

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792193

研究課題名(和文) 口腔扁平上皮癌に対するAMPK活性化薬剤の抗腫瘍効果に関する実験的研究

研究課題名(英文) Experimental Study on antitumor effect of AMPK activated reagent on oral squamous cell carcinoma

研究代表者

加藤 広禄 (Kato, Koroku)

金沢大学・大学病院・講師

研究者番号：30444201

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)：AMPK活性化薬剤のアポトーシス誘導を検討した結果、投与24時間後には顕著にアポトーシスが起っていた。この薬剤の細胞増殖因子の経時的なmRNA発現を確認した結果、mTORならびにAkt1、Akt3の発現減弱を認めた。また、p53ならびにp21の発現が増加していた。タンパク質発現の変動を検討した結果、Phospho-mTORは経時的に発現量が減少し、p53ならびにp21の発現増加を認めた。浸潤に対する薬剤の効果を検討した結果、投与群では有意に浸潤抑制効果が確認できた。MMPsの発現を検討した結果、pro-MMP-2の発現減弱を認めた。さらにARK5の経時的mRNA発現減弱を認めた。

研究成果の概要(英文)：Apoptosis induction with AMPK activating agents was examined using an apoptosis detection kit, demonstrating marked apoptosis induction at 24 hours after administration. The mRNA expressions of cell growth factors were examined with AMPK activating agents, demonstrating the decreased expressions of mTOR and Akt1, Akt3 and the increased expressions of p53 and p21. Their protein expressions were also examined, demonstrating the decreased expression of phospho-mTOR over time and the increased expressions of p53 and p21.

The effects of AMPK activating agents on invasion were examined, demonstrating significant inhibitory effects on invasion in treated groups. The expressions of MMPs were examined, demonstrating the decreased expression of pro-MMP-2. Furthermore, the mRNA expression of ARK5 decreased over time.

研究分野：口腔癌

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：癌 細胞・組織 AMPK アポトーシス 浸潤

## 1. 研究開始当初の背景

癌細胞は、アポトーシスという機能から逸脱することにより、無秩序な細胞増殖を獲得して腫瘍塊を形成し、さらに周囲組織への浸潤能の獲得とそれに引き続く転移形成により、臨床において治療に難渋する場合が多い。そのため、癌の増殖とそれに関連する遺伝子の異常を研究することは、癌の本態解明と治療法の開発にとって重要であると考えられる。細胞周期を司る遺伝子の中でも癌抑制遺伝子である p53 遺伝子は現在でもなお注目され続ける遺伝子であり、その変異の存在を検索することが腫瘍の進展や予後を推定する指標の一つとされている。また、p53 依存性アポトーシスを誘導する際に細胞内アポトーシス制御因子として Bcl-2 ファミリータンパク質が働いており、細胞外からのアポトーシス制御はこれらのタンパク質を量的、質的に調節することにより行われているとされている。研究代表者は、これまでに口腔扁平上皮癌の生検組織における浸潤先進部での p53 ならびに p53 関連タンパクであり細胞増殖因子である p21 や PCNA の発現を免疫組織化学的に検出し、臨床経過と比較検討することにより、p53 ならびに p53 関連タンパク発現と予後との関係を見だし、予後想定因子になりうるとの研究結果を得た (Kato K, et al. Oral Pathol Med, 2011. Kato K, et al. Pathol Oncol Res, 2008. 加藤広祿 . 十全医学会誌 ,2003 .)。さらに Bcl-2 ファミリータンパク質の発現が臨床病理学的に予後と相関することを確認している (Kato K, et al. Oral Pathol Med, 2008)。近年、多領域の癌に対し遺伝子治療が行われているが、そのターゲット遺伝子の多くはこの p53 遺伝子である。p53 遺伝子変異のある頭頸部癌においても遺伝子治療の臨床治験が行われることは予想されているが、現在の手法ではすべての癌細胞に遺伝子を組み込むことは不可能であり、また転移した部位には遺伝子を導入できないこともあり、未だ臨

床応用の段階には達していないのが現状である。

一方、現在の癌治療における抗癌剤治療の役割は大きくなり、治療により腫瘍の縮小もしくは消失をみることもあるが、治療効果が表れず、治療継続が困難となる場合もある。そこで、可及的に正常細胞に障害を与えず、癌細胞特異的分子生物学的特性を有した腫瘍細胞に効果を発揮する薬剤として分子標的薬が開発され (図 1) 現在実用化されている。癌増殖因子である EGF receptor や VEGF、VEGF receptor をターゲットとした分子標的薬は非小細胞肺癌、大腸がん、腎細胞がんに対し使用されて、有効性を認めている。また、HER2 をターゲットとした分子標的薬は HER2 陽性乳がんの標準薬として臨床の場で活躍しており、CD20 をターゲットとした分子標的薬は B 細胞性非ホジキンリンパ腫に有効とされている。その一つに AMP-activated protein kinase (AMPK) 下流因子の 1 つである mTOR を阻害する薬剤 (mTOR 阻害薬 ; エベロリムス) による分子標的治療が臨床試験の段階ではあるが実施されており、再発腎細胞癌や治療抵抗性転移性乳癌に対して良好な成績を得ている。しかしその一方で、抗癌剤にて出現する副作用とは異なった副作用の出現によりその対応に苦慮することも多い。さらに口腔扁平上皮癌に対する分子標的薬の開発は他領域と比べ遅れており、今後の研究が待たれている。

近年において、糖尿病治療薬として使用されている AMPK 活性化薬剤に関して、同薬物投与患者の癌発生が有意に抑制されていたとの報告がされるようになり (Libby G et al. Diabetes Care, 2009. Currie CJ et al. Diabetologia. 2009.)、この薬剤の癌発生抑制作用が示唆されるようになった。現在、AMPK 活性化薬剤を用いた研究はあらゆる癌腫で行われており、有意義な結果が報告されている (Vakana E, et al. J Cell Biochem. 2011)。

研究代表者のこれまでの研究において、浸潤性の異なる口腔扁平上皮癌細胞に対する AMPK 活性化薬剤である AICAR の濃度依存的、時間依存的細胞増殖抑制効果を確認している。また、その際 p53 経路ならびに Bcl-2 ファミリーのタンパク質発現の変化を認め、それによる細胞周期停止やアポトーシス誘導が細胞増殖抑制のメカニズムとなっていることが示唆された(加藤広祿 .日本口腔組織培養学会誌 , 2010 .)。

## 2. 研究の目的

口腔扁平上皮癌においては、深部組織への浸潤像が癌の悪性度と密接な関係があるとする報告が多くみられ、びまん性に浸潤する口腔扁平上皮癌の局所ならびに転移制御の困難さは癌治療担当者を悩ませており、集学的治療が望まれている。

今回の研究では、びまん性に浸潤する浸潤様式 4D 型由来細胞株である HOC313 細胞を用い、高浸潤性口腔扁平上皮癌に対する AMPK 活性化薬剤によるアポトーシス制御因子ならびに増殖因子の変動を調査し、AMPK 活性化薬剤の増殖抑制ならびにアポトーシス誘導の機序を解明できると考えた。また、AMPK 活性化薬剤の口腔扁平上皮癌細胞の浸潤に与える影響についても検討した。これにより治療困難な高浸潤性口腔扁平上皮癌に対する集学的な治療法のひとつとなり得りうるのではないかと考えた。

## 3. 研究の方法

### 口腔扁平上皮癌由来細胞株

口腔扁平上皮癌罹患患者の転移リンパ節より樹立した細胞株を使用する。口腔扁平上皮癌において浸潤様式 4D 型由来細胞株である HOC313 を使用した。この細胞株を FBS 添加 E-MEM 培地にて培養し、著しく増殖能を得た状態のものを実験に供した。

### 使用薬剤

AMPK 活性化薬剤である AICAR (Sigma-Aldrich) を実験に供した。

### アポトーシス検出

Apoptosis detection kit ( ) を用い、AMPK 活性化薬剤の口腔扁平上皮癌細胞に対する経時的なアポトーシス誘導能を検討した。

### RT-PCR 法

上記の細胞株に一定濃度の AMPK 活性化薬剤を接触させ、接触した時間毎(1、2、4、8 時間)に RNeasy Kit (QIAGEN) を使用し、total RNA を抽出した。その total RNA 中において、細胞増殖に関連する AMPK $\alpha$ 、mTOR、Akt1、Akt3、p53、p21、PCNA の計 7 種類ならびに AMPK 関連因子であり MMP を介して浸潤に関与しているとされている ARK5 の mRNA の発現を検出した。

### Western Blotting 法

アポトーシス関連タンパクならびに細胞増殖因子の発現を検討する。検討する因子としては mTOR、phospho-mTOR、p53、p21、PCNA、の計 5 種類とした。

### Invasion assay 法

各細胞株に対する AMPK 活性化薬剤の浸潤抑制効果を検討するために Invasion assay を行った。BD バイオコートマテリアルインベーションチャンパー (BD Bioscience) を用い、コラーゲンゲル上に各細胞株の細胞を一定数播種し、一晚培養。翌日より指摘濃度に調整した AMPK 活性化薬剤混濁培養液群と通常の培養液群との両群で 24 時間培養し、光学顕微鏡にてメンブレン下面の細胞を浸潤細胞とし、細胞数を計測する。これにより各細胞の浸潤率の変化を計測した。

### ゼラチンゼイモグラフィー

MMPs 発現の変化を検討するためゼラチンゼイモグラフィーを行った。細胞培養液中に含まれており、浸潤に関わっている

とされる MMP-2 や潜在型である pro-MMP-2、pro-MMP-9 の発現変化を検討した。

#### 4. 研究成果

Apoptosis detection kitを用いてアポトーシス誘導能を検討した結果、投与24時間後には顕著にアポトーシスが起り、48時間後には多くの癌細胞がアポトーシスに陥っていることが確認できた。

また、AMPK活性化薬剤の細胞増殖に関する因子の経時的なmRNA発現を確認するため RT-PCRの結果、Akt/mTOR経路においては、mTOR ならびにAkt1、Akt3のmRNAの経時的な発現減弱を認めた。また、アポトーシスに関連しているp53/p21経路においては、p53ならびにp21のmRNAの発現が経時的に促進していた。さらに、Western Blot法を用いたタンパク質発現の変動を検討した結果、mTORは変化が無いものの、Phospho-mTORは経時的に発現量が減少した。さらに、経時的なp53ならびにp21のタンパク質発現増加を認めた。

浸潤に対する AMPK 活性化薬剤の効果を Invasion assay 法にて検討した結果、AICAR 投与群では有意に癌浸潤抑制効果が確認できた。浸潤に関係しているとされる MMPs の発現をゼラチンザイモグラフィにて検討した結果、pro-MMP-2 の発現減弱を認めた。さらに ARK5 の経時的 mRNA 発現減弱を認めた。

以上の結果より、AMPK 活性化薬剤である AICAR の細胞増殖抑制効果ならびに浸潤抑制効果が確認され、今後の臨床における癌治療に対して期待できる薬剤であることが示唆された。

#### 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 2 件)

Yoshizawa K, Nozaki S, Kato A, Hirai M, Yanase M, Yoshimoto T, Kimura I, Sugiura S, Okamune A, Kitahara H, Noguchi N, Kato K, Ueki K, Kawashiri S.: Loss of claudin-7 is a negative factor for invasion and metastasis in oral squamous cell carcinoma. *Oncology Reports* 29, 445-450, 2013. 査読有

加藤広祿、北原寛子、吉澤邦夫、川尻秀一：AMPK 活性化薬剤による口腔扁平上皮癌細胞の抗腫瘍効果メカニズムの解明．日本口腔組織培養学会誌 22(1) 25-26, 2012. 査読無

〔学会発表〕(計 8 件)

吉本泰輔、北原寛子、吉澤邦夫、加藤広祿、川尻 秀一

Paxillin による MT1-MMP 活性制御機構についての検討

日本口腔組織培養学会 設立 50 周年記念学術大会・総会

2013 年 11 月 23 日～ 2013 年 11 月 24 日

日本歯科大学生命歯学部 九段ホール(東京)

加藤広祿、木村依世、柳瀬瑞希、杉浦史郎、岡宗絢子、北原寛子、野口夏代、吉澤邦夫、中村博幸、川尻秀一

口腔扁平上皮癌の浸潤先進部における Caveolin-1 発現に関する免疫組織化学的検討

第 58 回 日本口腔外科学会総会・学術大会

2013 年 10 月 11 日～ 2013 年 10 月 13 日

福岡国際会議場(福岡)

吉澤邦夫、北原寛子、野口夏代、加藤広祿、中村博幸、川尻秀一。

口腔扁平上皮がん浸潤様式 4D 型におけるがん悪性化に関わる各遺伝子発現についての検討。

第 37 回 日本頭頸部癌学会

2013 年 06 月 13 日～2013 年 06 月 14 日 京王プラザホテル(東京)

柳瀬瑞希、加藤広禄、野口夏代、吉澤邦夫、  
北原寛子、川尻秀一  
口腔扁平上皮癌における VEGF-A 及び  
VEGF-C 発現の免疫組織化学的検討  
第 67 回日本口腔科学会学術集会  
2013 年 5 月 22 日～2013 年 5 月 24 日  
栃木県総合文化センター (栃木)

Kato K, Noguchi N, Kitahara H, Kawashiri S.  
The AMPK activator AICAR inhibits the  
proliferation in oral squamous cell carcinoma.  
Ninth AACR-Japanese Cancer Association Joint  
Conference: Breakthroughs in Basic and  
Translational Cancer Research□  
2013 年 2 月 21 日～2013 年 2 月 25 日□  
Hyatt Regency Maui□(Maui), Hawaii

加藤広禄、野口夏代、吉澤邦夫、北原寛子、  
岡宗絢子、杉浦史郎、木村依世、八木瑞希、  
加藤阿希、平井真理子、川尻秀一  
AMPK 活性化薬剤による口腔扁平上皮癌細  
胞の抗腫瘍効果の検討  
第 57 回 日本口腔外科学会総会・学術大会  
2012 年 10 月 19 日～ 2012 年 10 月 21 日  
パシフィコ横浜 (神奈川)

加藤広禄、吉澤邦夫、北原寛子、川尻秀一  
AMPK 活性化薬剤による口腔扁平上皮癌細  
胞の抗腫瘍メカニズムの検討  
第 49 回 日本口腔組織培養学会  
2012 年 10 月 19 日～ 2012 年 10 月 21 日  
広島大学 (広島)

Yoshizawa K, Sugiura S, Okamune A,  
Kitahara H, Noguchi N, Kato K, Kawashiri S.  
Claudin-7 expression as a prognostic factor  
correlates with mode of invasion in oral  
squamous cell carcinoma.  
17th World congress on advances in oncology and

15th International symposium on molecular  
medicine.

2012 年 10 月 11 日～2012 年 10 月 13 日  
Creta Maris (Creta), Greece

#### 6.研究組織

##### (1)研究代表者

加藤 広禄(KATO KOROKU)  
金沢大学・大学病院・講師  
研究者番号:30444201

##### (2)研究分担者

該当なし

##### (3)連携研究者

該当なし