

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 27 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463114

研究課題名(和文)免疫栄養(エイコサペンタエン酸)を用いた口腔癌転移抑制の実験動物における研究

研究課題名(英文)Studies in experimental animals of oral cancer metastasis suppression using a nutritional immunity (EPA)

研究代表者

尾木 秀直(Ogi, Hidenao)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・助教

研究者番号：10315426

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：口腔扁平上皮癌高転移株GSAS/N3、GSAS/N5と親株GSASの培養細胞上清のTNF- $\alpha$ の産生をELISAで検討した。In vitroでのTNF- $\alpha$ 、TNF-R1は、親株GSASと比較して高転移株は高発現していた。またEPAでTNF- $\alpha$ の産生を抑制することでGSAS/N5を移植したマウスの舌は腫瘍の縮小や転移能の低下を認めた。またMMP-2、MMP-9の抑制も確認された。NF- $\kappa$ Bの活性上昇は、OSCCの転移において重要な役割を果たしており、EPA投与によるNF- $\kappa$ Bの抑制はOSCCに対する有効な治療法になる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Cancer cells (GSAS/N5) increased invasive activity 7-fold in a TNF- $\alpha$  receptor TNFR1-dependent manner and enhanced TNF- $\alpha$  and TNFR1 mRNA expression. In the highly metastatic cells, NF- $\kappa$ B activation was up-regulated via elevated phosphorylation of Akt and I $\kappa$ B in the signaling pathway and secretion of TNF- $\alpha$ , active MMP-2 and MMP-9 increased.; TNF- $\alpha$  activates NF- $\kappa$ B and activated NF- $\kappa$ B induces further TNF- $\alpha$  secretion, leading to increase of active MMP release and promotion of invasion and metastasis of the cells. GSAS/N5 cells that were injected into the nude mouse tongue and harvested from metastasized lungs multiplied angiopoietin-like 4 (angptl4) expression with enhanced migration activity, which indicated a possible involvement of angptl4 in lung metastasis of the cells. These results suggest that TNF- $\alpha$  and angptl4 promote metastasis of the oral cancer cells, thus these molecules may be therapeutic targets for patients with tongue cancer.

研究分野：歯科口腔外科

キーワード：口腔がん 転移 EPA TNF- $\alpha$  TNFR1

## 1. 研究開始当初の背景

今世紀に入り、免疫栄養 (immunonutrition) という概念が提唱されるようになり、さまざまな免疫賦活作用を有する栄養剤が臨床応用されるようになった。その代表ともいえる EPA (エイコサペンタエン酸) は 3 脂肪酸の一つで、5つのシス-二重結合をもつ 20 炭素のカルボン酸である。これまでの報告で、EPA は NF- $\kappa$ B の活性化を抑制し、炎症性サイトカインの産生を抑制することが明らかとなっている ( Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2009 Aug-Sep;81(2-3):187-91. Epub 2009 Jun 6. Review. Chapkin RS et.al. )。さらに、OSCC の頸部リンパ節転移に関わる因子について、当科で樹立した OSCC の高転移株を用いて、高転移の OSCC において NF- $\kappa$ B の発現が高くなっていることを明らかにし、NF- $\kappa$ B の阻害剤である NBD peptide 投与により in vivo の実験で口腔癌では、初めてリンパ節転移を抑制することに成功した ( Cancer Science 103(3):455-63,2012 )。

これまで EPA は抗炎症作用を通して「悪液質」の改善などを促し、特に Stage I, II, III の患者では癌化学療法・分子標的治療の効果を増強できる可能性が示され、Stage IV では患者を積極的な癌集学的治療の対象に再び戻せる可能性が期待されている。

## 2. 研究の目的

口腔扁平上皮癌 (OSCC) の転移は患者の予後と強く関連する。しかし、OSCC の転移に対する予防法や治療法としては、手術、放射線治療、化学療法が挙げられるが、これらは生体に対する毒性・傷害作用が大きく、また、これら 3 つの治療法を組み合わせても制御できない転移も存在する。このため、生体傷害性の少ない新たな転移抑制療法の開発が望まれている。

本研究は、当研究室において世界で初めて樹立した OSCC 高転移性株を用いて、栄養学的・免疫学的見地から、in vivo での免疫栄養 (EPA ; エイコサペンタエン酸) を用いた転移抑制療法の開発を目的とした。

## 3. 研究の方法

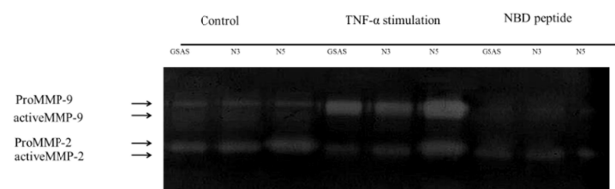
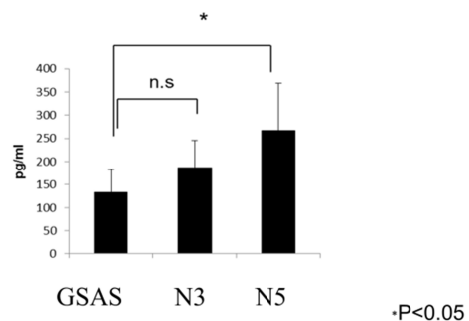
EPA 含有の食餌と EPA 非含有の食餌 (コントロール群) を経口から投与している 2 群のヌードマウスの皮下に、GFP を導入した高転移株 OSCCN5 細胞を移植する。その後、経時的にマウスの全身状態、移植部 (原発巣) の状態を観察し、3 ヶ月後に剖検し、転移の状態を肉眼的、顕微的に評価を行い、EPA の腫瘍転移抑制能を評価した。

In vitro では mRNA やタンパクの発現の解析を親株と転移株とで比較すると共に、NBD

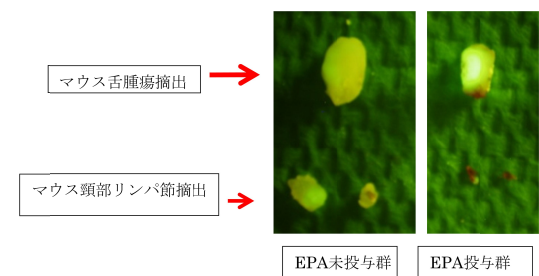
peptide の投与で NF- $\kappa$ B の活性が阻害された状態での mRNA の発現とタンパクの発現を解析した。さらに傷つけアッセイを行うことで遊走能の測定を行った。

## 4. 研究成果

In vitro での TNF- $\alpha$  , TNF-R1 は、親株 GSAS と比較して高転移株 GSAS/N3,GSAS/N5 は発現が高く、TNF-R2 の発現に変化はなかった。NF- $\kappa$ B の上流の分子である PI(3)K, P-Akt, P-Ikk , P-Ikk の発現は、タンパクレベルで高転移株 GSAS/N3, GSAS/N5 での発現上昇を認めた。また NBD peptide の投与で NF- $\kappa$ B の活性が阻害され TNF- $\alpha$  産生量が抑制されると P-Akt, P-Ikk の発現の低下を認めた。NF- $\kappa$ B の下流の分子であり浸潤・転移の代表的な分子である MMP-2, MMP-9 もゼラチンゼイモグラフィ・浸潤アッセイにおいて転移株で有意に高発現を認めており、EPA で NF- $\kappa$ B を抑制することで発現を抑制していることを確認できた。



また傷つけアッセイを行うことで遊走能においても EPA 投与をすることで抑制されることを確認した。最後に EPA をマウスに経口投与することで TNF- $\alpha$  の産生を抑制し GSAS/N5



を移植したマウスの舌は腫瘍の縮小や転移能の低下を認めた。

NF- B の活性上昇は, OSCC の転移において重要な役割を果たしており, 本研究により, これまであまり重要視されてこなかった免疫栄養 (immunonutrition) の見地より傷害性の少ない (副作用の少ない) 新たな転移抑制療法の開発を目指している。この治療法が確立されれば, その生体への低傷害性より, 既存の治療と併用も可能であり, その乗せ転移抑制が明らかとなれば, 今後の転移抑制に関する有効な治療法の一つになると考える。

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)

A case of patient with oral cancer which led to serious drug-induced enteritis during chemoradiation therapy using S-1

田中拓也・尾木秀直・吉武義泰・太田和俊 3  
篠原正徳・中山秀樹

日本口腔外科学会雑誌 (in press)

Enhancement of active MMP release and invasive activity by elevated signaling via the TNF- $\alpha$ -TNFR1-NF- B pathway in highly metastatic oral cancer cells and a possible involvement of angiopoietin-like 4 in lung metastasis.

Takuya Tanaka, Takahisa Imamura, Masakazu Yoneda, , Atsushi Irie, Hidenao Ogi, Masanori Shinohara<sup>1</sup>, and Hideki Nakayama  
(投稿中)

[学会発表](計 2件)

Highly metastatic oral squamous carcinoma with autocrine of TNF- acquire high invasion ability.

Takuya Tanaka Masashi Nagata , Ryoji Yoshida , Kenta Kawahara Yoshihiro Nakagawa, Yuichiro Mastuoka , Hidenao ogi, Akimitsu Hiraki Masanori Shinohara Hideki Nakayama

第 74 回日本癌学会学術総会 愛知・名古屋  
2015 年 10 月 8 日~10 日 ポスター

L-6 confers radioresistance via Nrf2 antioxidant pathway in oral squamous cell carcinoma cells

Yuichiro Matsuoka, Ryoji Yoshida, Akiyuki Hirotsue, Takuya Tanaka, Masashi Nagata, Kenta Kawahara, Hidetaka Arita, Junki Sakata, Hikaru Nakashima, Hidenao Ogi, Akimitsu Hiraki , Masanori Shinohara, Hideki Nakayama

第 74 回日本癌学会学術総会 愛知・名古屋  
2015 年 10 月 8 日~10 日 ポスター

[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

尾木秀直 (OGI Hidenao)

研究者番号：10315426

所属・部局・職名：熊本大学・大学院生命科学  
学研究部(医)・助教

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：