

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 18 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：24792195

研究課題名(和文) 口腔扁平上皮癌の浸潤・転移に対する血管新生阻害剤および線維芽細胞増殖抑制剤の効果

研究課題名(英文) Effects of angiogenesis inhibitor and fibroblast growth inhibitor on invasion and metastasis of oral squamous cell carcinoma.

研究代表者

野口 夏代 (NOGUCHI, NATSUYO)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：90547176

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円、(間接経費) 720,000円

研究成果の概要(和文)：口腔扁平上皮癌の臨床での浸潤および転移を忠実に再現できるマウス正所性移植モデルを用いて、抗癌剤と線維芽細胞増殖抑制剤、血管新生阻害剤の効果を検討した。癌細胞は高悪性度であるヒト口腔扁平上皮癌由来細胞株であるOLC-01細胞とOSC-19細胞を使用しヌードマウスの舌に移植した。抗癌剤はシスプラチンを、線維芽細胞増殖抑制剤はトラニラストを、血管新生阻害剤はアバスタチンを用いて、浸潤と転移の阻止効果を調べた。その結果、トラニラスト+シスプラチン併用群に腫瘍の大きさ、結合組織量、癌間質線維芽細胞の変化にそれぞれ効果を認めた。アバスタチン投与群では有意にリンパ節転移抑制、血管新生抑制効果が認められた。

研究成果の概要(英文)：Using an orthotopic implantation mice model in which the invasion and metastasis of oral cancer can be reproduced, we investigated the inhibitory effects of anticancer agent and fibroblast growth inhibitor and antiangiogenic agent on invasion and metastasis. A highly invasive and metastatic human oral squamous cell carcinoma cell line, OLC-01, OSC-19 was implanted into the tongue of nude mice, and cisplatin or tranilast or avastin were administered to the mice after the implantation. The effects of each drug on cancer invasion and metastasis were investigated. Tumor size and stroma collagen fiber content were significantly reduced in combination group of cisplatin and tranilast. And tumor stroma were changed characteristic in combination group. Lymph node metastasis and vascularization were significantly reduced in avastin group.

The use of anticancer agent and fibroblast growth inhibitor and antiangiogenic agent considering these effects may be clinically very useful.

研究分野：臨床腫瘍学

科研費の分科・細目：外科系歯学

キーワード：口腔扁平上皮癌 増殖抑制 線維芽細胞増殖抑制剤 シスプラチン 血管新生阻害剤 浸潤 転移

### 1. 研究開始当初の背景

当講座の山本は、1983年に新しい浸潤様式分類を発表 (Yamamoto E. et al.: Cancer 51: 2175-2180, 1983.) して以来、口腔癌の浸潤像と転移や予後との関連性についての研究を行ってきた。その結果、臨床病理学的には浸潤像が転移や予後と最も相関する因子であることが明らかになり、浸潤機序の解明が治療成績の向上につながるものと確信し以後は基礎的研究を併せて行っている。浸潤機序を解明するには再現性のある実験モデルを用いた研究が必須である。しかし、口腔領域ではそのモデルに乏しく、忠実に生体での現象を再現できるものはなかった。そこで、当講座の川尻は、ヌードマウスの口腔内に口腔癌を移植する正所性移植法を用いた *in vivo* の浸潤・転移モデルを作製したところ、このモデルにおいては臨床における浸潤や転移の病態を忠実に再現できることが判明した (Eur J Cancer, Oral Oncology 31B(4): 216-221, 1996)。本研究計画においては、通常の臨床で用いている抗癌剤および最近臨床応用が期待される線維芽細胞増殖抑制剤が口腔癌の増殖、浸潤や転移を抑制する効果を有するか否か、この自然転移モデルを用いて検討する。

### 2. 研究の目的

臨床において抗癌剤を使用する目的は「癌を小さくする」ことである。本研究の目的は抗癌剤の口腔癌に対する増殖抑制効果のみならず、浸潤や転移に対する効果についても検討することである。また近年、癌間質線維芽細胞の病理形態像の検討により、癌間質量や線維芽細胞増殖性の高さが患者予後と強く相関し、癌間質線維芽細胞の存在様式は癌悪性度と強く相関している。そして一部の悪性腫瘍には分子標的薬が使用されるようになって抗癌剤と併用にてかなりの効果が期待される。腫瘍間質の反応の違いにおいては線維芽細胞増殖抑制剤を、腫瘍血管新生については血管新生阻害剤を使用し検討を行う。

抗癌剤、線維芽細胞増殖抑制剤による浸潤・転移に対する効果、血管新生阻害剤による抗腫瘍効果

多くの口腔癌患者の治療には抗癌剤が使用され、その臨床上的目的は腫瘍の縮小である。また、抗癌剤効果判定は腫瘍の大きさで行っているため、抗癌剤の臨床での効果や *in vivo* の実験での効果は腫瘍の縮小率で検討されたものが多く、癌の浸潤や転移に対する効果を検討したものはほとんどない。しかし、悪性腫瘍の治療を行う際に問題となるのは局所での増殖よりはむしろ周囲組織への浸潤や他臓器への転移である。特に転移の有無は癌患者の予後を左右する最も重要な因子であり、治療の成否は転移巣を制御し得るか否かが深く関与している。化学療法を行う上で浸潤や転移に対する効果を知ることは非常に重要である。なぜならたとえ腫瘍の縮小

効果がなくとも浸潤や転移を抑制する効果があれば化学療法を行う意義があるからである。

浸潤や転移の研究を行う際にはそれを再現できるモデルが必要であるが、われわれの開発したモデルは臨床での浸潤・転移の様相を忠実に再現することが可能である。本モデルを用いた浸潤ならびに転移の機序に関する研究の成果の一部はすでに報告したが、その結果、口腔癌細胞をヌードマウスの背部皮下に移植しても浸潤像を再現することはできないが、舌または口底に移植した場合、移植癌細胞数を少なくすることで、浸潤像を再現できることを報告した。本研究計画においてはこの同所性移植モデルを用い、口腔癌に対する抗癌剤の浸潤や転移に対する効果を検討する。抗癌剤は臨床で最もよく頻用されるシスプラチンを使用する。また、腫瘍の縮小効果、浸潤様式のダウングレード、リンパ節転移抑制効果、抗癌剤の組織学的抗腫瘍効果との関係やその機序についても検討する。間質反応の検討には線維芽細胞増殖抑制剤トラニラスト (現在術後の癒痕形成抑制やケロイド治療薬として市販され臨床ですでに用いられている) を用いる。血管新生阻害剤には分子標的薬として大腸癌に使用されているアバスチンを用いる。また同様に、腫瘍の縮小効果、浸潤様式のダウングレード、リンパ節転移抑制効果、抗癌剤の組織学的抗腫瘍効果との関係やその機序についても検討する。

### 3. 研究の方法

用いる浸潤・転移モデルに関する基礎的な研究は既に行われており、本研究では最も高浸潤・高転移性を示した OLC-01 細胞 (舌癌患者の頸部リンパ節転移巣より樹立した中分化型の扁平上皮癌細胞・浸潤様式 4D 型) を用いて、ヌードマウスの舌に正所性移植し、浸潤および転移に対する影響を観察する。用いるマウスは6週齢・雌の BALB/c nu/nu のヌードマウス体重は 15~20g で、金沢大学医学部附属動物実験施設内で特定病原体除去環境下、室温  $25 \pm 2$ 、湿度  $50 \pm 5\%$  にて飼育して使用する。OLC-01 細胞は 10% となるように牛胎児血清を加えたイーグル最小必須培地でインキュベーター内 (温度  $37$ 、湿度 100%、5% CO<sub>2</sub>) において継代培養し、必要に応じて使用する。ヌードマウスへの移植方法はまず、OLC-01 細胞を 0.2% トリプシン液で分散し、10% 牛胎児血清加イーグル最小必須培地中で細胞数を  $1.6 \times 10^7$  個に調整した後に、その 0.020ml ( $3.2 \times 10^5$  個) を 26 ゲージ針付きの注射器でジエチルエーテル麻酔を行ったヌードマウスの舌粘膜下に移植する。OLC-01 細胞を本モデルに応用し、得られた組織を検討したところ、浸潤様式は 4D 型であることがすでに判明している。移植腫瘍の浸潤に対する効果を検討するために腫瘍の HE 染色標本を用い、顕微鏡的に観察して

下里分類に従って分類し組織学的効果を判定した後に、山本-小浜の癌浸潤様式に準じて化学療法後の残存腫瘍の浸潤形態について評価する。血管新生についての検討については使用する癌細胞は悪性度が高い浸潤様式 4C 型と診断された舌癌患者の頸部リンパ節転移巣から樹立した高浸潤高転移のヒト口腔扁平上皮癌由来細胞株である OSC-19 細胞を使用し、同様にヌードマウスの舌に移植した。実験に使用する抗癌剤は臨床において頻用されるシスプラチンを使用する。抗癌剤の投与の量については、シスプラチンにおいては 1.5mg/kg とすることにし、投与経路は腹腔内投与とした。また、それぞれ生食水を投与した群をコントロールとして同様の検討を行う。また、トラニラスト(線維芽細胞増殖抑制剤で術後の癒痕形成抑制やケロイド治療薬として臨床で用いられている薬剤)を用いる予定である。本剤は線維芽細胞の増殖抑制とともに血管新生も抑制することが知られており、癌細胞周囲の間質線維芽細胞の状態の変化について検討を加える。トラニラストの投与スケジュールは、これまでの同剤を用いた報告を参考にし、移植した癌細胞が局所に生着した後の移植後 2 日目から連日投与とする。血管新生阻害剤はアバスチンを使用する。OSC-19 細胞を移植後 6 日目からアバスチン投与群にはアバスチン 0.1mg、コントロール群には蒸留水 0.2ml をそれぞれ週 1 回腹腔内投与する。移植後 22 日目に屠殺し、舌腫瘍と頸部リンパ節を採取する。浸潤に対する効果は同様に、切除した腫瘍の HE 染色標本を用い、光顕的に観察して下里分類に従って分類し組織学的効果を判定した後に、山本-小浜の癌浸潤様式に準じて化学療法後の腫瘍の浸潤効果について評価する。また、転移に対する効果も同様に、頸部リンパ節の HE 染色標本を用い、光顕的に観察して病理組織学的に転移形成の有無を確認し、対照群の転移形成率と比較検討するとともに、転移腫瘍の組織学的進展度を本間らの分類に従って判定し、頸部リンパ節転移腫瘍の進展についても検討する。

#### 4. 研究成果

線維芽細胞増殖抑制剤(トラニラスト)の腫瘍増殖や浸潤・転移に対する抑制効果を検討した。高浸潤性のヒト口腔扁平上皮癌由来細胞株の OLC-01 細胞(浸潤様式 4D 型)をヌードマウスの舌に移植した後に、翌日よりトラニラスト群、シスプラチン群、併用群、コントロール群に分け腹腔内投与した。その結果、移植腫瘍の大きさの平均はコントロール群と併用群の間に有意差があった。リンパ節転移率は全体で 8.33%と低く検討不能であった。病理組織像で移植腫瘍がトラニラストを投与することで浸潤様式 4C 型や 3 型にダウングレードする傾向は認められなかった。しかし、癌細胞の細胞増殖活性を観察するために増殖細胞核抗原 PCNA 抗体を、腫瘍組織の

低酸素状態を観察するために低酸素誘導性因子 HIF-1 抗体を用い免疫染色を行ったところトラニラスト投与群で細胞増殖活性の陽性率は減少し、HIF-1 抗体の陽性率が高い結果となった。

結合組織量を観察するためアザン染色を行ったが、トラニラスト群では結合組織量が顕著に抑制されていたが、筋線維芽細胞のマーカーである  $\alpha$ -SMA 抗体、高浸潤癌の線維芽細胞に発現する MT-MMP1 抗体による発現は減弱されていなかった。しかしながら、併用群では  $\alpha$ -SMA 抗体の発現の減弱が顕著だった。これは、線維芽細胞増殖抑制剤であるトラニラストは結合組織量を減少させることはできるが、腫瘍間質の性質、すなわち癌細胞浸潤を誘導する癌間質線維芽細胞の性質は変化させることはできない。しかし、抗癌剤であるシスプラチンはその性質を減弱させることが可能であるのではないかと考えられた。これらの結果は、両剤を併用することによって腫瘍の増殖、浸潤に抑制効果がおおいに期待できることを明らかにした。トラニラストは確実に結合組織量を減少させることのできる薬剤であり、副作用はほとんどないため、抗癌剤との併用は臨床で用いる薬剤として意義のあるものと考えられる。

また、血管新生阻害剤であるアバスチンの抗腫瘍効果を検討した。高浸潤高転移性のヒト口腔扁平上皮癌由来細胞株の OSC-19 細胞(浸潤様式 4C 型)をヌードマウスの舌に移植した後に、薬剤を投与した。その結果、移植腫瘍の大きさには差異がなかったがリンパ節転移はアバスチン投与群で有意に抑制効果が認められた。血管内皮細胞増殖因子である VEGF-A 抗体で血管新生を観察したところ、アバスチン投与群で血管新生抑制が認められた。リンパ管のマーカーである D2-40 抗体でリンパ管について観察したところ、アバスチン投与群でリンパ管数の減少が認められた。これらの結果より、アバスチンは血管新生抑制とともにリンパ管新生抑制効果が認められた。

今回は実験期間途中でマウスの死亡があり投与濃度や投与頻度、溶解液を検討し直して実験を行った。今後はさらに個体数を増やすとともに、血管新生阻害剤(アバスチン)と抗癌剤(シスプラチン)の併用実験も行い、比較検討し、間質反応について明らかにしたいと考えている。

#### 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)

[雑誌論文](計 2 件)

Yanase M., Kato K., Yoshizawa K., Noguchi N., Kitahara H., Nakamura H. Prognostic value of vascular endothelial growth factor A and C in oral squamous cell

carcinoma. Journal of Oral pathology and medicine 43:2014 査読あり

doi:10.1111/jop.12167. (in press)

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 prognostic factor for invasion and metastasis in oral squamous cell carcinoma. Oncology Report 29: 445-450, 2013. 査読あり doi: 10.3892/or.2012.2161.

〔学会発表〕(計9件)

加藤広禄、平井真理子、加藤阿希、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。福岡国際会議場・マリメッセ福岡(福岡県)

吉澤邦夫、北原寛子、野口夏代、加藤広禄、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6月13日。京王プラザホテル(東京都)

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 および 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24日。栃木県総合文化センター(栃木)

Kato K, Noguchi N, Kitahara H, Yoshizawa K, Kawashiri S. The AMPK activator AICAR inhibits proliferation in oral squamous cell carcinoma. Ninth AACR-Japanese Cancer Association Joint Conference. 2013年2月24日。Hyatt Regency Maui (USA)

木村依世、加藤広禄、野口夏代、吉澤邦夫、北原寛子、柳瀬瑞希、川尻秀一。口腔扁平上皮癌における EGFR 発現の免疫組織化学的検討。第31回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会。2013年1月25日。秋葉原コンベンションホール(東京都)

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、柳瀬瑞希、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20日。パシフィコ横浜(神奈川県)

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. 17<sup>th</sup> World congress on advances in oncology and 15<sup>th</sup> International symposium on molecular medicine, 2012. 10.12, Creta (Greece)

八木瑞希、川尻秀一、野口夏代、加藤広禄、

吉澤邦夫、岡宗絢子。口腔扁平上皮癌における VEGF-A および VEGF-C 発現の免疫組織化学的検討。第36回日本頭頸部癌学会総会・学術集会, 2012年6月8日, 島根県民会館(島根県)

杉浦史郎、加藤広禄、野口夏代、吉澤邦夫、北原寛子、岡宗絢子、八木瑞希、木村依世、吉本泰祐、川尻秀一。口腔扁平上皮癌における接着分子としての CD44v3 の発現と臨床病理組織学的因子との関係, 第30回日本口腔腫瘍学会学術集会, 2012年1月26日, 大宮ソニックシティ(埼玉県)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野口夏代 (NOGUCHI NATSUYO)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号: 90547176

(2) 研究分担者

該当なし( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

該当なし( )

研究者番号：