

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21792029

研究課題名(和文) 口腔扁平上皮癌における $\text{Na}^+ - \text{K}^+ \text{ATPase}$ の機能解析研究課題名(英文) **Evaluation of the anticancer activities of Na^+/K^+ -ATPase inhibitor, sanguinarine in human oral squamous cell carcinoma cell lines**

研究代表者

渡辺 仁資 (WATANABE HITOSHI)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：90384304

研究成果の概要(和文)：

口腔癌治療は、外科療法・放射線療法・化学療法の集学的治療が標準治療であるが、審美性や機能性の温存という見地から外科療法による十分な切除範囲を設定することが困難な場合も多い。そのため化学療法の重要性は高く、新薬の開発が期待されている。現在、その開発は癌細胞の生物学的特性に基づいた分子標的薬が主流となっている。現在までに様々な癌に対して数多く開発され、ある種の癌腫に特異的、顕著な効果を示すものが確認されたが、口腔扁平上皮癌に対して効果を示す特異的な分子標的治療薬の報告は少ない。われわれは分子標的治療阻害剤キットを使用し、分子標的治療剤の効果を網羅的に解析したところ、9種類の口腔扁平上皮癌細胞株に対して $\text{Na}^+ - \text{K}^+ \text{ATPase}$ 阻害剤が全ての口腔扁平上皮癌細胞株で顕著な効果を認めた。すなわち、口腔癌の分子標的治療薬として $\text{Na}^+ - \text{K}^+ \text{ATPase}$ の阻害剤が有効である可能性が示唆された。さらにわれわれは口腔扁平上皮癌由来細胞株である SAS 細胞において $\text{Na}^+ - \text{K}^+ \text{ATPase}$ の阻害剤の一つである Sanguinarine の抗腫瘍効果を確認したところ、濃度依存的に増殖・浸潤抑制効果を認めた。しかし細胞外基質における接着性においては著明な抑制効果を示さなかった。また Caspase3/7 の活性化、PARP の断片化、および核 DNA の断片化を惹起し、Apoptosis 関連タンパクである Bcl-2 の減少、Bax の増加を認め、著明な Apoptosis 誘導効果を示した。この結果より、Sanguinarine $\text{Na}^+ - \text{K}^+ \text{ATPase}$ の阻害剤が口腔扁平上皮癌に対する新たな治療薬になりうることを示唆された。

研究成果の概要(英文)：

The effects of benzophenanthridine alkaloids (QBA), known mainly as sanguinarine and chelerythrine, on the inhibition of cancer cell proliferation have been well established. Here, we demonstrated the antitumor activity of sanguinarine using *in vitro* assay systems in SAS, a human oral squamous cell carcinoma (OSCC) cell line. The anti-proliferative and -invasive effects were confirmed with IC_{50} values in the concentration range of 0.75-1.0 mM by MTT assay and invasive assay, respectively. Sanguinarine was also able to suppress cell anchorage-independent growth, whereas it did not affect the cells' adhering capabilities. Finally, we found that sanguinarine induces apoptotic cell death by activating caspase and the Bcl-2/Bax ratio. Taken together, these results demonstrate that sanguinarine, sodium pump (Na^+/K^+ -ATPase) inhibitor, is a potential inhibitor of tumorigenesis and suggest that it may be valuable in the development of new anticancer drugs for the treatment of oral squamous cell carcinoma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
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：歯学・外科系歯学

キーワード：Na⁺-K⁺-ATPase

口腔扁平上皮癌

1. 研究開始当初の背景

分子標的治療薬は癌細胞に特異的に作用するため、従来の抗癌剤による化学療法に比べ、より効果的で副作用の少ない治療と言える。そのため、新たな化学療法薬として近年注目されており、いくつかの分子標的阻害剤が臨床応用で一定の効果を上げている。われわれは、190種類の分指標的阻害剤を網羅的に解析できる分子標的阻害剤キットを用い口腔扁平上皮癌細胞に対するスクリーニングテストを行ったところ、ATP合成酵素であるNa⁺-K⁺-ATPaseで多くの癌細胞に対して特異的な抗腫瘍効果を認めた。そこで、本研究において口腔癌組織または細胞のNa⁺-K⁺-ATPaseの発現と機能を解析するとともに、抗腫瘍効果におけるNa⁺-K⁺-ATPaseの役割を評価し、これを標的とした新たな口腔癌の治療や予後因子として貢献できるかどうか検討する

2. 研究の目的

細胞のATP合成に関与するNa⁺-K⁺-ATPaseの口腔扁平上皮癌における発現とその役割について検索し、その制御が抗腫瘍効果に有用であるか検討するものである。これらを解析することにより、口腔癌細胞特異的に作用し、高い抗腫瘍効果を発揮する分子標的治療薬としての開発を試みることを目的とする。

3. 研究の方法

ヒト口腔扁平上皮癌由来細胞株であるSAS細胞を使用し、MTT assay・Colony formation assayにて細胞増殖抑制効果の検討を行った。また、Invasion assay・Adhesion assayにて浸潤・接着抑制効果を、さらにDNA Ladder・TUNEL assay・Caspase assay・Western BlottingにてSanguinarineのApoptosis誘導効果について検討を行った。

4. 研究成果

(1) 文部科学省がん特定・統合がん「化学療法基盤情報支援班」より発表された分子標的治療阻害剤キットを用い、9種類の口腔扁平上皮癌細胞株に対して190個の阻害剤の抗腫瘍効果についてスクリーニングテストを行ったところ、Na⁺-K⁺-ATPase阻害剤が9種類全ての口腔扁平上皮癌細胞株で顕著な効果を示した。すなわち、口腔癌の分子標的治療薬としてNa⁺-K⁺-ATPaseの阻害剤が有効である可能性が示唆された。

<口腔癌細胞に対する分子標的治療阻害剤キットをもちいたスクリーニングテストの結果>

	HSC-2	HSC-3	HSC-4	SAS	neo	mutant	CA9-22	SCC25	SCC111
Quabaine	9	13.4	2.4	5.9	10.1	12	6.5	21	24
Sanguinarine	9	4	2.6	5	5.5	4.8	5.1	14.8	29.6

※数字はコントロールのgrowthを100としたときのgrowth rateを示す

(2) Na⁺-K⁺-ATPase阻害剤の一つであるSanguinarineの口腔扁平上皮癌に対する増殖抑制活性をMTT assay・Colony formation assayに確認した。IC₅₀はMTT assayでは0.75 uM(Fig.1a)、Colony formation assay(Fig.1b)では0.25-0.5 uMの間で確認できた。

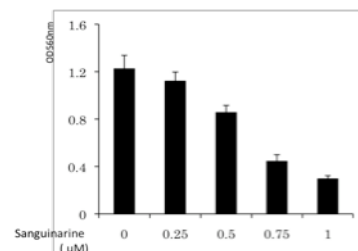


Fig. 1a

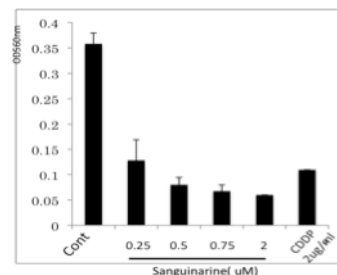


Fig. 1b

(3) Sanguinarineの浸潤抑制活性をBoyden chambers法で確認した。

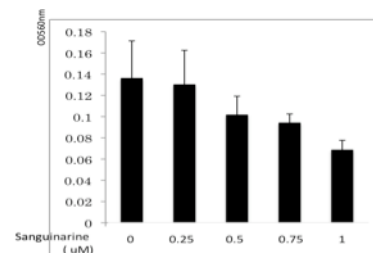


Fig. 2

Boyden chambers法は細胞がすり抜けられる程度の孔を空けたポリカーボネート膜の上下で上段に細胞と阻害因子を含んだ培養液を入れ、細胞遊走因子を含んだ下段の分画に移動した細胞数を計測するものであるが、SanguinarineはFig.2の如く用量依存的に浸潤抑制効果を示し、IC₅₀は1.0 uMであった。

(4) SAS 細胞の様々な細胞外基質に対する接着性においては Sanguinarine 添加が著明な抑制効果を示さなかった。(Fig. 3)

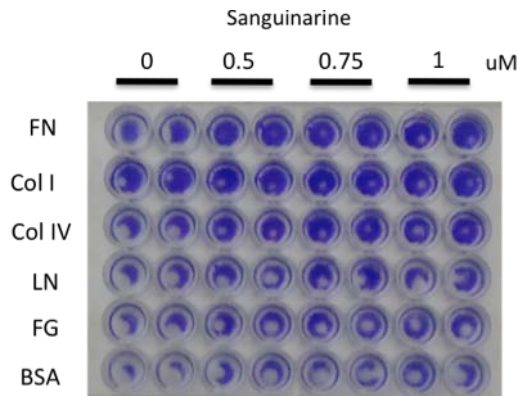


Fig. 3

(5) 細胞増殖抑制活性のメカニズムの詳細を明らかにするため、まず細胞のシグナル伝達 MAP キナーゼファミリーへの影響を調べた。その結果、3 大 MAP キナーゼ経路を全て 30 分以内に活性化することが明らかになった。(Fig. 4) これらの所見は Sanguinarine 添加によって細胞にチロシンキナーゼ型レセプターにより細胞伝達シグナルが入力することを示している。さらにこれらのシグナルが下流の Apoptosis シグナルに伝達されている可能性が示唆された。

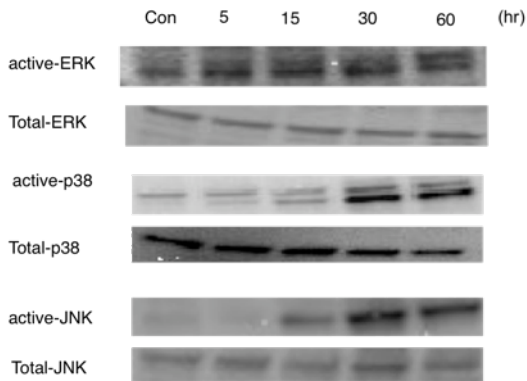


Fig. 4

(6) 前項目の可能性を確認する為に Sanguinarine 添加による Caspase 活性、核 DNA の断片化を確認することとした。その結果、Caspase3/7 の活性化 (Fig. 5 a)、核 DNA の断片化 (Fig. 5 b) を共に Sanguinarine 添加 0.75uM で惹起していた。また、Apoptosis 関連タンパクである Bcl-2 の減少、Bax の増加を認め (Fig. 5 c)、TUNNEL 染色でも直接的に Apoptosis 誘導の証拠を確認した。(Fig. 5 d)

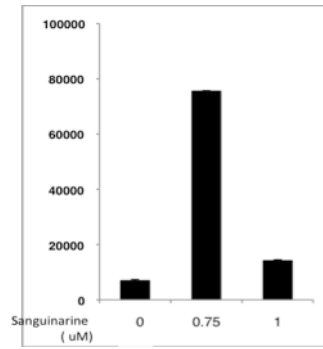


Fig. 5 a

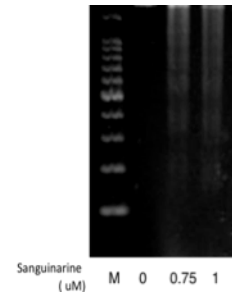


Fig. 5 b

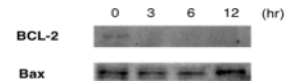
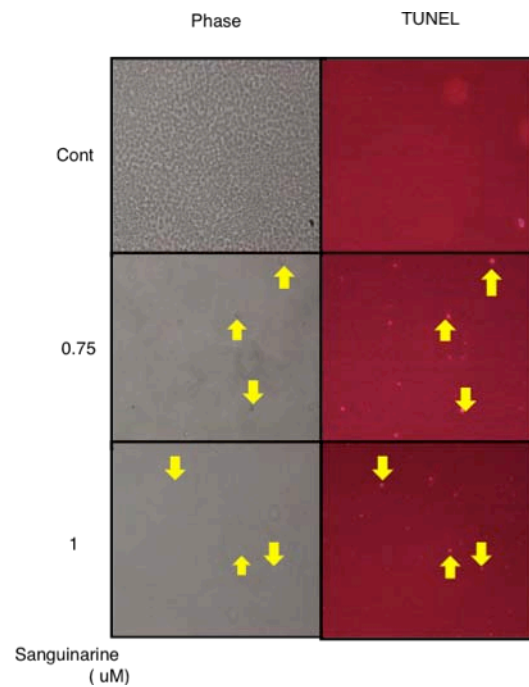


Fig. 5 c



黄色矢印がアポトーシスを生じた細胞

Fig. 5 d

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 11 件)

- 1) M. Ohashi, M. Hatori, T. Shirota, S. shintani Sentinel lymph node detection in oral cancer by fluorescence navigation method using indocyanine green Asian Journal of Oral and Maxillofacial Surgery 査読有 22 2010 85-87
- 2) T Kamatani, A Horie, H. Ishii, H. Kasahara, Y. Hamada, Y. Aida, S. Shintani. Primary malignant fibrous histiocytoma of the mandible: Report of a rare case with an immunohistochemical analysis Asian Journal of Oral and Maxillofacial Surgery 査読有 22 2010 212-215
- 3) S. shintani, H. Hamakawa, K. Nakashiro, T. Shirota, M. Hatori, M. Tanaka, Y. Kuroshita, Y. Kurokawa Friend leukaemia insertion (Fli)-1 is a prediction marker candidate for radiotherapy resistant oral leukaemia insertion (Fli)-1 is a prediction marker candidate for radiotherapy resistant oral squamous cell carcinoma Int J Oral Maxillofac Surg 査読有 39 2010 1115-1119
- 4) 渡辺 仁資、井上 理 金塚 文子、栗原 祐史、松浦 光洋、吉濱 泰斗、代田 達夫、羽鳥 仁志、新谷 悟 当科における過去3年間の口腔悪性腫瘍症例の臨床統計的検討 Dental Medicine Research 査読有 30 2010 57-62
- 5) S. Shintani, H. Hamakawa, Y. Ueyama, M. Hatori, T. Toyoshima Identification of a truncated cystatin SA-1 as a saliva biomarker for oral squamous cell carcinoma using the SELDI ProteinChip platform International Journal of Oral Maxillofacial Surgery 査読有 39 2010 439-443
- 6) 渡辺仁資、新谷悟、代田達夫 上顎骨部分切除後に唇・口蓋側へのベニアグラフトとインプラント治療を施行した1例 日本顎顔面インプラント学会雑誌 査読有 9 2010 55-58
- 7) H. Sato, M. Hatori, Y. Ando, Y. Kurihara, S. Takayama, T. Shirota, T. Tachikawa, S. Shintani S-1 mediates the inhibition of lymph node metastasis in oral cancer cells. Oncology Reports 査読有 22 2009 719-724
- 8) Y. Kurihara, Y. Watanabe, H Onimatsu, T. Kojima, T. Shirota, M. Hatori, D. Liu, S. Kyo, H. Mizuguchi, Y. Urata, S. Shintani, T. Fujiwara Telomerase-specific virotheranostics for human head and neck cancer Clin Cancer Res 査読有 15 2009 2335-2343
- 9) S. Yoshiba, D. Ito, T. Nagumo, T. Shirota, M. Hatori, S. Shintani Hypoxia induces resistance to 5-fluorouracil in oral cancer cells via G(1)phase cell cycle arrest Oral Oncol. 査読有 45 2009 109-115
- 10) Y. Kurihara, M. Hatori, Y. Ando, D. Ito, T. Toyoshima, M. Tanaka, S. Shintani Invasiveness of oral squamous cell carcinoma cell lines via down-regulation of matrix metalloproteinase-2 production and activation Clin Exp Metastasis 査読有 26 2009 425-432
- 11) S. Takayama, M. Hatori, Y. Kurihara, H. Ito, Y. Kinugasa, M. Iwase, D. Ito, T. Shirota, S. Shintani Inhibition of TGF- β 1 suppresses motility and invasiveness of oral squamous cell carcinoma cell lines via modulation of integrins and down-regulation of matrix-metalloproteinases Oncology Reports 査読有 21 2009 205-210

[学会発表] (計 7 件)

- 1) 塚本光, 椋代義樹, 南雲達人, 安田有沙, 近藤誠二, 新谷 悟: Na+K+ATPase 阻害剤 Sanguinarine の口腔扁平上皮癌に対する抗腫瘍効果. 第 47 回日本口腔組織培養学会学術大会. 高知, 2010 年 11 月 13 日
- 2) Yasuda A, kondo S, Nagumo T, Tukamoto H, Umezawa K, Shintani S: Anti-tumor Activity of Dehydroxymethylepoxyquinomicin against Human Oral Squamous Cell Carcinoma Cell Lines in vitro and in vivo. 9th Asian Congress on Oral and Maxillofacial Surgery. Kuala Lumpur Convention Centre Malaysia, 2010 年 11 月 25-28 日
- 3) Yoshiba S, Nagae G, Kaneda A, Tsuji S, Matsusaka K, Yagi K, Isagawa T, Tachikawa T, Shintani S, Aburatani H: Epigenomic profiling of oral cancer. 9th Asian Congress on Oral and Maxillofacial Surgery. Kuala Lumpur Convention Centre Malaysia, 2010 年 11 月 25-28 日
- 4) 渡辺仁資, 中村篤, 吉濱泰斗, 代田達夫, 羽鳥仁志, 中村雅典, 新谷 悟: インプラント植立部においてビスフォスフォネート療法による上顎壊死骨の 1 例. ICOI JAPAN

Implant Symposium. 横浜, 2010年5月15-16日

- 5) 渡辺仁資, 金塚文子, 栗原祐史, 代田達夫, 羽鳥仁志, 新谷 悟: 口腔癌の医療経済に対する検討. 第27回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会. 栃木, 2009年1月29-30日
- 6) 渡辺仁資, 新谷 悟, Vickram Srinivas, Shapiro Irving: 骨端軟骨における脱共役タンパク質(UCP3)の関与. 第63回日本口腔科学会学術集会. 浜松, 2009年4月16-17日
- 7) 栗原祐史, 大橋 勝, 渡辺仁資, 塚本 光, 吉濱泰斗, 代田達夫, 羽鳥仁志, 新谷 悟: 口腔癌の遠隔転移、重複癌検索におけるPET-CTの有用性. 第33回日本頭頸部癌学会/第30回 頭頸部手術手技研究会. ロイトン札幌, 2009年6月10-12日

[その他]

ホームページ等

<http://www.omfs-showa.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺 仁資 (WATANABE HITOSHI)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号: 90384304

(2) 研究分担者

新谷 悟 (SHINTANI SATORU)

昭和大学・歯学部・教授

研究者番号: 80294429