

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791965

研究課題名(和文) 口腔癌における PDT の革新的治療法・基礎的研究

研究課題名(英文) The development innovative treatment of oral cancer by photodynamic therapy, and basic research.

研究代表者

中川 祥 (NAKAGAWA HIROSHI)

弘前大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：00529688

研究成果の概要(和文)：口腔領域における白板症、扁平苔癬等の疾患は前癌病変であり、再発率が高く、確立した治療法がない。再発率の高さは血管新生物質の関与が示唆され、新生血管物質産生を抑制することにより、根治的な PDT による治療法の確立にむけての基礎研究を行った。

その結果、再発につながる血管新生因子の遺伝子、タンパク質の発現を同定し、細胞増殖能、遊走能、管腔形成過程を抑制できることを確認した。

研究成果の概要(英文)：Leukoplakia and lichen planus in oral cavity are premalignant lesions, which are high rate recurrence in a long term, and the way of treatment has not established. The high rate of recurrence was suggested that the expression of angiogenesis factor. We investigated antitumor effect by NPe6 mediated PDT, inhibited the expression of angiogenesis factor.

As a result, we identified the gene and protein that contributes neoangiogenesis, and inhibited cell proliferation, migration, lumen formation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：口腔外科学一般

キーワード：口腔扁平上皮癌、PDT、NPe6(レザフィリン)

1. 研究開始当初の背景

口腔領域における白板症、扁平苔癬等の疾患は、上皮の異形成を伴う前癌病変である。その原因はストレス、喫煙、不適合義歯など、さまざまな因子に伴うため治療に苦慮する。主たる症状である疼痛は慢性的であり、咀嚼、嚥下に困難を伴い患者の QOL を著しく低下させる。これまで、口腔ケア、含嗽剤による洗

口、粘膜保護剤、鎮痛剤などの対症療法が主たるもので、治療法が確立しておらず、治療効果も乏しいのが現状である。

PDT は、外科的侵襲の少ない治療法として患者の QOL に配慮した治療であり、根治的な治療法としての可能性を持つ。問題は、短期間における PDT の治療成績は良好だが、長期間の追跡調査では再発率が高いことが挙げら

れる。その要因として、PDT に伴う血管新生物質の産生にあるといわれている。

申請者らは血管新生を抑制しつつ PDT の効果を減弱させない革新的な治療法の確立を目指し、基礎研究を行うものである。その結果、扁平上皮細胞由来である早期肺癌、皮膚癌、子宮頸部癌、皮膚癌等、他臓器における疾患においても、臨床応用できる可能性が高いものとなる。

口腔領域における PDT の基礎的研究は散見されるが、第二世代光増感物質 NPe6、発光ダイオードレーザーを使用した報告は少ない。さらに、血管新生阻害剤を使用した PDT の効果についての報告はない。申請者らは、これまで舌癌細胞において、PDT 施行後、p-38MAPK 経路を介した VEGF 発現を明らかにし、p-38MAPK 抑制剤を使用することで、VEGF 発現を抑制できることを報告した（研究業績 1）。今回、申請者らは血管新生因子、サイトカインの発現を網羅的に検索、血管新生を抑制しつつ PDT の効果を減弱させない革新的な治療法の確立を目指す基礎的研究を行うものである。

2. 研究の目的

PDT の作用機序は、光感受性物質とレーザー照射局所の組織内に活性酸素が産生され腫瘍細胞の崩壊をもたらすことにある。その際、血管新生因子、サイトカイン、survival molecules の発現を認める。

これまで、申請者らは、PDT 施行後の VEGF の発現及びその経路の報告を行った。今回は、舌癌細胞、歯肉癌細胞に Npe6 を使用した PDT を施行し、血管新生因子、サイトカインの発現を網羅的に検索、遺伝子レベル、タンパク質レベルで証明し、その発現経路において抑制を行うことにより、血管新生抑制、再発率軽減の可能性を明らかにすることである。

口腔領域における PDT の基礎的研究は散見されるが、第二世代光増感物質 NPe6、発光ダイオードレーザーを使用した報告は少ない。さらに、血管新生阻害剤を使用した PDT の効果についての報告はない。本研究は、再発率低減を目的に行う PDT の基礎的実験であり、他臓器における表層固形癌の治療にも臨床応用できる可能性の高い、大変意義の大きい研究である。

今回、申請者らは血管新生因子、サイトカインの発現を網羅的に検索、血管新生を抑制しつつ PDT の効果を減弱させない革新的な治療法の確立を目的に基礎的研究を行うものである。

3. 研究の方法

平成 21 年度

1. 細胞の培養 ・ N p e 6 濃度、レーザー照射条件

市販されている HSC-3(舌癌：高転移性)、HSC-4(舌癌：低転移性)、Ca9-22(歯肉癌)の各種口腔癌細胞を培養する。これまでの実験で明らかにした Npe6 濃度、レーザー照射量で刺激を加え、一定時間後に培養癌細胞から Total RNA を回収し、MLLV を逆転写酵素として一本鎖 cDNA を合成する。代表的な血管新生因子である VEGF、PDGF、HGF の発現について、適宜、定量 PCR やウエスタンブロットで検討し、各癌細胞の応答する最適条件を検討する。

2. cDNA マイクロアレイによる各癌細胞崩壊後の血管新生因子、サイトカインの検索

1. により検討した最適条件により癌細胞の cDNA マイクロアレイを行い、他の血管新生因子（可溶性増殖因子、細胞外マトリックス構成因子）、発現上昇するサイトカインなどを網羅的に検討する。

3. PDT による癌細胞崩壊に伴う血管新生因子やサイトカイン mRNA 発現の検討

cDNA マイクロアレイの結果をもとに、発現上昇する他の血管新生因子やサイトカインについて定量 RT-PCR により mRNA 発現の検討を行なう。

4. 目的遺伝子のタンパク産生の検討

3. より発現上昇した遺伝子のタンパク産生を ELISA やウエスタンブロットで検討する。また、適宜、シグナル伝達経路のタンパク質に関してもウエスタンブロットで検討する。

平成 22 年度

1. 血管内皮細胞 (HUVEC) を用いた細胞増殖試験

平成 21 年度に解析を行い発現上昇した因子、サイトカインを HUVEC に添加し、細胞増殖率を算出する。

2. 血管内皮細胞 (HUVEC) を用いた細胞遊走試験

平成 21 年度に解析を行い、発現上昇した因子、サイトカインを添加し細胞遊走能を計測する。

3. 血管内皮細胞 (HUVEC) を用いた管腔形成試験

平成 21 年度に解析を行い、発現上昇した因子、サイトカインを添加し細胞遊走能を計測する。

以上の実験をもとに、抗腫瘍効果を示す抑制剤の添加を行い、細胞増殖アッセイ、細胞浸潤アッセイにより口腔癌細胞の増殖数を測定、比較検討し、抗腫瘍効果、再発率抑制の検討を行う。

4. 研究成果

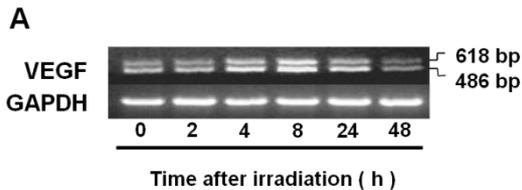
口腔癌由来細胞株である HSC-3(舌癌：高転移性)、HSC-4(舌癌：低転移性)、Ca9-22(歯

肉癌)について、血管新生因子の発現を認める至的條件を明らかにした。

HSC-3 細胞株では、mRNA 発現は time dependent, dose dependent に認められ、PDT 照射 8h 後に最大発現を認めた。また、タンパク質発現では、lysate、培養上清中の検討では、培養上清中に 24h 後に最大発現が認められた。HSC-4 細胞株、Ca9-22 細胞株では、mRNA の発現に時間の相違があるもの、同様の結果が得られたが、PDT-NPe6 では、高転移性である HSC-3 株における VEGF、PDGF、HGF 発現が他の細胞株における発現よりも顕著であり、高転移性であることが裏付けられる結果となった。

cDNA マイクロアレイを行うにあたり、HSC-3 細胞株 5.0X10⁶cells に対し、今回の実験で明らかになった至適条件である Npe6 濃度 10 μg/ml、PDT 照射量 10 J/cm² の条件で照射した刺激群と control 群に分け PDT-NPe6 施行後の血管新生遺伝子発現を比較検討した。

その中で、IL-8、EREG、VEGFA、TNF、IL-1β、CXCL1、6 個の遺伝子の強発現を認めた (T:N ratio>2.0)。



Well	Symbol	Group 1	Group 2	Group 3
D09	IL8	1.4499	0.7351	9.3437
C03	EREG	1.6088	0.5571	4.6719
G11	VEGFA	1.5326	1.2977	3.7947
G09	TNF	2.2284	0.9434	2.3685
D07	IL1B	1.2363	0.5021	2.3359
B01	CXCL1	1.0913	1.0541	2.0056

6 個の遺伝子発現を定量 PCR やウエスタンブロットで検討し、その中から 3 個の有力な血管新生因子を同定した。また、発現経路を検索し、各種抑制剤の効果を mRNA 段階で比較検討した。上記 3 種を使い、申請者が明らかにした p38MAPK 阻害剤である SB203580 に着目し、血管内皮細胞を用いた細胞増殖試験、細胞遊走試験、管腔形成試験を行い、血管新生阻害機序について解析を行った。細胞増殖能試験では、HSC-3 細胞株において、優位な

細胞増殖抑制を認め、BD Biocoat の濃度勾配用培養スライドを使用した遊走能試験では、有意差は認められなかった。また、BD Biocoat の血管内皮細胞チューブ形成アッセイシステムを使用した管腔形成試験では、有意差が認められた。また、口腔癌に対する治療薬として使われている UFT を使用しての血管新生抑制効果を検討した。細胞増殖能試験では、HSC-3 細胞株において、優位な細胞増殖抑制を認め、BD Biocoat の濃度勾配用培養スライドを使用した遊走能試験では、有意差を認めた。また、BD Biocoat の血管内皮細胞チューブ形成アッセイシステムを使用した管腔形成試験では、有意差が認められた。

テガフルとウラシルの合剤である UFT は *in vitro* では 5-FU と GBL (γ-butyrolactone) と GHB (γ-hydroxybutyricacid) に分解されるが、それぞれの細胞障害性、遊走能抑制、管腔形成抑制への効果については今後、検討に値する課題である。細胞増殖アッセイでは顕著な抑制を示すことが明らかになった。

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 0 件)

[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◇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

中川 祥 (NAKAGAWA HIROSHI)
弘前大学・医学部付属病院・医員
研究者番号：00529688

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：