

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792167

研究課題名(和文) 微小環境下の口腔癌に対して有効な化学療法の確立

研究課題名(英文) Establishment of the chemotherapy that is effective for oral cancer under the microenvironment

研究代表者

遠藤 学 (ENDO, MANABU)

東北大学・歯学研究科(研究院)・大学院非常勤講師

研究者番号：40613998

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：口腔癌は強い局所浸潤能や頸部リンパ節転移能を有し、現在のところ口腔癌の転移を抑制する有効な化学療法は確立されていない。本研究の目的は血管新生抑制効果が期待されるセレンウム化合物を用いて、従来の化学療法では対応できなかった口腔癌の血管新生・転移の抑制および低酸素環境下での腫瘍抑制を目指すことを目的とした。口腔癌細胞株においてセレンウム化合物selenite処理により有意な増殖抑制、アポトーシス誘導効果が認められた。また、癌血管新生、癌転移に関わる分子の抑制も認められた。このことからSeleniteはアポトーシス誘導能の他に癌血管新生・転移抑制能を有していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The oral cancer has strong local infiltration ability and cervical lymph node metastaticity, and the effective chemotherapy to inhibit metastasis of the oral cancer is not established for the present. The purpose of this study was intended that we aimed at the suppression of neovascularisation / the metastasis of the oral cancer which we were not able to cope with and the tumor suppression under the anoxia environment by the conventional chemotherapy using the selenium compound that neovascularisation depression effect was expected. Significant growth suppression, an apoptotic instruction effect were found by selenium compound selenite treatment in oral cancer cell line. Also, the molecular suppression about cancer neovascularisation, cancer metastasis was found, too. Therefore, it was suggested that Selenite had cancer neovascularisation / metastasis control ability other than apoptotic inducibility

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯科薬理学

キーワード：歯学

1. 研究開始当初の背景

口腔癌の根治をめざす上で癌の転移、再発は最大の障害であり、患者の予後を左右する重大なリスクファクターである。癌の増殖領域は低酸素、低栄養、低血流、オートファジー環境下であり、このような癌環境は癌の治療にとって大きなバリアーとなっている。特に、低酸素環境下での癌細胞の行動を理解することは、より良い癌治療の開発に必須であり、口腔癌ではこれまで精力的に研究されなかった分野であった。

人間の体内にできる癌は慢性低酸素状態にあることが知られている。血管から運ばれる酸素が少なくなったり、癌細胞が消費したりすることによって癌環境は低酸素になる。驚くべきことに、癌はほとんど酸素のない状態でも生存している。低酸素は正常細胞が増殖する上では不利な条件でも、低酸素で生き延びる能力を変異の蓄積によって獲得した癌細胞が低酸素下で優勢になる。低酸素環境下では癌は新しい血管を作って酸素供給を増やす。癌細胞による血管新生・転移形成のステップには、増殖因子、血管新生因子、浸潤関連分子、接着分子などが重要な役割を演じている。血管新生に関わる主な因子として VEGF (vascular endothelial growth factor)、bFGF (basic fibroblast growth factor)、MMPs (matrix metalloproteinases) などが知られている。なかでも、VEGFは最も強力な血管新生因子であり、血管内皮細胞の遊走・増殖・管腔形成の促進や、血管透過性の亢進を誘導し、口腔癌をはじめとする多くの固形癌の血管新生において重要な役割を担っている。このように、癌細胞の低酸素応答は浸潤・転移、血管新生といった癌の悪性循環と密接に関係している。

申請者は、口腔癌の局所再発や頸部リンパ節転移をきたした予後不良の症例における再発・転移問題の重大さを痛感していた。口腔癌の主要な治療法は外科手術療法と放射線療法であるが、癌のリンパ節転移を予防するために術前・術後に化学療法が併用される。口腔癌に対する化学療法として、現在、シスプラチン、カルボプラチン、5-FU、パクリタキセル、ドセタキセル等、様々な抗癌剤が用いられ、申請者らはこれらの有用性を報

告してきた。しかし、その一方で、これら抗癌剤の口腔癌細胞に対する血管新生や微小転移に及ぼす影響については未知であった。癌の浸潤・転移の予防を期待して化学療法を併用する以上、抗癌剤が低酸素領域で口腔癌の血管新生や転移に及ぼす影響の解明は必須であり、口腔癌治療に併用する化学療法の意義を再検討する必要があると考えた。場合によっては、新たな抗癌剤の導入を検討しなければならない。本研究では、血管新生抑制効果が期待される有機セレンウム化合物を使い、従来の化学療法では対応できなかった口腔癌の血管新生・転移の抑制を目指した。

低酸素状態では低酸素転写因子 (HIF-1) が誘導され、HIF-1 の過剰発現は癌増殖と化学療法剤に対する耐性と相関することが分かっている。口腔癌は強い局所浸潤能や頸部リンパ節転移能を有し、臨床上重大な予後不良の疾患である。現在のところ口腔癌の転移を抑制する有効な化学療法は確立されていない。この原因として低酸素領域でも抗癌剤の効果が本当に発揮されるのかどうかの疑問があげられた。申請者はこれらを克服しなければならない課題であると考え、従来の抗癌剤とともに、現在最低酸素領域で口腔癌の血管新生や転移に及ぼす影響を解析することを目指した本研究を思い立った。

2. 研究の目的

低酸素を含む微小環境条件下で再度、アポトーシスおよびオートファジー誘導能を中心に吟味し、これらの環境下での克服すべき問題点を指摘し、口腔癌の化学療法を改善することである。同時に、新たに血管新生抑制効果が期待されるセレンウム化合物を用いて、従来の化学療法では対応できなかった口腔癌の血管新生・転移の抑制をめざす初の試みである。

3. 研究の方法

(1) In vitro における血管新生抑制効果の評価

口腔扁平上皮癌細胞株 (HSC-2, -3, -4) と舌癌由来細胞株 (SAS) を用いて、セレンウム化合物 (Selenite, Selenate, Selenomethionin, Se-methylselenocysteine) による VEGF、bFGF などの血管新生因子の産生抑制を ELISA、ウエスタン・ブロット法で解析する。セレンウム化合物存在下におけるアポトーシス誘導効果を観察し、効果のみられる至適条件 (各種薬剤濃度、処理時間) を検討する。血管内皮細胞と癌細胞の co-culture

により invitro での血管新生モデルを確立し、セレンウム化合物による血管内皮細胞に対する血管新生抑制効果を検討した。

(2)低酸素下でセレンウム化合物が細胞の生存に与える影響についての検討

癌細胞株をさまざまな酸素分圧条件 (O₂ 分圧 1-10%または、様々な濃度の CoCl₂ 処理) 低酸素曝露時間、短時間繰り返しまたは持続曝露下にて継代培養し、細胞増殖の変化を観察する。低酸素下細胞に各濃度のセレンウム化合物を投与し、24、48、72 時間後に細胞を回収する。その後細胞の一部を、TUNEL 法を用いて染色し、FACSCalibur でアポトーシス細胞を測定した。

(3)HIF-1活性の測定

DNA結合型HIF-1複合体の精製に用いるため、biotin標識3×HRE (hypoxia response element) を調製する鋳型 plasmid vector (pGEM-3×HRE) を作製する。HSC-3、HepG2、293T、MCF-7の各細胞株を低酸素条件下で培養し、それらの核抽出液よりbiotin標識3×HREおよびavidin処理磁気ビーズを用いてHIF-1複合体を精製し、低酸素の時間経過による複合体の変動について検討した。

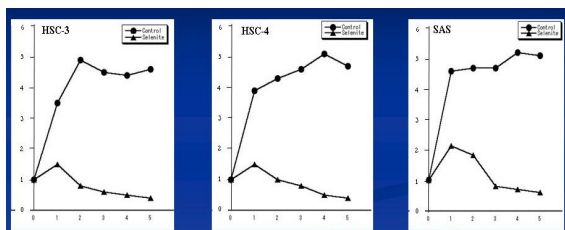
(4)HIF-1関連タンパクおよびHIF-1 シグナル経路の解析

低酸素培養口腔癌細胞に抗癌剤 (セレンウム化合物、シスプラチン) 及びシグナル伝達阻害剤を投与し、回収したサンプルを 2 μg/μl の濃度に調整する。その後、10% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、PVDF 膜へ転写し、各種抗体を用いてウェスタン・ブロット法を行う。各バンドから半定量的に各タンパクの発現量の変化について解析を行った。

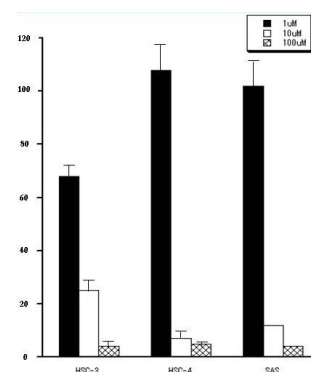
4. 研究成果

(1) selenite の増殖抑制効果の解析 (MT

T 法)

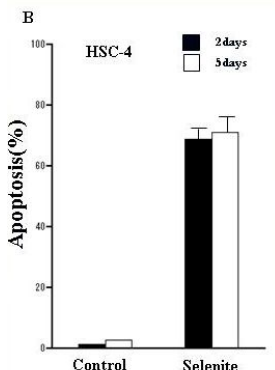
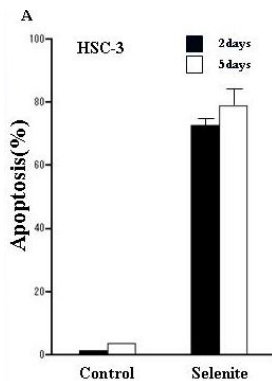


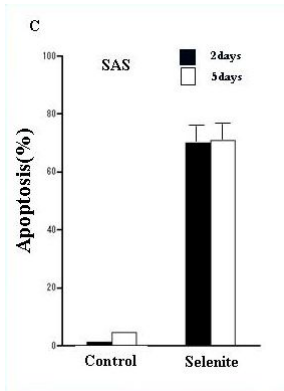
口腔癌細胞株 (HSC-3, -4, SAS) において selenite 処理により時間依存的に増殖抑制が認められた。



口腔癌細胞株 (HSC-3, -4, SAS) において selenite 処理により濃度依存的に増殖抑制が認められた。

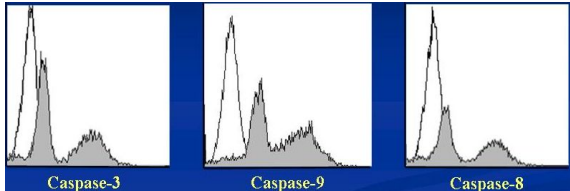
(2) selenite のアポトーシス誘導の解析 (TUNEL assay)





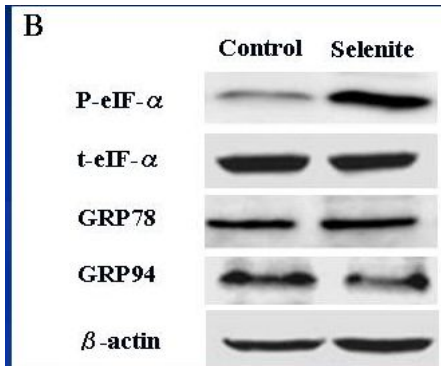
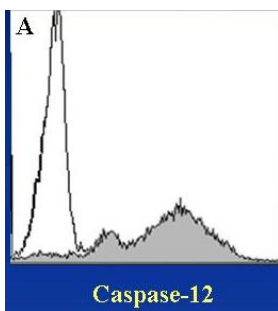
口腔癌細胞株 (HSC-3, -4, SAS) において selenite 処理によりアポトーシス誘導が認められた。
(2日処理、5日処理で有意差は認められなかった)

(3) Selenite によるアポトーシスの経路解析 caspase 群の解析



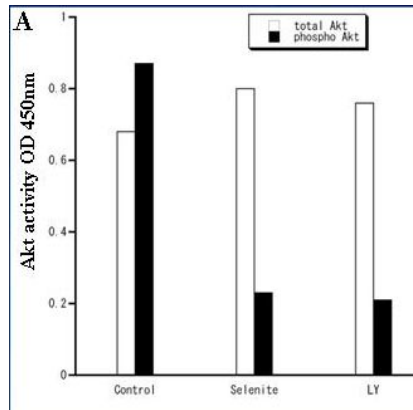
HSC-3 において Selenite 処理により Caspase-3, -9, -8 の活性化が認められ、Selenite が誘導するアポトーシスに対してミトコンドリア経路、デスレセプター経路の関与が示唆された。

小胞体ストレスの解析

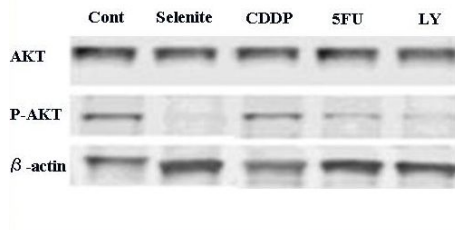


HSC-3 において Selenite 処理により Caspase-12 の活性化、小胞体ストレスマーカーである eIF-2 の活性化が認められ Selenite が誘導するアポトーシスへの小胞体ストレス経路の関与が示唆された。

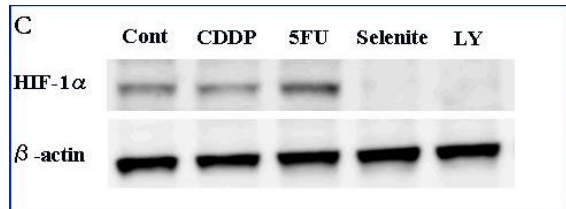
(4) Selenite の癌血管新生抑制効果の解析 PI3K/Akt 経路の解析



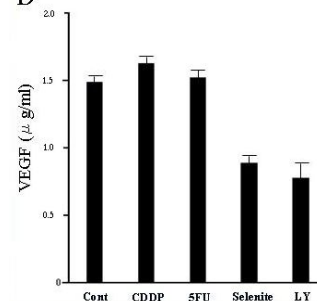
B



HIF-1、VEGF の解析



D



PI3K/Akt は腫瘍細胞の増殖において重要な役割を持つ一方、血管新生因子との関わりも報告されている。

HSC-3 において Selenite 処理により、既知の抗癌剤では認められなかった Akt の活性化抑制、HIF-1 (VEGF の転写因子) の抑制、VEGF の抑制が認められた。また、PI3K/Akt 阻害剤

により VEGF の抑制が認められた。このことから、Selenite は Akt を抑制することにより、HIF-1 が抑制され、それに伴い VEGF 産生が抑制されたと考察された。

Conclusion

Slenite は口腔癌細胞株において、増殖抑制効果、アポトーシス誘導効果を示し、そのメカニズムとしてミトコンドリア経路、デスレセプター経路、小胞体ストレス経路の関与が示唆された。また、HIF-1 癌血管新生の主要な因子である VEGF の産生抑制も認められた。今後、癌化学療法においてセレンウム化合物による転移抑制や抗癌剤耐性克服が期待される。

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)

遠藤学、篠原文明、高橋哲、長谷川博
セレンウム化合物による癌血管新生、抗腫瘍効果の解析
第 68 回日本口腔科学会総会学術集会
2014 年 5 月 8 日、9 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

遠藤 学 (ENDO MANABU)
東北大学・大学院歯学研究科・大学院
非常勤講師

研究者番号：40613998