

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：42723

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24593041

研究課題名(和文) 口腔がんに対する新しい分子標的薬の臨床応用に向けた基礎的研究

研究課題名(英文) Basic research for therapeutic indication of new molecular target drug for oral carcinoma

研究代表者

藤原 久子 (Fujihara, Hisako)

鶴見大学短期大学部・歯科衛生科・准教授

研究者番号：80396746

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、分子標的薬として乳がんの治療に用いられているPARP阻害剤という薬剤の、口腔がんへの臨床応用の可能性について調べた。その結果、PARP阻害剤は低濃度単独投与では口腔がん由来細胞の細胞死への影響は殆ど認められなかったが、抗悪性腫瘍薬であるシスプラチンと併用すると、有意に細胞死が増強した。さらに、ヌードマウスに作製した腫瘍の増大抑制効果は、シスプラチン単独投与よりもPARP阻害剤を併用した方が有意に高かった。

研究成果の概要(英文)：In this report, PARP inhibitor, new therapeutic molecular target drug currently indicated for breast cancer, was analyzed for possible indication for oral cancer therapy. Single administration of low dose of PARP inhibitor on cells derived from oral carcinoma did not show significant cell death, however, combination of cisplatin and PARP inhibitor administration showed significant cell death compared to single administration of cisplatin and PARP inhibitor respectively. Moreover, administration of cisplatin and PARP inhibitor combination on tumors derived from oral carcinoma cells injected to nude-mice also showed significant reduction of tumor growth compared to single administration of cisplatin and PARP inhibitor.

研究分野：口腔外科

キーワード：口腔癌 分子標的薬

1. 研究開始当初の背景

これまでの研究と技術の研鑽の結果、現行のがん治療戦略である、放射線療法・化学療法・外科的療法の治療成績は向上し、生命予後の改善に大きく寄与している。しかし、未だがんに対する万能な治療法には成りえておらず、更なる治療法の発展に期待が寄せられている。3大治療戦略のうち、外科的療法はほぼ完成形に近いと考えられているが、化学療法・放射線療法については治療効果に個人差があることから、この効率化、もしくは画期的な新薬の開発にがん治療の新たな展開があると考えられるのが現実的である。そのような中で、がんの分子異常を標的とした分子標的薬の開発には目覚ましいものがあり、1990年代後半からリツキシマブ、イマチニブなどの分子標的治療薬が血液腫瘍で臨床導入されたのを皮切りに、固形腫瘍においても様々な薬剤の有効性が次々と示されている。

一方、PARP(ポリADP-リボース合成酵素)は、細胞内のNAD(ニコチンアミドジヌクレオチド)を利用して障害を受けたDNAを修復する酵素である。そのファミリー遺伝子の1つである*Parp-1*遺伝子は、遺伝子安定性や細胞死誘導、細胞間シグナル、DNA修復、テロメアの安定性や細胞増殖・分化などを介して、発がんやがん細胞の増殖に重要な役割を果たすことが報告されている(Nat Rev Mol Cell Biol. 2006;7(7):517-28.)。我々は、この*Parp-1*遺伝子ノックアウトES細胞やマウスの解析を通して、Parp活性の欠損によりアルキル化剤などの抗がん剤や放射線照射に対する感受性が上昇することを明らかにした(Mol Cell Biochem. 1999;193(1-2):149-52.)。また、PARP阻害剤を*BRCA-1/2*遺伝子変異乳がん細胞に単独投与した場合には、がん細胞の細胞死が誘導される(Nature 2005;454:917-921)。その結果、ヒトへの投与可能なPARP阻害剤が各製薬会社から開発され、現在、その薬効について臨床試験が行われている。

PARP阻害剤の臨床試験は、2つのコンセプトの元になされている。1つはPARP阻害剤単体投与の治療効果の検証、もう1つは放射線療法や化学療法の増強剤としての治療効果の検証で、現在各国で計79のPARP阻害剤の臨床試験がなされている。口腔がん治療へのPARP阻害剤応用については、口腔がん由来の細胞をマウスに移植して作製した腫瘍に対して放射線治療の効果が増強されたという報告がなされているが(Clin Cancer Res. 2010 1;16(3):898-911.)。抗がん剤との併用効果の検証や分子生物学的メカニズムの解析はなされておらず、その詳細は不明である。しかし、PARP阻害剤がDNA修復機構を阻害することにより、放射線や抗がん剤に対する

感受性を増強させることは判明しているため、「実際の口腔がん治療においてもPARP活性の阻害によって放射線・化学療法の治療効果が増強され、腫瘍の縮小効果が得られること」が期待される。

2. 研究の目的

本研究では、放射線照射や抗悪性腫瘍薬投与の際にPARP阻害剤を併用することによって、口腔がん細胞の細胞死における併用効果を検証すると共に、その分子メカニズムの検証を行う。それによって、口腔がん治療におけるPARP阻害剤の臨床導入の可能性を模索し、新しい口腔がん治療法の確立に貢献することを目指す。

3. 研究の方法

本研究は以下の3つの点について行い、細胞レベル並びに動物実験で各々検証した。

- (1) 口腔がん細胞株に対するPARP阻害剤の影響について
- (2) 口腔がん細胞株に対する抗悪性腫瘍薬とPARP阻害剤併用効果の検証
- (3) ノードマウスに口腔がん細胞を移植して腫瘍を作製し、その腫瘍に対する抗悪性腫瘍薬とPARP阻害剤併用による腫瘍増大抑制効果の検証ならびに全身的影響の比較検証

まず、(1)のPARP阻害剤の口腔がん細胞株への影響については、細胞増殖能への影響と細胞毒性試験によって検証した。増殖能については、口腔がん細胞(Ca9-22, SAS, HSC-2:全てRIKENより購入)3種に対して1μM AZDを添加した培養液と添加していない培養液でそれぞれ細胞培養し、毎日細胞数をカウントして比較検証した。

毒性については、細胞の生存率とMTT assayによる毒性試験を行って検証した。生存率は次のように調べた。まず3種類の口腔がん細胞(Ca9-22, SAS, HSC-2)に対して、PARP阻害剤(AZD2281とPJ34)を0~10μMの様々な濃度で投与し培養した。その後洗浄し、さらに約1週間培養した後に70%エタノール固定、クリスタルバイオレット染色し560nmの波長で吸光度を測定した。また、平行して細胞数のカウントも行った。MTT assay法による毒性試験は次のように行った。同じように、口腔がん細胞に対して様々な濃度のPARP阻害剤を投与して培養し、培養液の10分の1量のMTT液を加えて反応させたあと、0.1N無水イソプロパノールで色素を溶出し、560nmの波長で吸光度を測定した。

(2)の口腔がん細胞株に対する抗悪性腫瘍薬とPARP阻害剤併用効果の検証については、

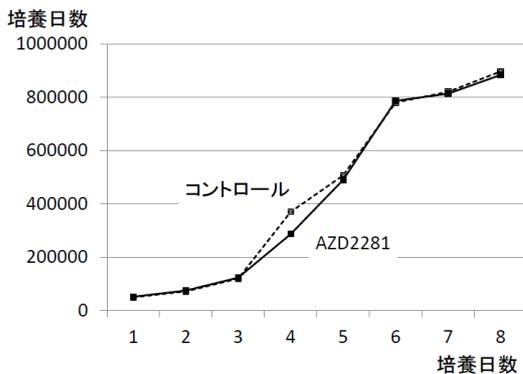
PARP 阻害剤の影響を調べたのと同じように、様々な濃度の PARP 阻害剤と抗悪性腫瘍薬のシスプラチンを口腔がん細胞に投与し、同じように細胞増殖能へ対する影響と MTT assay 法を用いた細胞毒性試験を行った。

(3)のマウスに口腔がん細胞を移植して作製した腫瘍への影響については、まず口腔がん細胞を 5×10^6 個をヌードマウス (Balb/c, nu-nu, 6週令、オス)の背部に移植すると2週間程度で腫瘍の形成が認められはじめた。直径が7mmを超えた時点から、抗悪性腫瘍薬であるシスプラチンとPARP阻害剤の投与を行った。シスプラチンのみ、PARP阻害剤のみ、両方投与、何も投与しない4群に分けて、腫瘍増大の抑制効果を経時的に観察した。一定期間薬剤を投与した後、マウスを屠殺、腫瘍の摘出を行うのと同時に血液採取と全身的な解剖を行った。さらに、摘出した腫瘍はホルマリン固定後パラフィン包埋し、プレパラートを作製して病理組織学的解析を行った。

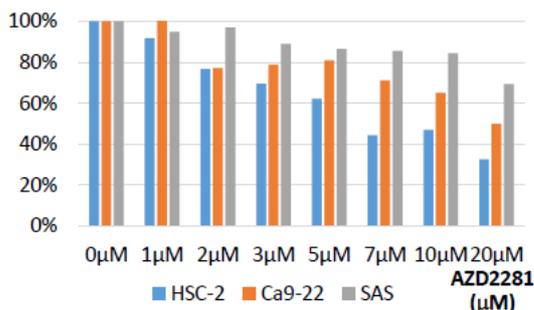
4. 研究成果

(1) 口腔がん細胞株に対するPARP阻害剤の影響について

まずPARP阻害剤であるAZD2281の、3種類の口腔がん細胞の細胞増殖能に対する影響を検証した。その結果、Ca9-22, SAS, HSC-2のいずれの細胞株においても、低濃度のAZD2281の投与では、投与していない細胞と比較して有意な増殖能の低下は認められなかった。

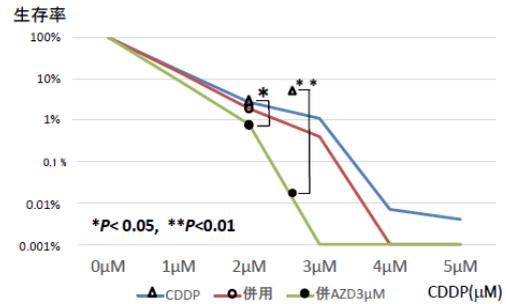


MTT assay による毒性試験の結果、低濃度のAZD2281では細胞毒性がないものの、10 μ M以上の濃度では全ての細胞で毒性が認められた。

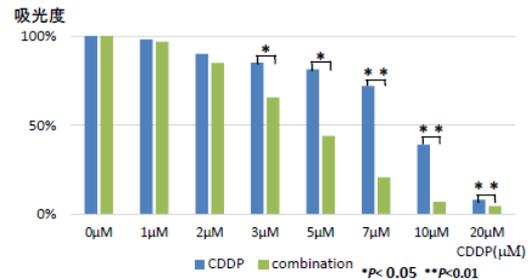


(2) 口腔がん細胞株に対する抗悪性腫瘍薬とPARP阻害剤併用効果の検証

様々な濃度の抗悪性腫瘍薬のシスプラチンとAZD2281を併用して、口腔がん細胞の増殖能への影響を調べたところ、3種類全ての細胞において1 μ MのシスプラチンとAZD2281の併用で有意に増殖能が低下することが分かった。



MTT assay による細胞毒性試験の結果、1種類の細胞がシスプラチンに対する抵抗性が高く、10 μ M以上の濃度でしか有意な細胞毒性が認められなかったが、いずれもAZD2281の併用によって有意に細胞毒性が増大することが分かった。



(3) マウスに口腔がん細胞を移植して作製した腫瘍に対する抗悪性腫瘍薬とPARP阻害剤併用による腫瘍増大抑制効果の検証ならびに全身的影響の比較検証

ヌードマウスに口腔がん細胞を移植して腫瘍形成させたところ、HSC-2の細胞のみ安定して腫瘍形成が認められたため、動物実験ではHSC-2で腫瘍形成させた。途中の脱落マウスを除き各群7匹ずつで解析を行った。薬剤投与開始時の腫瘍の大きさを100として、経時的な腫瘍の大きさを百分率に換算した結果、5回の薬剤投与の後、何も薬剤を投与していない群では713%、シスプラチン投与群では433%、AZDでは411%、併用群では288%であった。シスプラチン投与とAZD投与の間に有意差は認められなかったが、2種類の薬剤を併用すると、シスプラチン単独投与よりも腫瘍増大が有意に抑制され、併用効果が得られることが分かった。

腫瘍は更にプレパラートを作製して、病理組織学的に解析を行った。ヘマトキシリン染色を行い観察したところ、CDDP や AZD 投与群では、腫瘍部分のネクローシスによる空洞化が認められた。更に、2 種類の薬剤を併用投与した腫瘍では、空洞化範囲が拡大していたことから、腫瘍増大抑制効果の組織学的な裏づけデータが得られた。

また薬剤投与によるマウスの全身的な影響については全解剖による解析を行った。シスプラチンの影響は、腎臓と骨髄に出現しやすいと考えられているが、薬剤投与した3群において、特にコントロール群との有意差は認められなかった。

(現在、論文投稿準備中のため、一番重要な(3)のデータの作図は掲載を割愛した。)

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)

Tanaka Y, Yamada H, Saito T, Nakaoka K, Kumagai K, Fujihara H, Mishima K, Hamada Y. Solitary myofibroma of the mandible in an adult with magnetic resonance imaging and positron emission tomography findings: a case report. 査読有、World J Surg Oncol. 2014 28;12:69. doi: 10.1186/1477-7819-12-69.
Shirai H, Poetsch AR, Gunji A, Maeda D, Fujimori H, Fujihara H, Yoshida T, Ogino H, Masutani M. PARC dysfunction enhances DNA double strand break formation in S-phase after alkylation DNA damage and augments different cell death pathways. Cell Death & Disease. 査読有、2013 6(4):e656, doi: 10.1038/cddis.2013.133
Yamada H, Hamada Y, Fujihara H, Fukami K, Mishima K, Nakaoka K, Kumagai K, Imamura E. Solitary fibrous tumor of the buccal space resected in combination with coronoidectomy. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 査読有、2012 114(1):e9-e14, doi: 10.1016/j.tripleo.2011.07.044.

[学会発表](計 10 件)

安川仁章、藤原久子、岸悠太、山本那々美、山田浩之、川口浩司、里村一人、益谷美都子、濱田良樹、口腔がん由来細胞に対する化学療法におけるポリ ADP-リボース合成酵素 (PARP) 阻害剤の効果、第 33 回分子病理研究会、2014 年 7 月 25 日、宮城蔵王ロイヤルホテル(宮城県・刈田郡)
安川仁章、藤原久子、山田浩之、福岡愛

理、川口浩司、濱田良樹、耳下腺に発症した粘液脂肪腫の 1 例、第 197 回 口腔外科学会 関東支部学術集会、2014 年 6 月 7 日、自治医科大学(栃木県・下野市)
藤原久子、口腔癌治療における周術期管理 口腔ケアとその効率化への一提言、第 67 回日本口腔科学会、2014 年 5 月 7 - 9 日、京王プラザホテル(東京都・新宿区)

岸悠太、藤原久子、野崎中成、濱田良樹、益谷美都子、骨芽細胞への分化時におけるポリ ADP リボース重合酵素 (PARP) の関与、第 32 回分子病理学研究会、2013 年 7 月 20 日 - 21 日、竹林院群芳園(奈良県・吉野郡)

岩崎静乃、藤原久子、鈴木麻美、後藤哲人、中島敏文、緩和ケア病棟への新規入院患者における口腔ケア実態調査、第 10 回 日本口腔ケア学会学術集会、2013 年 6 月 22 日 - 23 日、九州大学医学部百年講堂(福岡県・福岡市)

藤原久子、岩崎静乃、鈴木麻美、後藤哲人、中島敏文、濱田良樹、相模原協同病院全職員の口腔ケア関連に関する意識調査、第 10 回 日本口腔ケア学会学術集会、2013 年 6 月 22 日 - 23 日、九州大学医学部百年講堂(福岡県・福岡市)

藤原久子、山田浩之、岸悠太、中岡一敏、川口浩司、濱田良樹、サルコイドーシスとの鑑別が困難なパラコクシジオイデス症の 1 例、第 195 回日本口腔外科学会関東支部学術集会、2013 年 6 月 1 日、千葉大学(千葉県・千葉市)

藤原久子、岩崎静乃、鈴木麻美、後藤哲人、中島敏文、濱田良樹、相模原協同病院全職員の口腔ケア関連に関する意識調査、第 67 回日本口腔科学会学術集会、2013 年 5 月 22 日 - 24 日、栃木県総合文化センター(栃木県・宇都宮市)

五味義法、藤原久子、山田浩之、高松朋矢、金井恵梨、圓谷郷、後藤哲人、堀内俊克、濱田良樹、診断に苦慮した腫瘍随伴性天疱瘡の 1 例、第 194 回 日本口腔外科学会関東支部学術集会、2012 年 12 月 8 日、日本大学医学部(東京都・板橋区)

藤原久子、ADR 報告-歯科相談における雑感、第 42 回 医事紛争研究会例会、2012 年 6 月 21 日、千葉大学(千葉県・千葉市)

[図書](計 2 件)

藤原久子、ヒョーロン社、一般臨床医のための歯科小手術スキルアップ 第 1 章 歯科小手術のための基礎知識 歯科小手術にあたって注意すべき疾病および参考にすべきデータ -、2014、168
濱田良樹、藤原久子 他、クインテッセンス出版、口腔外科治療 失敗回避のためのポイント 47 - 口腔外科とは何か、ど

う治療するのか 第2部 Basic
operation edition 6 切開・剥離・骨削、
2012、260

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤原 久子 (FUJIHARA Hisako)
鶴見大学短期大学部・歯科衛生科・准教授
研究者番号：80396746

(2) 研究分担者

山田 浩之 (YAMADA Hiroyuki)
鶴見大学・歯学部・講師
研究者番号：90267542

堀内 俊克 (HORIUCHI Toshikatsu)
鶴見大学・歯学部・非常勤講師
研究者番号：90454165

(3) 連携研究者

益谷 美都子 (MASUTANI Mitsuko)
国立がん研究センター研究所・ゲノム安定
性研究分野・分野長
研究者番号：60238904