標的治療に向けたアポトーシス誘導薬の展望(総説) 口腔組織培養学会誌 19(2), 37-48, 2010 査読有
- ⑤ Iwai S, Yonekawa A, Harada C, Hamada M, Katagiri W, Nakazawa M, Yura Y. Involvement of the Wnt- β -catenin pathway in invasion and migration of oral squamous carcinoma cells. *Int J Oncol.* 37(5) : 1095-103. 2010 査読有

[学会発表] (計 6 件)

- ① 若林健, 濱田正和, 竹下彰範, 飯井孝年, 奥長秀介, 岩井聡一, 由良義明 PKC α 阻害剤 safinol による細胞死におけるミトコンドリア分裂の関与 第 48 回日本口腔組織培養学会学術集会 2011.11.19. 浦安
- ② 飯井孝年, 高橋元, 若林健, 奥長秀介, 濱田正和, 米川敦子, 岩井聡一, 由良義明 マウス扁平上皮癌に対する変異型単純ヘルペスウイルスの抗腫瘍効果 第 48 回日本口腔組織培養学会学術集会 2011.11.19. 浦安
- ③ 若林健, 濱田正和, 竹下彰範, 飯井孝年, 奥長秀介, 岩井聡一, 由良義明 PKC α 阻害剤 safinol による活性酸素を介した細胞死の誘導 第 56 回日本口腔外科学会総会, 2011.10.21. 大阪
- ④ Masakazu Hamada, Soichi Iwai, Atuko Yonekawa, Yoshihiro Morita, Yoshiaki Yura Combinational effect of Geranylgeranyltransferase-I Inhibitor GGTI-298 and PKC inhibitor Safingol on Human Oral Squamous Cell Carcinoma 第 70 回 日本癌学会学術集会 2011.10.3. 名古屋
- ⑤ 高橋元, 飯井孝年, 濱田正和, 山本直典, 岩井聡一, 由良義明 複製可能型腫瘍融解性ヘルペスウイルス (HSV-1) の作製および腫瘍内増殖様式の検討 第 35 回日本頭頸部癌学会 2011.6.9. 名古屋

- ⑥ 若林健, 濱田正和, 山本直典, 高橋元,
飯井孝年, 岩井聡一, 由良義明 活性酸素
による endonuclease G を介した細胞死の
誘導 第 65 回日本口腔科学会学術集会
2011.4.11. 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

濱田 正和 (HAMADA MASAKAZU)
大阪大学・歯学部附属病院・医員
研究者番号 : 80506361