

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24593036

研究課題名(和文)ポリADP-リボース合成酵素(PARP)を分子標的とした口腔癌の新規治療法の開発

研究課題名(英文)Analysis of PARP as novel potential therapeutic targets in oral cancer

研究代表者

玉谷 哲也(TAMATANI, Tetsuya)

徳島大学・大学病院・講師

研究者番号：30274236

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文): 癌化学放射線療法の問題点は、癌細胞の抵抗性の獲得である。その主要な原因は細胞内のDNA修復経路の1本鎖修復に関わるポリ(ADP-リボース)合成酵素(PARP)の活性化と考えられている。そこで、口腔癌細胞でPARPの発現を検討すると、癌でPARPの発現が増強し、活性化していた。その発現は抗癌剤や放射線で処理すると、さらに増強されること、口腔癌においてPARPが抗癌剤・放射線抵抗性に関わる重要な分子であることを示した。PARP阻害剤は口腔癌細胞に対して抗腫瘍効果を示し、放射線や抗癌剤処理で相加的な増殖抑制効果が認められた。すなわち、PARPを標的とした複合的な口腔癌の新規治療法の可能性が示された。

研究成果の概要(英文): One of the main problem for treatment effects of chemoradiotherapy with cancer patients was resistance for chemotherapeutic agent or radiotherapy. Recently, the mechanisms of acquired resistant cancer cells were elucidated to cause the activation of Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP). PARP was clarified as molecular targets for breast cancer. The expression and activity of PARP were increased in oral squamous cell cancer (OSCC). We showed that PARP was the molecular targets of chemoresistance and radioresistance. PARP inhibitors inhibited the growth of OSCC. The treatment of PARP inhibitor or chemotherapeutic agent or radiation showed the additive growth inhibition effects. We demonstrated the possibility of new therapy for OSCC patients with PARP inhibition.

研究分野：口腔外科

キーワード：口腔癌

## 1. 研究開始当初の背景

癌化学放射線療法の大きな問題点は、一部の癌細胞が抗癌剤や放射線に対して抵抗性を示すことにある。最近、抗癌剤と放射線に対する抵抗性獲得のメカニズムの解明とそれを克服する方法の研究が注目されている。そのメカニズムとして、大きく2つの要因が考えられ、抗癌剤や放射線感受性を規定する癌細胞自身の遺伝子変化とエピジェネティックな変化である。特にその変化の中で、DNAダメージを修復する機構の活性化とAKT経路やNF- $\kappa$ B経路の活性化が重要な因子であると考えられている。近年、癌細胞では、ある特定のDNA損傷修復経路の機能が亢進し、それらの分子が化学放射線治療によって誘導・活性化されることが明らかにされつつある。しかし、DNA損傷修復経路に対する分子標的薬は、正常細胞に対して強い毒性があるため、ほとんど認可されていなかった。ところが、2009年に、予後不良なトリプルネガティブ(エストロゲンとプロゲステロン受容体、HER2がすべて陰性)乳癌を対象としたポリ(ADP-リボース)合成酵素(PARP)阻害剤の第2相臨床試験において、重篤な副作用もなく、生存期間が延長することが示された報告により、PARP阻害剤が大きく注目された(N Engl J M, 364:205-14, 2011)。PARPは1本鎖修復を行う重要な酵素でPARPを阻害することにより、DNA損傷修復が行われず、アポトーシスが誘導される(図2)。さらに、他のDNA修復経路の機能低下が存在していると、PARP阻害剤の抗腫瘍効果が増強されるsynthetic lethalityにより、BRCAの変異、あるいはPhosphatidylinositol-3 kinase (P13K)/AKTシグナル伝達経路のphosphate and tensin homolog(PTEN)の変異がある乳癌ではPARP阻害剤が著効したと報告されている(Nature, 434: 913-17, 2005、ENBO Mol Med, 1: 315-22, 2009)。一方、口腔癌では、PARP阻害剤に対する抗腫瘍効果の検討報告はほとんどない。また、DNA修復経路に関する研究報告も少ない。申請者らはマイクロアレイ解析の結果より、抗癌剤や放射線で処理された口腔癌細胞では、多くのDNA修復経路の遺伝子が誘導され、治療抵抗因子として作用していることを明らかにしている。そこで、口腔癌に対する化学放射線治療の抵抗性を解除し、抗腫瘍効果を増強するためにPARP阻害剤に着目した。一方、PARPは、DNA修復以外に、NF- $\kappa$ B活性を誘導する作用も有している。申請者らは、現在まで口腔癌細胞では転写因子NF- $\kappa$ Bが恒常的に活性化しているこ

と、放射線照射や抗癌剤治療によってその活性はさらに上昇すること、NF- $\kappa$ Bを抑制すると、腫瘍増殖が抑制されることを明らかにしてきた(Int J Cancer, 108: 912-921, 2004)。すなわち、PARP阻害剤を化学放射線治療に併用するとNF- $\kappa$ B活性の抑制も介し、さらに強い抗腫瘍効果が得られることが予測される。

## 2. 研究の目的

新たな口腔癌の治療法を確立するために、PARPを分子標的とし、既存の化学放射線治療と併用した複合的な治療戦略により、口腔癌の新規分子標的治療を確立させることを本研究の目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 当教室において樹立した培養ヒト口腔扁平上皮癌細胞であるBHY、B88、Hnt細胞とHSC、SAS、CAL27細胞を用いる。口腔癌細胞と正常口腔上皮細胞を用いてPARPの発現と活性を検討する。

(2) 癌細胞をPARP阻害剤で処理し、*in vitro*の細胞増殖抑制効果をMTT assayを用いて検討する。さらに、抗癌剤(5-FU, CDDP, TXT)あるいは放射線照射とPARP阻害剤と併用すると、相乗的に細胞増殖抑制効果が誘導されるか検討する。

(3) 造腫瘍性口腔癌細胞株をヌードマウス(各グループ5匹)の背部皮下( $5 \times 10^6$ 個細胞)或いは $1 \times 10^5$ 個細胞を咬筋内或いは舌に移植し、一週間後あるいは担癌ヌードマウスの腫瘍径が約5mm(図4)になった時点から、処置を行う。放射線照射、抗癌剤処理を行い、経時的な腫瘍体積の測定、リンパ節、肺転移の有無、生存期間、Tunel法による腫瘍組織のアポトーシスの誘導の測定、腫瘍内のPARPの発現の変化、ヌードマウスの体重測定を行う。

## 4. 研究成果

(1) ヒト扁平上皮癌細胞であるBHY、B88、Hnt、HSC、CAL27細胞と正常ヒト口腔粘膜上皮細胞でPARPの発現を検討すると、口腔癌でPARPの発現が増強し、活性化していた。

(2) 細胞および腫瘍内のPARPの発現と活性は、抗癌剤および放射線照射を行うと、アポトーシスが誘導されると同時に、NF- $\kappa$ Bの活性化を介してPARPの発現は増強した。

(3) また、PARP阻害剤は口腔癌細胞に対して抗腫瘍効果を示し、放射線照射や抗癌剤処理で相加的な増殖抑制効果が認められた。

## 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5件)

Makoto Kinouchi, Daisuke Uchida, Nobuyuki Kuribayashi, Tetsuya Tamatani, Hirokazu Nagai, Youji Miyamoto. Involvement of miR-518c-5p to Growth and Metastasis in Oral Cancer. PLoS One 9(12). E115936 2014 (査読有).

Uchida D, Kuribayashi N, Kinouchi M, Ohe G, Tamatani T, Nagai H, Miyamoto Y: Expression and function of CXCR4 in human salivary gland cancers. Clin Exp Metastasis 30:133-142, 2013 (査読有).

Tamatani T, Takamaru N, Hara K, Kinouchi M, Kuribayashi N, Ohe G, Uchida D, Fujisawa K, Nagai H, Miyamoto Y: Bortezomib-enhanced radiosensitization through the suppression of radiation-induced nuclear factor- $\kappa$ B activity in human oral cancer cells. Int J Oncol 42:935-944, 2013 (査読有).

Ohe G, Sasai A, Uchida D, Tamatani T, Nagai H, Miyamoto Y: Effect of soluble factors derived from oral cancer cells on the production of interferon- $\gamma$  from peripheral blood mononuclear cells following stimulation with OK-432. Oncol Rep 30:945-951, 2013 (査読有).

Kuribayashi N, Uchida D, Kinouchi M, Takamaru N, Tamatani T, Nagai H, Miyamoto Y: The role of metabotropic glutamate receptor 5 on the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 system in oral cancer. PLoS One 8:e80773, 2013 (査読有).

[学会発表](計3件)

Tetsuya Tamatani, Natsumi Takamaru, Makoto Kinouchi, Nobuyuki Kuribayashi, Daisuke Uchida, Hirokazu Nagai, Youji Miyamoto. Expression of

ABCG2, ALDH1A1, CD44, and CD44 variant 9 in human oral squamous cell carcinoma and its relationship with clinical factors. AACR Annual Meeting 2014. 2014.4.7. San Diego Convention Center, San Diego (USA)

玉谷哲也、高丸菜都美、木内誠、栗林伸行、内田大亮、永井宏和、藤澤健司、宮本洋二 口腔癌におけるNF- $\kappa$ B発現の臨床病理学的意義。第72回日本癌学会学術大会総会、パシフィコ横浜(神奈川県、横浜市), 2013.10.4.

Tetsuya Tamatani, Natsumi Takamaru, Makoto Kinouchi, Nobuyuki Kuribayashi, Daisuke Uchida, Hirokazu Nagai, Kenji Fujisawa, Youji Miyamoto. The expression of nuclear factor- $\kappa$ B in human oral squamous cell carcinoma and its relationship with clinical factors. AACR Annual Meeting 2013. 2013.4.9. Washington, D.C. Walter E. Washington convention center, Washington DC (USA)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

玉谷 哲也 (TAMATANI, Tetsuya)

徳島大学・病院・講師

研究者番号: 30274236

### (2)研究分担者

宮本 洋二 (MIYAMOTO, Youji)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号: 20200214

永井 宏和 (NAGAI, Hirokazu)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

又研究部・准教授  
研究者番号： 50282190

内田 大亮 (UCHIDA, Daisuke)  
獨協医科大学・医学部・准教授  
研究者番号： 20335798

大江 剛 (OHE, Go)  
徳島大学・病院・助教  
研究者番号： 60432762