

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19791511

研究課題名 (和文) 口腔癌治療へのメシル酸イマチニブの応用

研究課題名 (英文) Apply to imatinib in oral cancer treatment

研究代表者

青田 桂子 (AOTA KEIKO)

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：70437391

研究成果の概要：

ヒト慢性骨髄性白血病において癌遺伝子として機能している Bcr-Abl を分子標的薬としたメシル酸イマチニブ(グリベック)が臨床応用され、その有用性が示された。グリベックは Bcr-Abl 以外にも c-Kit、血小板由来増殖因子受容 (PDGFR) の活性阻害を有している。本研究では、口腔扁平上皮癌に対するグリベックの抗腫瘍活性の有無について検討した。

その結果、グリベックは口腔扁平上皮癌に対して抗腫瘍活性を発揮する可能性が示唆されたが、その効果は多様であるため、臨床応用を試みる際には治療前の感受性診断法の確立が必須であると考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	0	1,800,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	450,000	3,750,000

研究分野：歯学

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、メシル酸イマチニブ

1. 研究開始当初の背景

口腔癌は主に手術により治療されるが、切除量に比例して術後の生活の質は低下する。よって、特に進行癌に対しては手術を用いない新規治療法の開発が急務である。

最近、マウスで単一の癌遺伝子を分子標的

にするのみで骨肉腫等の難治性悪性腫瘍の分化誘導による治癒が観察され、癌遺伝子への依存が癌のアキレス腱となることが示された (Jain M, et al. Sustained loss of a neoplastic phenotype by brief inactivation of MYC. Science 297 (5578):

102-104, 2002)。

ヒトでも慢性骨髄性白血病において癌遺伝子として機能している Bcr-Abl を分子標的としたメシル酸イマチニブ (グリベック) が臨床応用され、その有用性が示されている (Druker BJ, et al. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. N Engl J Med 344 (14): 1031-1037, 2001)。

グリベックは Bcr-Abl 以外にも c-Kit、血小板由来増殖因子受容体 (PDGFR) の活性阻害効果を有しており、その阻害効果は PDGFR > c-Kit > Bcr-Abl の順になっており、PDGFR に対する阻害効果が最も強い。また、グリベックは既に c-Kit 陽性消化管間質腫瘍の治療にも適用され、その有用性が確認されている (Dagher R, et al. Approval summary: imatinib mesylate in the treatment of metastatic and/or unresectable malignant gastrointestinal stromal tumors. Clin Cancer Res 8 (10): 3034-3038, 2002)。

国内外でもグリベックの PDGFR 阻害活性による甲状腺癌、乳癌、子宮頸癌、前立腺癌、非小細胞肺癌、大腸癌、脳腫瘍に対する抗腫瘍効果が確認されており、また唾液腺癌に対してもその抗腫瘍効果が報告されている。特に前立腺癌、大腸癌では血管新生阻害効果による抗腫瘍活性が明らかにされており、あらゆる悪性腫瘍治療への応用が期待される。

口腔癌組織においても血小板由来増殖因子 (PDGF) の高発現とその腫瘍血管新生への関与が既に明らかにされている (Li C, et al. Microvessel density and expression of vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor, and platelet-derived endothelial growth factor in oral squamous cell carcinomas. Int J Oral Maxillofac Surg 34 (5): 559-565, 2005)。

しかしながら、口腔癌におけるグリベックの抗腫瘍効果に関する基礎的研究はなされていない。したがって、本研究では PDGF および PDGFR を発現する口腔癌に対するグリベックの抗腫瘍活性とその分子メカニズムを明らかにする。

2. 研究の目的

21 世紀の癌医療の重要な治療ツールの一つは分子標的薬である。したがって、分子標的薬の適正な使用は口腔癌の治療成績向上に寄与できると考えられる。しかしながら、現在市販されている分子標的薬は全て他臓器に発生する転移性進行癌を適応疾患とし

ており、口腔癌治療に使用できる分子標的薬は存在しない。

本研究では、分子標的薬の適応を癌の発生する臓器に関わらず標的分子の発現および活性により決定できることを明らかにする。分子標的薬の作用機序を考慮するとその抗腫瘍効果は発生臓器に関わらず、標的分子の活性にある程度依存して増殖している腫瘍であれば期待できる。

グリベックは Bcr-Abl の活性阻害剤として開発された分子標的薬である。しかしながら、グリベックは標的分子である Bcr-Abl の他に c-Kit や PDGFR の活性化をも阻害することが明らかとなっている。口腔扁平上皮癌および唾液腺癌組織を用いてグリベックの標的分子である PDGFR、c-Abl、c-Kit の発現および局在を明らかにしたのち、培養ヒト口腔癌細胞株、初代培養ヒト口腔癌由来間質細胞、培養ヒト血管内皮細胞株を用いてグリベックの細胞増殖に与える影響を検討する。特に、培養ヒト口腔癌細胞株ではグリベック高感受性株と耐性株を分類し、ヒト口腔癌ヌードマウス背部皮下異種移植モデルを用いてグリベック単独および放射線併用の抗腫瘍効果について評価する。さらに、グリベックの抗腫瘍活性の分子メカニズムをマイクロアレイ解析により明らかにする。最終的に、口腔癌治療へのグリベック応用の可否を明らかにする。

3. 研究の方法

ヒト不死化角化上皮細胞株および培養ヒト口腔扁平上皮癌細胞株より total RNA を抽出し、グリベックの標的分子である c-Abl、c-Kit、PDGFR の発現を検索する。

正常口腔粘膜組織 10 例および口腔癌組織 80 例のパラフィン切片を用いて、免疫組織化学染色にて PDGFRA、B、c-Abl、c-Kit、の発現を確認する。

同時に、培養ヒト口腔癌細胞、初代培養口腔癌組織由来間質細胞、正常ヒト成人皮膚微小血管内皮細胞を 6-well プレートに 5×10^4 個/well 植え込んだのち、グリベック (0.03-3 μ M) で処理し、4 日間培養したのち細胞数を実測し、それらの増殖能に与える影響を評価する。

特に、培養ヒト口腔癌細胞は 10 株用いて、グリベック感受性株と耐性株を分類する。つづいて、ヌードマウス背部皮下にヒト口腔癌細胞株を 1×10^6 個植え込み、腫瘍形成を確認したのち、グリベックを 4 週間連日 50 mg/kg 腹腔内投与する。放射線併用の場合は 1 週間隔で 4 Gy/回照射する。

腫瘍体積を計測することにより、*in vivo* における抗腫瘍活性を評価する。また、*in*

in vitro でグリベックが抗腫瘍効果を示さない口腔癌細胞（耐性株）を用いることにより、口腔癌に対する間接的な抗腫瘍効果（血管新生阻害）についても評価する。

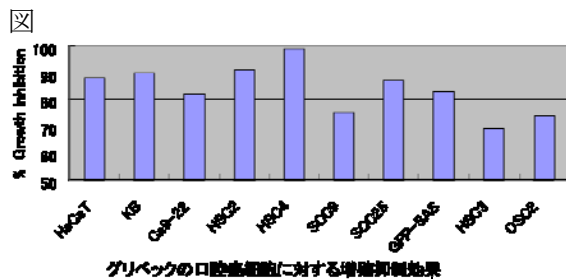
最後に、グリベック未処理および処理腫瘍組織より total RNA を抽出し、マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析を行う。グリベックの抗腫瘍効果の分子メカニズムの解明およびバイオマーカーの同定を試みる。

4. 研究成果

ヒト不死化角化上皮細胞株および培養ヒト口腔扁平上皮癌細胞株より total RNA を抽出し、グリベックの標的分子の発現を検索したところ、c-Abl の発現亢進が共通して認められたが、c-Kit の発現は全く認められず、PDGFR の発現は多様であった。次に、口腔扁平上皮癌組織を用いた免疫組織化学染色による検討では、c-Abl および c-Kit の蛋白質発現は全く検出されなかったが、PDGFRB の発現が 20% の症例に認められた。

さらに、グリベックの癌細胞増殖に与える影響を 10 種類の培養ヒト口腔扁平上皮癌細胞を用いて検討したところ、下図の如くその効果は多様であり、高い感受性を示す細胞株もあれば抵抗性を示す細胞株も認められた。なお、その感受性と標的分子との発現様式に相関は認められなかった。

以上の結果より、グリベックは口腔扁平上皮癌に対して抗腫瘍活性を発揮する可能性が示唆されたが、その効果は多様であるため、臨床応用を試みる際には治療前の感受性診断法の確立が必須であると考えられた。



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 2 件）

①Ogawa F, Takaoka H, Iwai S, Aota K, Yura

Y. Combined Oncolytic Virotherapy with Herpes Simplex Virus for Oral Squamous Cell Carcinoma. *Anticancer Research* 2008;28:3637-3646. 査読有.

②青田桂子, 中澤光博, 由井俊平, 千足浩久, 今井琢己, 由良義明. 口腔領域に発生した悪性黒色腫 10 例の臨床的検討. *日本口腔外科学会雑誌* 54:68-72 2008. 査読有.

〔学会発表〕（計 7 件）

①高橋 元, 赤垣俊輔, 三木哲英, 青田桂子, 由良義明. ビスフォスフォネートによって誘発されたと考えられる難治性頬粘膜潰瘍の 1 例. 第 20 回日本口腔科学会近畿地方会. 2008 年 11 月 22 日. 大阪.

②米川敦子, 岩井聡一, 孔 知恵, 青田桂子, 加藤逸郎, 墨 哲郎, 由良義明. The role of Wnt-beta-catenin pathway in the migration of oral squamous carcinoma cells. 第 67 回日本癌学会総会. 2008 年 10 月 28-30 日. 名古屋.

③中野旬介, 三木哲英, 青田桂子, 墨 哲郎, 松本 憲, 由良義明. 下顎智歯歯胚の感染により生じた Garre 骨髄炎の 1 例. 第 53 回日本口腔外科学会総会. 2008 年 10 月 21 日. 徳島.

④米川敦子, 岩井聡一, 孔 知恵, 青田桂子, 加藤逸郎, 墨 哲郎, 中澤光博, 由良義明. Wnt シグナルが口腔扁平上皮癌細胞の遊走能に及ぼす影響. 第 53 回日本口腔外科学会総会. 2008 年 10 月 21 日. 徳島.

⑤青田桂子, 墨 哲郎, 野田隆之, 竹内憲民, 太田嘉幸, 中澤光博, 由良義明. 含菌性嚢胞から発生したと考えられた扁平上皮癌の 1 例. 第 53 回日本口腔外科学会総会. 2008 年 10 月 21 日. 徳島.

⑥新谷素子, 青田桂子, 太田嘉幸, 藤田祐生, 墨 哲郎, 松本 憲, 由良義明. X 線検査で真菌塊が上顎洞異物を思わせたアスペルギルス症の 1 例. 第 39 回日本口腔外科学会近畿地方会. 2008 年 6 月 14 日. 神戸.

⑦三木哲英, 中野旬之, 青田桂子, 岩井聡一, 由良義明. C1-INH を投与せずに抜歯を行った遺伝性血管浮腫患者の 1 例. 第 62 回日本口腔科学会. 2008 年 4 月 17, 18 日. 福岡.

6. 研究組織

(1)研究代表者

青田 桂子 (AOTA KEIKO)
大阪大学・歯学部附属病院・医員
研究者番号：70437391

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし