

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293373

研究課題名(和文) リポソーム化ラクトフェリンを用いた口腔癌の増殖ならびに骨浸潤の制御

研究課題名(英文) The effects of liposomal LF on growth, invasion and bone destruction of oral squamous cell carcinoma (OSCC)

研究代表者

高田 隆 (Takata, Takashi)

広島大学・医歯薬保健学研究院(歯)・教授

研究者番号：10154783

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：ラクトフェリン(LF)を口腔癌の新規治療薬として用いることができるかどうかを明らかにすることを目的に検討を行い以下の結果を得た。1. リポソーム化LFの経口投与により口腔癌の増殖と骨浸潤が抑制される。2. LFは癌細胞の増殖を抑制するとともに、アポトーシスを抑制する。3. LFは癌細胞の遊走・浸潤を抑制する。4. LFは癌細胞が産生する破骨細胞誘導因子の発現を有意に減少させる。5. LFは腫瘍性血管内皮細胞の増殖と分化を抑制する。以上の結果から、LFを口腔癌の新規治療薬として応用できることが示された。

研究成果の概要(英文)：The aim of the study was to clarify the effects of bLF on growth, invasion and bone destruction of oral squamous cell carcinoma (OSCC). Results show 1. Oral administration of liposomal LF inhibits proliferation of OSCC and suppresses bone invasion of OSCC. 2. LF suppresses proliferation of OSCC cells and induces apoptosis of OSCC cells. 3. LF inhibits mobility and invasion of OSCC cells. 4. LF inhibits osteoclastogenesis related molecules in OSCC cells. and 5. LF inhibits tumor angiogenesis by inhibiting proliferation and differentiation of tumor related endothelial cells. Taking together, LF may be a novel therapeutic drug beneficial for the inhibition of OSCC cell proliferation, migration and bone invasion.

研究分野：口腔病理学

キーワード：ラクトフェリン 口腔癌 増殖抑制 腫瘍性血管 血管形成 アポトーシス 骨浸潤 破骨細胞

1. 研究開始当初の背景

口腔癌は世界で5番目に多い悪性腫瘍で、口腔癌の制圧には大きな社会的意義がある。口腔癌の予後を判定する指標には、原発腫瘍の大きさや所属リンパ節への転移の有無に加えて、骨への浸潤が大きな予後決定因子となっている。そこで、口腔癌の増殖進展とりわけ骨浸潤を制御することにより、口腔癌の予後を改善する必要がある。

ラクトフェリン(LF)はヒトやウシの母乳、特に初乳に高濃度に含まれており、抗菌作用、免疫賦活作用、抗炎症作用、抗酸化作用、抗腫瘍作用などの多彩な機能を有することが知られている。このうち、抗腫瘍作用についてはLFの経口摂取が動物実験において種々の癌の発症を抑制することが報告されたが、口腔ガンに対する効果は明らかでなく、その分子メカニズムは未だ不明である。

我々はこれまで、LFを炎症性骨破壊性疾患の予防や治療に応用すべく、LFの生物活性、特に抗炎症作用と破骨細胞誘導に対する抑制作用に着目して様々な検討を重ね、1. LFはTRAF6と結合することによって破骨細胞形成を強く抑制する(*J Biol Chem* 2012)こと、2. リポソーム化ラクトフェリン(L-LF)は著明な骨破壊抑制作用を示す(*Lab Invest.* 2010)、3. L-LFは歯周病患者の炎症性サイトカインレベルを下げ、組織破壊を抑制する(*Biol Pharm Bull.* 2010)ことを明らかにしてきた。そこで、本研究では以下の目的のもと、口腔癌を対象とした検討を行った。

2. 研究の目的

本研究ではL-LFを口腔癌の増殖ならびに骨浸潤を抑制する新規の治療薬として用いることができるかどうかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

1. 口腔癌の増殖ならびに骨浸潤に対するL-LF経口投与の抑制効果に関する*in vivo*での検討

1) 骨浸潤モデルの作成とLFの投与

C3HマウスにSCCVII細胞を移植するモデル(*Oral Oncology*, 2007)を用いた。

LFの経口投与はYamanoら(*Lab Invest.*, 2010)の方法に従って、L-LFを500mg/kg/dayまたは100mg/kg/dayで経口投与した。

なお、口腔癌の骨浸潤モデルを確立するにあたり、当初、ヌードマウスの頭蓋皮下に口腔癌細胞を移植する系モデルを検討したが、安定した結果が得られなかった。一方、C3HマウスにSCCVII細胞を移植する系は通常飼育が可能で、腫瘍の生着、増殖、骨浸潤が安定的に再現されたので、本研究には後者を用いることとした。

2) 画像解析学的、組織学的および組織化学的評価

口腔癌細胞移植後4週後にマウス頭部を摘出し固定後、 μ CTにて撮影し骨破壊を画像解析学的に解析した。 μ CTによる解析後に組織標本を作成し、破骨細胞の出現状況を含めた組織学的解析を行った。また、腫瘍内ならびに周囲の血管の分布を計測した。

・ LFの抗腫瘍作用に関する*in vitro*での検討

口腔癌細胞の増殖能、遊走能や浸潤能ならびに腫瘍に対するLFの作用について検索するとともに、腫瘍血管内皮細胞を用いて腫瘍血管形成に対するLFの作用について検索した。

1) LFの癌細胞の増殖、アポトーシスに対する影響の検討

口腔癌細胞にLFを投与(0.1~100 μ g/ml)し、投与後の細胞数を計測するとともに、フローサイトメトリー解析によるアポトーシス誘導に関する解析を行った。

2) LFの癌細胞の遊走能、浸潤能に対する影響の検討

細胞遊走能の評価にはスクラッチアッセイを、浸潤能の評価には*in vitro* invasion assay法を用いた。0.1~100 μ g/mlの濃度でLFを投与し、投与12時間、24時間後で細胞遊走能、浸潤能をそれぞれ比較検討した。

3) LFが腫瘍血管新生に与える影響の検討

LFが腫瘍血管内皮細胞の増殖やチューブ形成能に与える影響について検討した。また、LF投与がVEGFやその受容体などの血管新生関連遺伝子発現に与える影響について検討した。

・ 口腔癌の増殖進展ならびに骨浸潤に対するLFの抑制作用の分子メカニズムの解明

1) LFの口腔癌細胞による破骨細胞誘導に対する抑制効果のメカニズム解析

2) LFの増殖進展に対する抑制効果のメカニズム

3) LFの腫瘍血管形成に対する抑制効果のメカニズム

4. 研究成果

1. 口腔癌の増殖・骨浸潤に対するL-LF経口投与の抑制効果

1) 肉眼的観察により、L-LFの経口投与によって腫瘍径が有意に減少していた。

2) μ CTならびに組織学的解析により、L-LFは骨破壊を有意に抑制することが明らかになった。

3) 組織計測学的解析により、L-LFの経口投与が腫瘍内血管の数を減少させることが明らかに示された。

・ LFの抗腫瘍作用の*in vitro*での検討

1) LFの癌細胞の増殖、アポトーシスに対する

る影響の検討

LFは濃度依存的に癌細胞の増殖を抑制し、アポトーシスを誘導した。

- 2) LFの癌細胞の遊走能、浸潤能に対する影響の検討
LFは濃度依存的に癌細胞の誘導能ならびに浸潤能を抑制した。
- 3) LFが腫瘍血管新生に与える影響の検討
LFは腫瘍性血管内皮細胞のアポトーシスを誘導した。

・ 口腔癌の増殖進展ならびに骨浸潤に対するLFの抑制作用の分子メカニズム

- 1) LFの口腔癌細胞による破骨細胞誘導に対する抑制効果のメカニズム解析
LFは癌細胞が産生する破骨細胞誘導因子であるIL-1ならびにRANKLの発現を有意に減少させた。
- 2) LFの増殖進展に対する抑制効果のメカニズム
LFはERK1/2とAkt pathwayを濃度依存的に抑制しp53とp21の発現を誘導しcyclin D1の発現を抑制することで癌細胞の増殖を抑制するとともに、アポトーシス抑制分子であるBadとbcl2の発現を抑制することでアポトーシスを抑制した。また、LFはMMPの発現を抑制するとともにMETを誘導することで、癌細胞の遊走・浸潤能を抑制した。
- 3) LFの腫瘍血管形成に対する抑制効果のメカニズム
LFは腫瘍性血管内皮細胞のVEGF-Aならびにその受容体であるFlt-1とFlk-1の発現を抑制した。また、LFはアポトーシス抑制分子であるbcl-2およびbcl-xlの発現を抑制し、caspase 3および7の発現を誘導した。

以上の結果から、L-LFを口腔癌の増殖ならびに骨浸潤を抑制する新規の治療薬として応用できることが示された。

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 0件)

[学会発表](計 13件)

1. Bovine lactoferrin inhibits oral cancer proliferation and bone invasion. Chea C, Ayuningtyas N F, Inubushi T, Subarnbhesaj A, Miyauchi M, Ishikado A, Imanaka H, Takata T. 6th Hiroshima Conference on Education and Science in Dentistry (Hiroshima), October 23-25, 2015.

2. Bovine lactoferrin attenuates growth and bone invasion of oral squamous cell carcinoma. Chea C, Ayuningtyas N F, Inubushi T, Subarnbhesaj A, Miyauchi M, Ishikado A, Imanaka H, Takata T. 12th International Conference on Lactoferrin: Structure, Function and Applications (Nagoya), November 2-6, 2015.

3. Bovine Lactoferrin Specifically Inhibits Tumor Angiogenesis: Takata T., Ayuningtyas N. F., Chea C., Saninggar K. E., Miyauchi M., Maishi N., Hida K., Inubushi T., Shindoh M., Imanaka H., Ishikado A.: 12th International Conference on Lactoferrin: Structure, Function and Applications (Nagoya), 2015.

4. Bovine lactoferrin selectively inhibits proliferation and differentiation of tumor endothelial cells. Ayuningtyas N F, Chea C, Tsuji H, Miyauchi M, Tanimoto K, Maishi N, Hida K, Shindoh M, Inubushi T, Imanaka H, Takata T. 第48回広島大学歯学会総会(広島), 6月27日, 2015.

5. Oral Administration of Liposomalized Lactoferrin Inhibits Bone Resorption by Periodontitis and Other Bone Destructive Diseases. Takata T, Inubushi T, Chanbora C, Miyauchi M. 6th Meeting of Asian Society of Oral Pathology and Medicine (Hyderabad), February 22. 2014

6. Bovine lactoferrin inhibits growth and invasion of oral squamous cell carcinoma. Chanbora C, Inubushi T, Subarnbhesaj A, Ayuningtyas N F, Miyauchi M, Ishikado A, Makino T, Takata T. 第103回日本病理学会総会(広島), 4月24-26日. 2014

7. The inhibitory effects of bovine lactoferrin on tumor angiogenesis. Ayuningtyas NF, Inubushi T, Subarnbhesaj A, Chanbora C, Miyauchi M, Hida K, Shindoh M, Takata T. 第86回日本口腔科学会学術大会・総会(東京), 5月7-9. 2014

8. Bovine Lactoferrin inhibits Tumor Angiogenesis. Ayuningtyas NF, Inubushi T, Chanbora C, Subarnbhesaj A, Miyauchi M, Saninggar KE, Maishi N, Imanaka H, Ishikado A, Makino T, Hida K, Shindoh M, Takata T. 日本ラクトフ

エリン学会第 6 回学術集会(茨城), 11 月 8 日. 2014

9. Oral administration of liposomalized lactoferrin inhibits bone resorption by periodontitis and other bone destructive diseases. Takata T, Ogawa I. 8th International Dental Collaboration of the Mekong River Region Congress (Phnom Penh), Dec 4-7. 2013
10. The Inhibitory effects of bovine lactoferrin on growth, invasion, and bone resorption of oral squamous cell carcinoma. Chanbora C, Inubushi T, Subarnbhesaj A, Ayuningtyas NF, Miyauchi M, Ishikado A, Imanaka H, Makino T, Takata T. XIth International Conference on Lactoferrin: Structure, Function and Applications (Rome), Oct 6-10. 2013
11. The inhibitory effects of bovine lactoferrin on growth and invasion of oral squamous cell carcinoma. Chanbora C, Inubushi T, Subarnbhesa A, Ayuningtyas NF, Miyauchi M, Ishikado A, Makino T, Takata T. 5th Hiroshima Conference on Education and Science in Dentistry (Hiroshima), October 12-13. 2013
12. ラクトフェリンによる骨吸収抑制作用と分子生物学的メカニズムの検討. 犬伏俊博, 宮内睦美, 敖敏, 古庄寿子, 石角 篤, 牧野武利, 高田 隆. 第 56 回春季歯周病学会 (東京), 5 月 31 日-6 月 1 日. 2013
13. The inhibitory effects of lactoferrin on growth and invasion of oral squamous cell carcinoma. Chanbora C, Inubushi T, Subarnbhesaj A, Ayuningtyas NF, Miyauchi M, Ishikado A, Makino T, Takata T. 第 24 回日本臨床口腔病理学会 (東京), 8 月 28 日-30 日. 2013

〔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

高田 隆 (Takata Takashi)
広島大学 医歯薬保健学研究院 教授
研究者番号：10154783

(2) 研究分担者

宮内 睦美 (Miyauchi Mutsumi)
広島大学 医歯薬保健学研究院 准教授
研究者番号：50169265

犬伏 俊博 (Inubushi Toshihiro)
広島大学 医歯薬保健学研究院 助教
研究者番号：30550941
(平成 25 年度まで)

進藤 正信 (Masanobu Shindo)
北海道大学 歯学研究科 教授
研究者番号：20162802
(平成 25 年度まで)

古庄 寿子 (Furusho Hisako)
広島大学 医歯薬保健学研究院 助教
研究者番号：00634461
(平成 26 年度より)

間石 奈湖 (Maishi Nako)
北海道大学 遺伝子制御研究所 助教
研究者番号：00632423
(平成 26 年度より)

(3) 連携研究者

()

研究者番号：