

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23792154

研究課題名（和文）腫瘍・間質の血管新生シグナルを標的とした新規口腔扁平上皮癌治療戦略

研究課題名（英文）Novel therapeutic strategy for oral squamous cell carcinoma by targeting angiogenesis signal.

研究代表者

松本 直行 (MATSUMOTO NAOYUKI)

日本大学・歯学部・助教

研究者番号：20386080

研究成果の概要（和文）：口腔扁平上皮癌細胞株である HSC-3 に対して、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤である酪酸ナトリウム(SB)存在下における VEGF family 発現の変化を検討した。また SB 存在下において AP-1 阻害剤、AKT 阻害剤および mTOR 阻害剤が、VEGF family 産生量に与える影響を検討した。

SB 刺激による VEGF family の mRNA およびタンパク発現量を検討したところ、VEGF-A 産生量はコントロール 群と実験群に大きな差は検出されなかったが、VEGF-B、VEGF-C および VEGF-D では mRNA 発現量の減少が確認された。また血管誘導因子である angiopoietin-2 および platelet derived growth factor beta の発現量低下が見られ、SB による口腔癌間質誘導の抑制が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We investigated the effect of sodium butyrate (SB), one of histone deacetylase inhibitor on VEGF family expression in oral cancer cell line, HSC-3. Moreover, we investigated the effect of several inhibitors for AP-1, AKT and mTOR on VEGF family expression under SB stimulation.

There are minimal difference in VEGF-A mRNA expression level between control and SB treated groups, however, we identified decrease of VEGF-B VEGF-C and VEGF-D mRNA expression. Moreover, angiogenic factor, angiopoietin-2 and platelet derived growth factor beta mRNA were decreased by SB treatment. These data suggest that SB inhibits stromal inducement in invasive oral carcinoma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：癌、遺伝子、間質誘導

1. 研究開始当初の背景

口腔扁平上皮癌の転移病巣に対する有効な治療方法は確立されていない。そのため原発巣からの多臓器転移を阻止するために、血

管・リンパ管(脈管)新生の制御が重要な課題となっている。

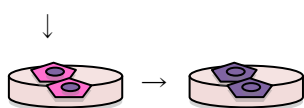
申請者らはヒストン脱アセチル化阻害剤 (HDACi)の一つである酪酸ナトリウム (SB)

が口腔癌細胞株に与える影響を網羅的に解析し、脈管新生誘導因子の RNA ならびにタンパク発現量が大きく変動していることを見いだしている。

以上を踏まえ、本研究では HDACi、VEGF 産生カスケード阻害剤による脈管新生誘導因子の発現制御を *in vitro* ならびに *in vivo* で検討し、腫瘍脈管新生を標的とした治療法を開発することを目的とする。

<2008～2009年の結果>

SB 添加



COX-2	↑
VEGF-A	微増
VEGF-C	↓
VEGF-D	↓
Ang-2	↓
PDGF-B	↓

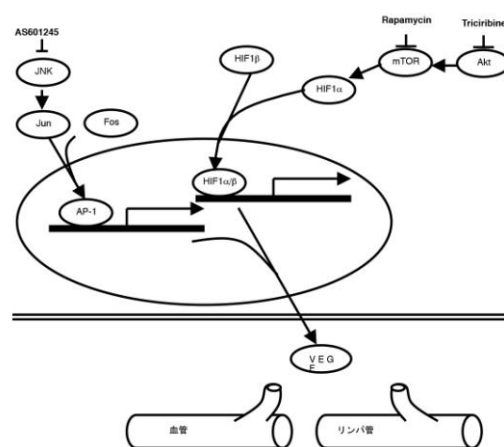
SB 刺激後の VEGF family 発現の変化量は、VEGF-A は SB 刺激により mRNA 量が不変ないし微増を示すのに対し、他のサブタイプが減少を示すのと異なる。

<仮説>

VEGF family の発現調節の不一致の詳細はまだ明らかでないが、COX-2 代謝産物である prostaglandin E2 はその受容体である EP1/EP4 を介して Src や MAPK p38 を活性化させ、VEGF family の発現を促進する (Cancer Res 2004;64:554-564, Brit J Cancer 2006;94:1154-1163) ことから、SB 刺激による VEGF family の遺伝子発現は Src/MAPK p38 シグナル以外の経路が発現

誘導に重要な役割を果たすと考えられた。

VEGF 遺伝子の転写は、AP-1 や SP-1、低酸素条件下で活性化される hypoxia inducible factor α (HIF1 α) により正の調節を受けると報告されている (Nature 2008;8:604-617)。VEGF 遺伝子の promoter region は AP-1、SP-1 binding site を有していることから、SB 刺激下ではこれらの転写因子が VEGF 発現に促進的に働いている可能性がある。



2. 研究の目的

ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤、特に酪酸ナトリウム (SB) が腫瘍間質誘導に与える影響と、そのシグナル伝達を検討する。

3. 研究の方法

口腔扁平上皮癌細胞株 1×10^5 個を 35mm dish に播種し、RPMI 1640 培地中で 48 時間培養する。SB を 0, 1, 3 mM の濃度で添加し、全 RNA を RNeasy Mini Kit (Qiagen 社) により抽出した。また SB 存在下・非存在下における VEGF family の転写を調節するシグナル伝達経路を検討するために、AP-1 阻害剤、AKT 阻害剤および mTOR 阻害剤を添加し、同様に全

RNA を抽出した。各サンプルから得られた全 RNA を Prime Script RT Reagent Kit (Takara Bioscience 社)により逆転写し、続いて VEGF family (VEGF-A, -B, -C, -D)、angiopoietin 2、platelet derived growth factor beta の特異プライマーと、SYBR Premix Ex Taq (Takara Bioscience 社)を用いて定量的 PCR を行った。

口腔癌細胞株を SB および各種阻害剤の存在条件下で培養した後に、cell lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH: 7.5), 10 mM NaCl, and 1% Triton X-100 supplemented with a 1/100 (v/v) protease inhibitor cocktail)により細胞を溶解させ、可溶分画を試料として、SDS-PAGE を行った。PVDF membrane にタンパクを転写させ、PVDF membrane blocking reagent (東洋紡) で blocking し、続いて一次抗体を反応させた (VEGF-A: Santa Cruz 社、VEGF-C: Cell Signaling 社)。HRP 標識された 2 次抗体を反応させた後に、免疫複合体を ECL plus (GE Lifescience 社)により蛍光発光させ、BioMax film (Kodak 社)を感光させた。

4. 研究成果

SB 刺激による VEGF family の mRNA およびタンパク発現量を検討したところ、VEGF-A 産生量はコントロール群と実験群に大きな差は検出されなかったが、VEGF-B、VEGF-C および VEGF-D では mRNA 発現量の減少が確認された。また血管誘導因子である angiopoietin-2 および platelet derived growth factor beta の発現量低下が見られた。

次いで、遺伝子転写因子である AP-1 (Fos と Jun のヘテロダイマー)阻害剤として AS601245 (1 - 5 mM)、AKT 阻害剤として Triciribine (1 - 10 mM)および mTOR 阻害剤として rapamycin (0.1 - 1 mM)を添加し、real time PCR 法ならびに Western blot 法により VEGF family をはじめとする各種の脈管新生誘導因子の産生量を検討した。

その結果、SB および各種阻害剤添加の条件下で、VEGF-A、-B および -C の mRNA 発現量の減少が確認された。以上の結果から SB による VEGF family 転写の抑制は、複数のシグナル経路により達成されると考えられた。

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)

[学会発表] (計 1 件)

- ① 松本直行, ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤が口腔癌細胞株の VEGF-A 転写調節シグナルに及ぼす影響. 第66回日本口腔科学会学術集会, 広島国際会議場 (広島) 2012 年 05 月 18 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本 直行 (MATSUMOTO NAOYUKI)
日本大学・歯学部・助教
研究者番号: 20386080

(2) 研究分担者

なし

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし