

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861948

研究課題名(和文) 口腔癌に対するWarburg効果阻害に着目した新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of new therapeutic strategy focused on inhibition of Warburg effect against oral cancer

研究代表者

原田 豊子 (HARADA, Toyoko)

山口大学・医学部・特別医学研究員

研究者番号：20647937

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：口腔扁平上皮癌に対する糖尿病治療薬Metformin (Met)と抗癌剤5-FUの併用療法による抗腫瘍効果について検討した。Met (4 mg/ml)、5-FU(2.5 µg/ml)の併用により細胞増殖抑制効果の増強、乳酸産生の抑制、Warburg効果関連因子であるHIF-1、mTOR・Akt1の発現抑制ならびにAMPKの発現増強、さらにアポトーシスの増強を認めた。また実験動物(担癌ヌードマウス腫瘍)に対しても、同様の結果が得られた。以上の結果から、口腔扁平上皮癌に対してMetと5-FUの併用療法は、Warburg効果の阻害を介して顕著な抗腫瘍効果を発現する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the efficacy of metformin (Met) and 5-FU combined therapy against human oral squamous cell carcinoma (OSCC). MTT assay and TUNEL assay revealed that Met (4 mg/ml) and 5-FU (2.5 µg/ml) combination treatment effectively inhibited cell growth and induced apoptosis in OSCC cell lines compared to either agent alone. Lactate colorimetric assay detected decreased level of lactate in the supernatants of Met and 5-FU treated cells compared to cells treated with Met or 5-FU. Western blot analysis showed down-regulation of HIF-1 and mTOR expression, and up-regulation of AMPK in cells treated with Met and 5-FU combination treatment. Combination therapy with Met (200 mg/kg, i.p.) and 5-FU (10 mg/kg, i.p.) for 4 weeks effectively reduced tumor growth (77.6%) compared to Met (59.9%) or 5-FU (52%) alone in nude mice. These findings suggest that Met and 5-FU combined therapy could exert strong antitumor effect against OSCC through the inhibition of Warburg effects.

研究分野：歯科口腔外科

キーワード：メトフォルミン 5-FU Warburg効果 口腔癌 アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

Otto Warburg が、「癌細胞では酸素が十分に供給されている状態でも細胞質における嫌気性解糖が顕著に増加している。」ことを報告し、Warburg 効果と呼ばれている (J Gen Physiol. 1927; 8:519-530)。正常細胞では酸素があるとグルコースを解糖、TCA 回路、電子伝達系における酸化リン酸化を経て、CO₂ と H₂O に分解し効率良くエネルギー (ATP) を得ているが、運動した際には酸素供給不足となり筋肉細胞に乳酸が貯まることで知られる嫌気性解糖が行われる。逆に、癌細胞では酸素供給下にあっても非効率な嫌気性解糖を用いてエネルギーを得ている。癌細胞はグルコースを大量に消費するのに、なぜ効率的なミトコンドリアの酸化リン酸化を用いずに嫌気性解糖を用いるのかが謎であった。近年、癌細胞はミトコンドリアにおける酸化リン酸化を低下させてアポトーシスに抵抗性になっていることが報告され (J Natl Cancer Inst. 2006; 98:1462-1473)、癌細胞はアポトーシスを回避するために、あえてミトコンドリアにおける酸化リン酸化を抑え、必要なエネルギーを嫌気性解糖系に依存していると考えられるようになった。すでに癌細胞のミトコンドリアを活性化することによる癌治療法が検討され始め、癌細胞におけるミトコンドリア内での酸化リン酸化を活性化すると、活性酸素やチクローム C などのアポトーシス誘導に関わる因子の働きが正常化し、アポトーシスを惹起させやすくなることなどが明らかにされつつある。ミトコンドリアの異常による代謝性疾患、乳酸アシドーシスの治療などに用いられてきたジクロロ酢酸ナトリウム sodium dichloroacetate (DCA) は、ピルビン酸脱水素酵素を活性化してミトコンドリアにおける酸化リン酸化を促進できる薬剤であり、Warburg 効果の抑制を介した癌治療への応用が期待されている。動物実験では DCA 単剤での抗腫瘍効果が確認され、カナダにおける臨床試験でもヒトに対する有効性が明らかとなり、現在更なる抗癌効果を得るために DCA と抗癌剤との併用療法が注目されている。最近 DCA よりも Warburg 効果を顕著に抑制できる薬剤として、- リポ酸の有用性が報告された (Cancer Biol Ther. 2012; 13: Epub)。- リポ酸は、TCA サイクルのピルビン酸脱水素酵素複合体とアルファケトグルタル酸脱水素酵素複合体を活性化してミトコンドリアの酸化リン酸化を高める作用を有するとともに、抗酸化剤としてフリーラジカルを消去し、酸化ストレスを軽減することにより転写因子 NF- κ B の活性を抑制し、血管新生抑制効果や抗腫瘍効果を発現する可能性が示唆されている。これまでにプロテアソームインヒビター Bortezomib と TS-1 の併用療法 (頭頸部癌 2011 年, 37 巻, 536-541 頁) や、植物アルカロイド Cepharanthine と放射線との併用療法 (Int J Oncol. 2012; 41: 565-572) など NF- κ B 活性の抑制効果を目指した治療法の開発に関する基礎的検討を行ってきたが、腫瘍体積の大きさや生存シグナル (p-Akt) の高さがこれらの治療法に対する予後不良因子であり、これらの治療法に抵抗性を示す腫瘍に対する新たなアプローチとして、- リポ酸など Warburg 効果の阻害に着目した薬剤を併用した治療法は有望と考えられた。なお、最近の研究で Warburg 効果を惹起する因子の一つに低酸素誘導因子 (HIF-1) がありその上流に PI-3K/Akt/mTOR 伝達系が存在し、AMP 活性化 protein kinase (AMPK) はこの両者を阻害できるため嫌気性解糖系の阻害が可能であり、メ

トホルミンは AMPK を活性化できることから、Warburg 効果の抑制点で大きく期待される薬剤の一つである。

2. 研究の目的

口腔癌細胞に対する DCA、- リポ酸あるいはメトホルミンの Warburg 効果阻害作用を HIF-1、PI-3K/Akt/mTOR、AMPK の発現や、乳酸の産生への影響を検索することで評価する。次に DCA、- リポ酸あるいはメトホルミンの Warburg 効果の阻害効果を指標に、既存の抗癌剤の Warburg 効果への影響を検索し、Warburg 効果阻害に着目したより効果的な化学療法のレジメンを検討し、新規治療法の開発を試みる。

3. 研究の方法

(1) 細胞および培養法
実験にはヒト口腔扁平上皮癌細胞株である HSC2 細胞、HSC3 細胞、HSC4 細胞を用いた。それぞれの細胞は 100mm プラスティックペトリ皿 (Becton Dickinson Co., Franklin Lakes, NJ, USA) で、10% 牛胎児血清 (Fetal Bovine Serum; 以下 FBS と略記; Thermo Fisher scientific Inc., Waltham, MA, USA)、100 μ g/ml ストレプトマイシン (Thermo Fisher scientific)、100 U/ml ペニシリン (Thermo Fisher scientific)、0.25 μ g/ml アンホテリシン B (Thermo Fisher scientific) を含むダルベッコ改変イーグル最小必須培地 (以下 DMEM と略記; Sigma Aldrich., St. Louis, MO, USA) を増殖培養液として用い、空气中に 5% の割合で炭酸ガスを含む培養器内で、37 $^{\circ}$ C にて培養した。

(2) 細胞増殖能の検索

細胞の増殖能は、3-(3,4-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (以下 MTT と略記; Sigma Aldrich) 法を用いて検討した。すなわち、96 ウェルマイクロプレート (Becton Dickinson Co.) に 3×10^3 個の細胞を植え込んだ後、24 時間培養し、細胞がプレート上に接着するのを待って、未処理対照とともに設定した薬剤で処理を行い、48 時間培養後、最終濃度が 1 mg/ml となるように MTT 溶液を加え 37 $^{\circ}$ C、4 時間反応させ形成された MTT formazan を 100 μ l のジメチルスルホキシド (Dimethyl Sulfoxide; 以下 DMSO と略記; Sigma Aldrich) を用いて溶解し、マイクロプレートリーダー (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) にて、OD 490 nm で吸光度を測定することにより生細胞数を評価することにより、最も顕著な細胞増殖抑制効果を発現する併用療法を検索する。

(3) TUNEL

DeadEnd™ Colorimetric TUNEL System (Promega) を用い通法に従って行った。すなわち、未処理対照とともに設定した薬剤で処理を行った細胞を、4% パラホルムアルデヒドを用いて固定し、親水化を行い、タンパク分解処理を行い、TdT 溶液にて 37 $^{\circ}$ C、10 分間反応させ 3% 過酸化水素水を含む溶液にて内因性ペルオキシダーゼを不活性化したのち、ビオチン化 dUTP 標識抗体 (和光純薬) で 37 $^{\circ}$ C、10 分間反応させ、DAB 溶液で発色させ、ヘマトキシリンで対比染色を行い、脱水、透徹後鏡検し、DNA 断裂を示す細胞を検索した。またマウス背部皮下腫瘍組織に対しては、10% 中性緩衝ホルマリンで固定後、パラフィン切片を作製し、脱パラフィン、親水化を行い、以降は同様にタンパク分解処理を行い、TdT 溶液にて 37 $^{\circ}$ C、10 分間反応させ 3% 過酸化水素水

を含む溶液にて内因性ペルオキシダーゼを不活性化したのち、ビオチン化 dUTP 標識抗体 (和光純薬) で 37 °C 10 分間反応させ、DAB 溶液で発色させ、ヘマトキシリンで対比染色を行い、脱水、透徹後検鏡し、DNA 断裂を示す細胞を検索した。

(4) Lactate colorimetric assay

5-FU (2.5 µg/ml)、metformin (4 mg/ml) それぞれ 48 時間、単独処理あるいは併用処理された細胞から上清中に産生される乳酸を検出するために lactate colorimetric assay (BioVision Inc., Milpitas, CA, USA) を用いた。すなわち上清中の L(+)-Lactate と特異的に酵素が反応して生じた生成物が、lactate probe と反応して、呈色することを利用して、吸光度計を用いて測定し、検量線を用いて定量を行った。

(5) Western blot 法

培養細胞の蛋白標品は蛋白抽出用 lysis buffer [20 mM Tris-HCl (pH7.4)、0.1% ドデシル硫酸ナトリウム (Sodium Dodecyl-sulfate; 以下 SDS と略記; 和光純薬)、1% Triton X 100、1% sodium deoxycholate] で処理して、調製した。蛋白濃度は、Bradford の方法に準じたマイクロアッセイ法 (Bio-Rad) により測定した。その後、5% β-メルカプトエタノール (Sigma Aldrich) を含む 50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH6.8) に、2% SDS、0.1% プロモフェノールブルー (片山化学、大阪)、10% グリセロール (和光純薬) を加えた loading buffer に混和して、10% アクリルアミドの分離ゲルを用いて、Laemmli の方法に準じてドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; 以下 SDS-PAGE と略記) を行った。泳動標品は Towbin らの方法に準じて polyvinylidene difluorid 膜 (以下 PVDF 膜と略記; Bio-Rad) に 100V、3 時間、氷冷下にて電氣的に転写し、この PVDF 膜を 5% スキムミルクを含むトリス緩衝生理食塩水 (Tris-buffered saline; 以下 TBS と略記) を用いて非特異的反応をブロッキングした。一次抗体として、TBS で 500 倍に希釈した抗-HIF-1 マウスモノクロナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA)、抗-mTOR ラビットポリクロナル抗体 (Cell Signaling Technology Inc, Danvers, MA, USA)、抗-Akt1 ラビットポリクロナル抗体 (Santa Cruz)、抗-AMPK ラビットポリクロナル抗体 (Cell Signaling Technology) と 4 にて一晩反応させた。続いて WesternBreeze Chromogenic Immunodetection System (Thermo Fisher scientific) を用いて、二次抗体、Chromogen と反応させることにより発色させたバンドを検出した。

(6) In vivo tumor growth assay

ヌードマウス背部皮下に 1×10^6 個の HSC2 を移植し、3 週間腫瘍の生着を待って 5-FU (10mg/kg)、metformin (200mg/kg) それぞれ単独あるいは併用治療 (腹腔内投与) を 4 週間行い、治療期間中に腫瘍体積を $0.5 \times (\text{長径}) \times (\text{短径})^2$ にて算出し、治療後に残存腫瘍を切除しホルマリン固定パラフィン包埋し、パラフィンブロックを作製した。なおコントロール群には生理食塩水を腹腔内投与した。

(7) 免疫組織学的検索

パラフィン包埋ブロックより作製した 4 µm の組織切片を通常に従い脱パラフィン後、マ

イクロウエーブ [0.1M クエン酸水溶液 (pH 6.0) 中にて 500W、5 分間処理] を用いて抗原賦活化を行い、3% 過酸化水素水により内因性ペルオキシダーゼ活性の除去を 30 分間行い、ブロッキング試薬にて 5 分間非特異的反応を阻止した後、一次抗体として、抗-HIF-1 マウスモノクロナル抗体 (Santa Cruz)、抗-mTOR ラビットポリクロナル抗体 (Cell Signaling Technology)、抗-Akt1 ラビットポリクロナル抗体 (Santa Cruz)、抗-AMPK ラビットポリクロナル抗体 (Cell Signaling Technology) をリン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate buffered saline; PBS) (-) により 100 倍希釈し、4、一晩反応させた。その後ポリマー試薬を室温にて 30 分間反応させ、DAB 発色液にて発色させ水洗した後、ヘマトキシリンにて対比核染色、脱水、透徹、封入を行った。なお、各ステップの洗浄には、PBS (-) を用いた。

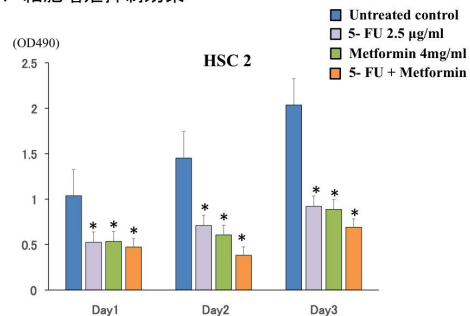
(8) 統計的解析法

各々の実験データの解析および統計処理については、Stat View (Abacus Concept Inc., Grand Rapids, MI, USA) を用いた。なおそれぞれ 5% 以下を有意と評価した。

4. 研究成果

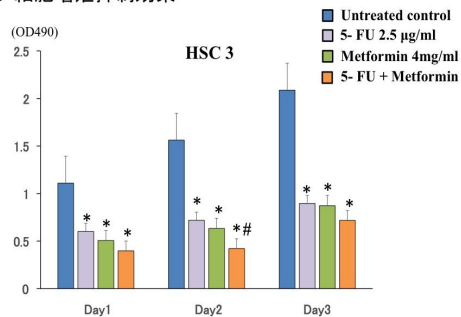
メトホルミン (0.01-10 mg/ml)、5-FU (0.1-4 µg/ml) は、口腔扁平上皮癌細胞に対して、それぞれ用量依存的な細胞増殖抑制効果を示したが (結果未掲載)、メトホルミン (4 mg/ml)、5-FU (2.5 µg/ml) の併用処理は、それぞれ単独処理と比較して HSC2 において有意な細胞増殖抑制効果を示した (図 1)。

図1 細胞増殖抑制効果



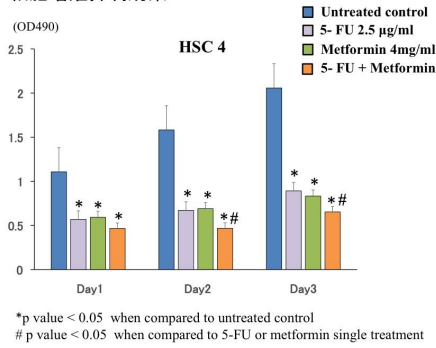
上記のメトホルミン (4 mg/ml)、5-FU (2.5 µg/ml) の併用処理による有意な細胞増殖抑制効果は、HSC2 細胞だけでなく、HSC3 および HSC4 細胞においても認められた (図 2、3)。

図2 細胞増殖抑制効果



*p value < 0.05 when compared to untreated control

図3 細胞増殖抑制効果



メトホルミン(4 mg/ml)、5-FU(2.5 µg/ml)の併用処理による細胞増殖抑制効果のメカニズムの一つとしてアポトーシスの誘導が関連しているか否かを、TUNEL法を用いて検索したところ、それぞれ単独処理と比較してメトホルミンと5-FUの併用処理にて有意にアポトーシスが誘導された(図4、5)。

図4 5-FUとメトホルミンの併用処理によるTUNEL陽性細胞

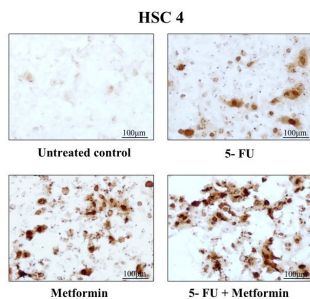
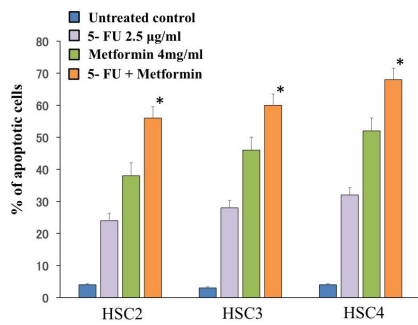
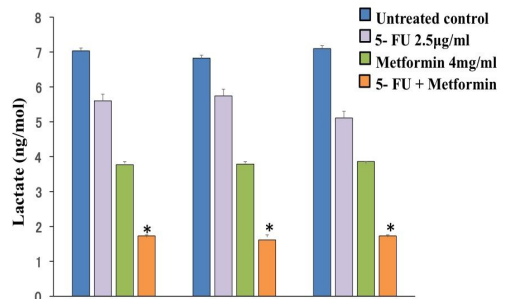


図5 5-FUとメトホルミンの併用処理によるアポトーシスの誘導



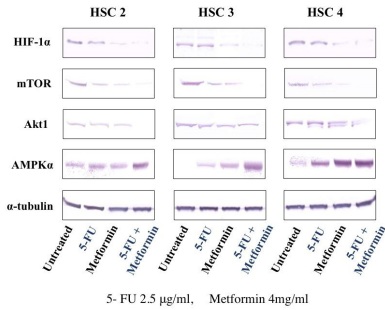
メトホルミン(4 mg/ml)、5-FU(2.5 µg/ml)の併用処理により、細胞から上清中に産生された乳酸を lactate colorimetric assay (BioVision)を用いて測定したところ、それぞれ単独処理と比較して、併用処理により有意に乳酸の産生が抑制された(図6)。

図6 5-FUとメトホルミンの併用処理による乳酸産生への影響



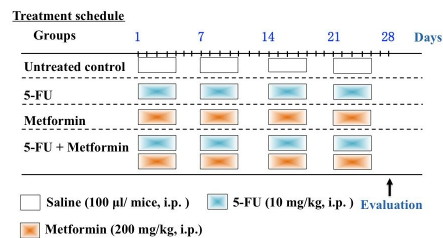
さらに、メトホルミン(4 mg/ml)、5-FU(2.5 µg/ml)の併用処理により、Warburg効果関連因子である HIF-1・mTOR・Akt1 の発現抑制、AMPK の発現増強を HSC2, HSC3, HSC4 細胞において認めた(図7)。

図7 5-FUとメトホルミンの併用処理のWarburg効果関連因子への影響



In vitroの系で認められたメトホルミンと5-FUの併用効果が in vivoの系においても認められるか否かを、ヌードマウスモデルを用いて検討した(図8)。すなわち実験群を未処理対照群、5-FU単独投与群、メトホルミン単独投与群、5-FUとメトホルミンの併用投与群とし、図8の投与スケジュールにて担癌ヌードマウスの治療を行った。

図8 5-FUとメトホルミンの併用療法のスケジュール



ヌードマウスモデルにおける抗腫瘍効果を検討したところ、メトホルミンあるいは5-FU単独でも見られたが、メトホルミンと5-FUとの併用療法により抗腫瘍効果は有意に増強

された(図 9、10)。

図9 5-FUとメトホルミンの併用療法終了時の残存腫瘍

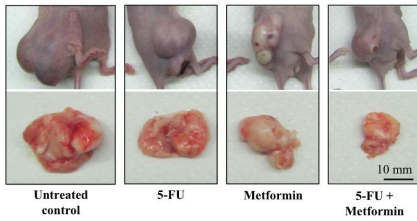
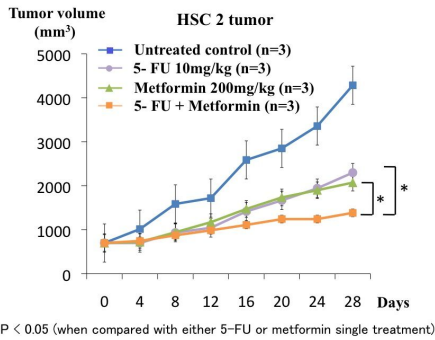
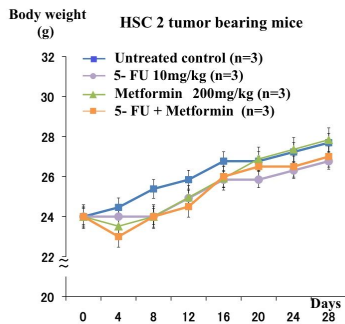


図10 5-FUとメトホルミンの併用療法による抗腫瘍効果



また、実験期間中、各実験群間で有意な体重減少を認めなかった(図 11)。

図11 5-FUとメトホルミンの併用療法の体重への影響



なお残存腫瘍における HIF-1、mTOR、Akt1、AMPK の発現を検索したところ、5-FU、メトホルミンそれぞれ単独と比較して、併用投与により、残存腫瘍においても HIF-1、mTOR、Akt1 の発現抑制、AMPK の発現増強が認められた(図 12A、B)。

図12A

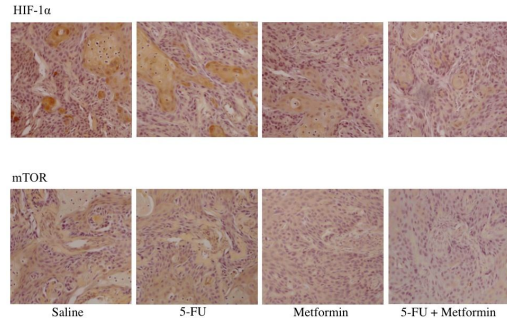
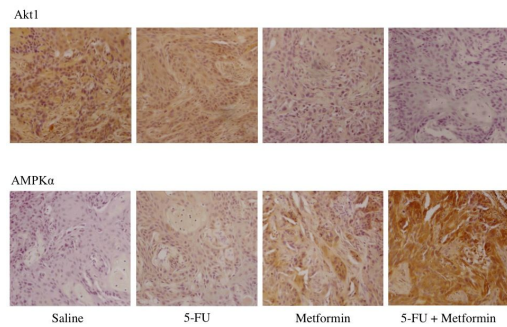
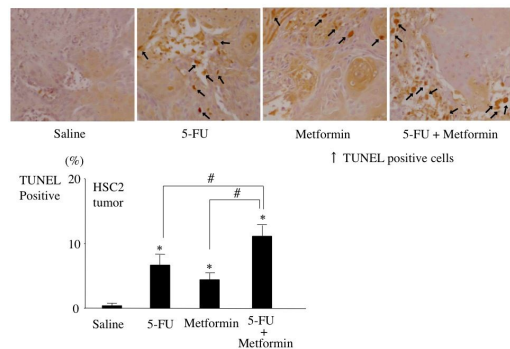


図12B



さらに、5-FU、メトホルミンそれぞれ単独投与にてアポトーシスは誘導されたが、併用にて顕著にアポトーシスの誘導が増強された(図 13)。

図13



以上の結果から口腔扁平上皮癌に対して、5-FU とメトホルミンの併用療法は、Warburg効果の阻害を介して顕著な抗腫瘍効果を発現する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Harada K, Ferdous T, Harada T, Ueyama Y. High expression of stathmin 1 is a strong prognostic marker in oral squamous cell

carcinoma patients treated by docetaxel-containing regimens. Clin Exp Med. 査読有り 2015 Nov 21(1-6).

Harada K, Harada T, Ferdous T, Takenawa T, Ueyama Y. Osteogenic cell fractions isolated from mouse tongue muscle. Mol Med Rep. 査読有り 2015 Jul;12(1):31-36. doi: 10.3892/mmr.2015.3350.

Ferdous T, Harada K, Kin T, Harada T, Ueyama Y. Efficacy of schedule-dependent metronomic S-1 chemotherapy in human oral squamous cell carcinoma cells. Int J Oncol. 査読有り 2013 Jul;43(1):271-279. doi: 10.3892/ijo.2013.1950. Epub 2013 May 20.

〔学会発表〕(計 4 件)

Ferdous T, et al. Metformin in combination with 5-fluorouracil suppresses tumor growth by inhibiting Warburg effect in human oral squamous cell carcinoma cells. International Symposium of the cancer research center of Lyon (CRCL), 21-23 September 2015, Lyon, France.

Harada K, et al. Elemental diet accelerates the recovery from oral mucositis and dermatitis induced by 5-fluorouracil through the induction of fibroblast growth factor 2. 37th ESPEN Congress, 5-8 September 2015, Lisbon, Portugal.

原田 耕志 他、口腔扁平上皮癌における RTP3 発現の Docetaxel 耐性ならびに予後への関与、第 13 回中四国口腔癌研究会 学術講演会、2014 年 10 月 24 日、ホテルグランドパレス徳島(徳島県・徳島市)

Harada K, et al. Establishment of Induced Cancer Stem Cells by Transfection of a Tongue Cancer Cell Line with Yamanaka 's Factor. The EACMFS, 23-26 September 2014, Prague Congress Center, Prague (Czech republic)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

原田 豊子 (HARADA , Toyoko)

山口大学・医学部・特別医学研究員

研究者番号：2 0 6 4 7 9 3 7