

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792208

研究課題名(和文) シスプラチン耐性口腔癌において抗血管新生薬は生命予後を延長するか？

研究課題名(英文) Can anti-angiogenic drug improve prognosis in CDDP resistant cell of oral cancer?

研究代表者

石橋 美樹 (ISHIBASHI, MIKI)

大阪大学・歯学研究科(研究院)・招聘教員

研究者番号：40412051

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、シスプラチン(CDDP)耐性口腔扁平上皮癌細胞の抗血管新生薬の効果について明らかに解析する目的で行った。具体的には、3種のヒト口腔扁平上皮癌由来細胞株を用い、血管新生に関するタンパク質(ANG-1、ANG-2、VEGF、CD31)について検討した。その結果、ヒト口腔扁平上皮癌由来細胞株と比較して、CDDP耐性ヒト口腔扁平上皮癌由来細胞株における各タンパク質の検出率は増加していたが、ANG-1、ANG-2については有意差を認めなかった。放射線化学療法後口腔扁平上皮癌細胞の口腔扁平上皮癌細胞の化学療法に対する感受性については、今回検索したマーカー以外の他の要因も関わっていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to clarify the sensibility of anti-angiogenesis therapy in CDDP-resistant oral squamous cell carcinomas. Briefly, ANG-1, ANG-2, VEGF, CD31 were immunohistochemically examined in order to evaluate its correlation with 3 type of human oral squamous cell carcinoma cell lines. We did not find significant correlation immunohistochemically with ANG-1, ANG-2 between human oral squamous cell carcinomas and CDDP-resistant oral squamous cell carcinomas. The sensibility of chemoradiotherapy in human oral squamous cell carcinomas after chemo-radiotherapy depend on, suggesting the involvement of other factors.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：抗血管新生 口腔癌

## 1. 研究開始当初の背景

CDDP は、固形癌化学療法の key drug として多くの癌に優れた抗腫瘍効果を示すが、の薬剤耐性により治療困難となることが多い。口腔癌における抗癌剤耐性は主に獲得耐性である。獲得耐性とは、元来抗癌剤の感受性が高かった癌細胞が癌化学療法後に耐性を得する場合であり、放射線治療や癌化学療法による 1 次治療後の再発腫瘍の多くはこれ相当するものとする。1 次治療後に再発転機を来した口腔癌に対しては、姑息的治療が中心となっているのが現状である。

一方で、現在、癌について遺伝子学的研究が飛躍的に進み、癌の進展において血管新生が極めて重要な役割を果たしていることが明らかになってきている。その中でも VEGF (vascular endothelial growth factor) が中心的な役割をすることが明らかになった。また、血管新生を抑えるとそれ以上の癌の進展はとまることも報告されている。2007 年には本邦でも VEGF のヒトモノクローल抗体の一つである Vebacizumab が、大腸がんの治療薬として認可された。

口腔癌領域でこのような分子標的治療薬の応用は未だ試験段階だが、Cetuximab が認可されており、プラチナ製剤抵抗の再発性または転移性の頭頸部扁平上皮癌に有効であるとその効果が注目されている (Pfister, D.G. et al, J Clin Oncol, 2006)。

そこで、申請者は CDDP 耐性ヒト口腔扁平上皮癌培養細胞を用いて抗血管新生薬の効果を明確にするため、各培養細胞における血管新生因子の発現について検討した。さらに化学療法については Pt 取り込み量、細胞内への Pt 取り込みを調整するタンパク (Ctrl) 発現について検討した。

ANGs (angiopoietin family) は VEGF との共同作用により、血管新生因子の中で重要な役割を果たすと考えられている。ANGs に

ついて口腔癌に関する報告はほとんどないが、非小細胞癌、肝臓癌、大腸癌、胃癌について解析が進められている。現在までに ANG-1 は TIE-2 (Tyrosine kinase with immunoglobulin and EGF homology domain-2) に対するリガンドとして、血管内皮細胞と壁細胞の結合を強化し、血管の安定と成熟を促進させることがわかっている。低酸素状態では ANG-2 が血管内皮細胞で産生され、内皮細胞と壁細胞間の接着を抑制し、内皮細胞の局所への移動を誘導する。同時に VEGF が過剰発現し、腫瘍血管新生がさらに進展していく。したがって、VEGF と同様に ANGs を抑制すれば癌の浸潤・転移を防ぎ、tumor dormancy が得られると推察される。

## 2. 研究の目的

近年、抗血管新生療法が進行・再発口腔癌に有効であることが示唆されているが、そのメカニズムはあまりわかっていない。そこで CDDP 耐性口腔癌における抗血管新生薬の効果について明らかにし、その中で本研究では特に CDDP 耐性口腔癌の抗血管新生薬投与によるプラチナ (Pt) 系抗癌剤の細胞内への取り込み機構について解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 研究対象

3 種のヒト口腔扁平上皮癌由来細胞株である OSC-20 細胞、OSC-19 細胞、HOC313 細胞、各 CDDP 耐性株を用いて検討した。また、大阪大学第一口腔外科で初回治療を受けた口腔癌患者を対象とした。1995 年から 2012 年までの間に、放射線化学療法を行った扁平上皮癌 20 例、手術単独症例 20 例について、ホルマリン固定パラフィン包埋標本を用いて検討を行った。

### (2) 血管新生因子に関する検討

ANG-1、ANG-2、VEGF、CD31 について 6 穴プレートにカバーガラスを置き、各培養細胞を 2000 個になるように播種し、10% FBS 含有 D-MEM 培地にて 48 時間培養後、4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝生理食塩水、PBS にて 25 分間固定し、0.2%Triton X-100 PBS にて 5 分間処理後 3% bovine serum albumin PBS にて 30 分間ブロッキングをした後、100 倍希釈抗ヒト VEGF ( rabbit monoclonal antibody: clone sc-7269, 1:100, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA ) を 90 分間処理し、PBS(-) にて洗浄後、封入し蛍光顕微鏡で観察した。血管内皮細胞のマーカーとして抗 CD31 抗体 ( mouse monoclonal antibody; clone 89C2, 1:50, Cell Signaling Technology, US ) 血管新生促進因子のマーカーである ANG-1 ( mouse monoclonal antibody: clone N-18, 1:2, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA ) ANG-2 ( mouse monoclonal antibody: clone H-70, 1:10, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA ) についても検討した。陽性細胞率と染色強度によるスコア値により評価した。核の対比染色にはヘマトキシリンを用いた。陽性細胞数は 5 段階評価 ( 0 5%、1:5 - 25%、2:25 - 50%、3:50 - 75%、4 75% ) 染色強度は 3 段階評価 ( 1:弱陽性、2:中等度陽性、3:強陽性 ) を行い、その積をスコア値とした。

### ( 3 ) 血管新生因子の増減による Ctr1 発現についての検討

各症例について抗 Ctr1 抗体を用い、免疫組織化学的に検討した。また、放射線化学療法を施行した症例と手術単独症例についても各 10 例抽出し、それぞれ抗 Ctr1 抗体を用い、免疫組織化学的に検討し、発現の差について比較検討した。

## 4 . 研究成果

### ( 1 ) 臨床的検討

本研究では、放射線化学療法を行った扁平上皮癌 20 例と手術単独症例 20 例の口腔病変を対象として研究を行った。患者は 44 歳から 81 歳まで ( 平均年齢 59.2 歳 ) の男性 23 名、女性 17 名であった。

### ( 2 ) 血管新生因子の発現について

ヒト口腔扁平上皮癌由来培養細胞における血管新生因子発現について

ANG-1、ANG-2、VEGF、CD31 陽性反応をスコア値で算出したところ、OSC-20 細胞、OSC-19 細胞、HOC313 細胞すべてにおいて、耐性細胞の方が親株よりも、スコア値が高い傾向を認めたが、ANG-1、ANG-2 発現は有意差が認められなかった。以上より、親株と比較して耐性細胞において部分的に血管新生が盛んである可能性が示唆された。

臨床検体における血管新生因子発現について

臨床検体はすべてのタンパク発現について治療前のスコア値より、治療後のスコア値の方が高い傾向が認められたが有意差はなかった。

### ( 3 ) 血管新生因子の増減による Ctr1 発現についての検討

Ctr1 抗体陽性反応について検討したが、OSC-20 細胞、OSC-19 細胞、HOC313 細胞すべてにおいて、耐性細胞の方が検出率が低い傾向が認められた。放射線化学療法を施行した症例と手術単独症例についても各 10 例抽出し、検討したところ、化学療法を施行した症例について Ctr1 抗体陽性細胞がやや少ない傾向が認められたが、有意な差はなかった。

本研究では、口腔扁平上皮癌において、放射線化学療法併用前後で血管新生因子は発現が増強する傾向が認められたが、有意な変

化は見いだせなかった。放射線化学治療前後で血管新生因子が減少しているとの報告もあり、さらなる検討が必要であると考えられた。

また、放射線化学療法を施行した症例で Ctr1 抗体陽性細胞数がやや少ない傾向が観察できた。血管新生因子との関連性は見いだせなかったが、放射線化学療法の治療成績向上の機序は血管新生因子のみによってもたらされるものではなく、その他の多因子の関与によってもたらされる可能性が考えられ、薬剤感受性の再獲得のメカニズムを同定・推測することは困難であった。

しかしながら、症例数も少なく、断定的な結論には至らないと思われるので、引き続き検討をすすめたい。

## 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 0 件 )

[ 学会発表 ] ( 計 4 件 )

血管柄付き遊離腓骨皮弁で再建を行った下顎正中エナメル上皮腫の 1 例 : 石橋美樹、相川友直、住岡 聡、磯村恵美子、沢井奈津子、美馬孝至、古郷幹彦、第 32 回日本口腔腫瘍学会、札幌、2014 年 1 月 23 日 ~ 24 日

MTX 関連リンパ増殖性疾患と考えられた舌悪性リンパ腫の 1 例 : 石橋美樹、住岡 聡、美馬孝至、第 58 回日本口腔外科学会総会、福岡、2013 年 10 月 11 日 ~ 13 日

上唇に生じた血管平滑筋腫の 1 例、住岡聡、石橋美樹、美馬孝至、兵庫、2013 年 6 月 29 日

顎下腺原発腺様嚢胞癌の多発性肺転移症例に S-1 を投与し QOL の維持が得られた 1 例 : 石橋美樹、香川一史、美馬孝至、東京、2013 年 6 月 13 日 ~ 14 日

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

石橋 美樹 ( ISHIBASHI MIKI )

大阪大学・大学院歯学研究科・招聘教員

研究者番号 : 40412051