

平成 29 年 5 月 15 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463041

研究課題名(和文) Angiogeninの分泌阻害剤 terrein配糖体の新規口腔癌治療薬への応用

研究課題名(英文) Application of terrain glucoside, an inhibitor of angiogenin secretion as a new drug for oral cancer therapy

研究代表者

岸本 晃治 (Kishimoto, Koji)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：40243480

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：生物学的活性をもつ真菌代謝産物である terrein の口腔癌に対する影響について研究を行った。Terrein は口腔癌細胞 HSC-2 と SAS からの angiogenin と VEGF の分泌を抑制した。また、terrein は両癌細胞の増殖を直接的に抑制した。さらに、ヌードマウスへ移植された HSC-2 腫瘍の増殖を腫瘍細胞と血管新生の抑制を介して阻害した。以上の結果から、terrein は口腔癌に対する新たな治療薬の候補と考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study assessed the effect of terrain, a bioactive fungal metabolite on oral cancer. Terrein inhibited angiogenin and VEGF secretions from oral cancer cells, both HSC-2 and SAS. Terrein also directly inhibited the proliferation both of the cancer cells. Furthermore, terrain inhibited a HSC-2 xenograft tumor growth in athymic mice through the inhibition of tumor cell proliferation and angiogenesis. These results suggest that terrein has a new lead compound for oral cancer therapy.

研究分野：口腔外科学

キーワード：terrein angiogenin 口腔癌 血管新生作用 腫瘍増殖抑制作用 新規口腔癌治療薬 angiogenin分泌抑制作用 VEGF分泌抑制作用

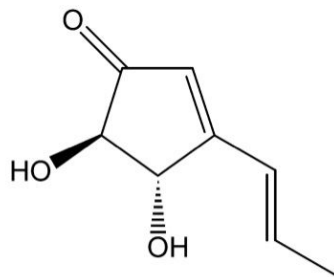
1. 研究開始当初の背景

1985年にハーバード大学医学部病理学講座 Dr. BL Vallee らにより世界で最初に分離された分子量 14 kDa のリボヌクレアーゼ活性を持つ血管新生蛋白 angiogenin (ANG) は、大腸癌、乳癌、前立腺癌など種々の癌組織でその発現が亢進しており、近年、癌分子標的として国内外で注目されている。

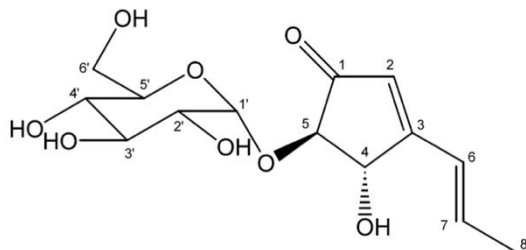
申請者らの研究成果によれば、癌細胞が産生する血管新生蛋白 ANG は、血管内皮細胞および癌細胞で核に移行し、リボソーム RNA の転写を促進することによって腫瘍血管新生作用と同時に癌細胞自身への直接的な増殖作用を有する。そして ANG は、特に口腔癌組織の低酸素環境下で強発現し、癌細胞から多量に分泌されるため、口腔癌治療の分子標的として有望と考えられる。

一方、真菌代謝産物から分離された、terrein および terrein 配糖体 (図 1) は、血管内皮細胞および前立腺癌細胞からの ANG 分泌を阻害し、水溶性であり細胞内で安定性がある特徴を持つ。しかし、现阶段では terrein および terrein 配糖体が数種の癌細胞に対して増殖抑制作用と ANG 分泌阻害作用を有することは確認されているが、そのメカニズムの詳細については明らかにされていない。

以上から、ANG の分泌阻害作用を有する terrein および terrein 配糖体は、口腔癌に対して有効に抗腫瘍作用を示し、新規口腔癌治療薬として応用できる可能性が考えられる。



Terrein の構造



Terrein 配糖体 (terrein-D-glucoside)

図 1

2. 研究の目的

本研究では、terrein および terrein 配糖体の口腔癌に対する抗腫瘍効果を評価するとともに、ANG 阻害作用を介する抗腫瘍効果のメカニズムを *in vitro* および *in vivo* で検討する。そして、terrein および terrein 配糖体が口腔癌に対して有効に抗腫瘍効果を示し、新規口腔癌治療薬として応用できる可能性をもつか否かを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) HSC-2 および SAS 培養口腔癌細胞における terrein による増殖抑制作用、ANG ならびに VEGF 分泌阻害作用の検討

両培養細胞の増殖、ANG と VEGF 分泌に対する terrein の IC50 をそれぞれ求める。

細胞増殖抑制は、MTT アッセイで求める。即ち、両細胞 10000 個を DME/F12+10%FBS に浮遊させ、それぞれ 96 穴マイクロプレート中で一晩培養する。そして、FBS なしの培養液に交換し、各濃度の terrein を加え、さらに 24 時間培養後、CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega) を用いて、Cell viability を測定する。また、培養上清に分泌された ANG と VEGF の量を、ELISA kit (R&D) を用いて測定する。

(2) ノードマウスを用いた HSC-2 口腔癌細胞皮下移植モデルにおける terrein の抗腫瘍効果の検討

1 群を 5 匹とし 5 週齢雄 BALB/C 系ノードマウスの背部皮下に HSC-2 細胞、500000 個を移植する。肉眼的に腫瘍が出現した日を 1 日目とし、terrein と対照として PBS を週 3 回皮下注射する。腫瘍の長径と短径を隔日で計測し、腫瘍体積を算出する。なお、terrein 7 mg (45 μmol)/kg body weight、週 3 回の皮下注射に設定する。

(3) 免疫組織化学染色

採取された腫瘍組織を 10% 中性緩衝ホルマリン溶液で固定後、パラフィン包埋した標本から厚さ 4.0 μm の連続切片を作製し、間接酵素抗体法 (Envision system, Dako) を用いて染色を行う。癌細胞および血管内皮細胞の核における ANG の発現を調べるために、抗 ANG 抗体 26-2F (希釈率 1 : 100) を使用する。また、抗 PCNA 抗体 (希釈率 1 : 200; Dako) を用い染色し、腫瘍増殖率を算出する。腫瘍内微小血管の同定には、抗 CD31 抗体 (希釈率 1 : 100; Abcam) を用い、VECTASTAIN Elite ABC Kit (Vector Lab) により血管内皮細胞の染色を行い評価する。

4. 研究成果

terrein 配糖体による増殖抑制作用、ANG ならびに VEGF 分泌阻害作用は、認められたがデータが安定しないため、terrein を用いた実験を中心に行った。

ヒト口腔癌細胞株 HSC-2 と SAS における ANG と VEGF 分泌および増殖に対する terrein の阻害活性を調べた結果、両細胞に対する

ANG と VEGF 分泌阻害作用 (IC<sub>50</sub> 25~30 $\mu$ M) および増殖抑制作用 (IC<sub>50</sub> 100 $\mu$ M) があることを *in vitro* で確認した (図 2、3)。

ヌードマウスを用いた HSC-2 細胞皮下移植モデルにおける terrein の抗腫瘍効果の検討では、terrein 45 $\mu$ mol / kg body weight、週 3 回の皮下注射で有意な増殖抑制作用を確認した。しかし、terrein 投与群で有意な体重減少や副作用は認められなかった (図 4)。

採取した腫瘍組織の免疫組織化学的検討から、terrein 投与群で、ANG 発現の減少、PCNA の発現の減少 (腫瘍増殖率の低下)、腫瘍内微小血管数の減少を認めた (図 5)。

以上の結果から、terrein は、直接的な腫瘍細胞増殖抑制作用に加え、ANG と VEGF 分泌抑制作用による腫瘍血管新生抑制作用を介する抗腫瘍作用も有すると考えられ、新規口腔癌治療薬として期待されることが示された。

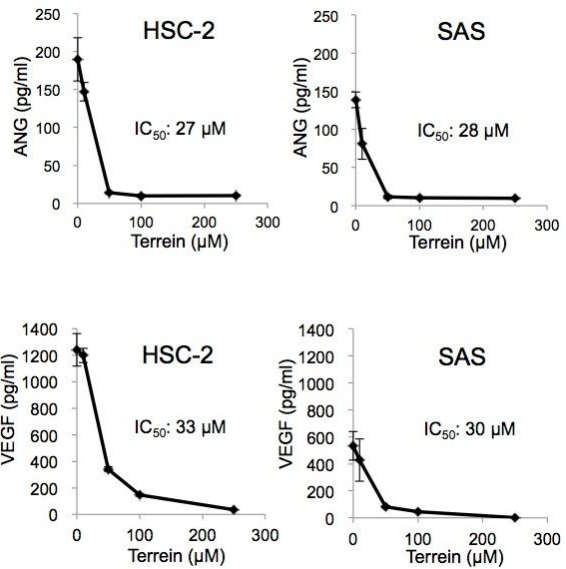


図 3 HSC-2 および SAS 細胞から分泌される ANG と VEGF に対する terrein の影響

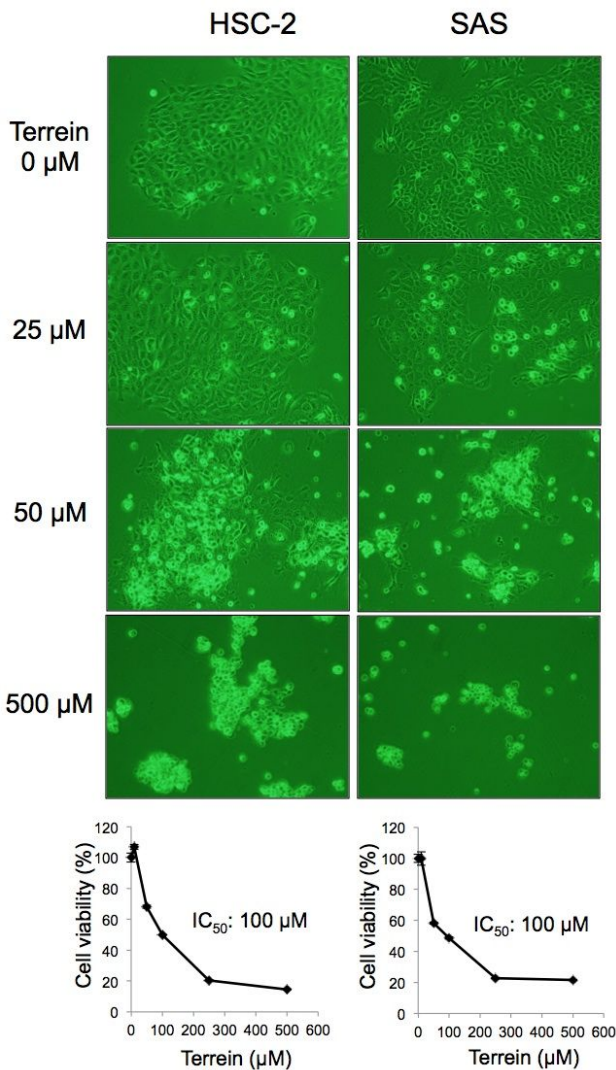


図 2 HSC-2 および SAS 細胞の増殖に対する terrein の影響

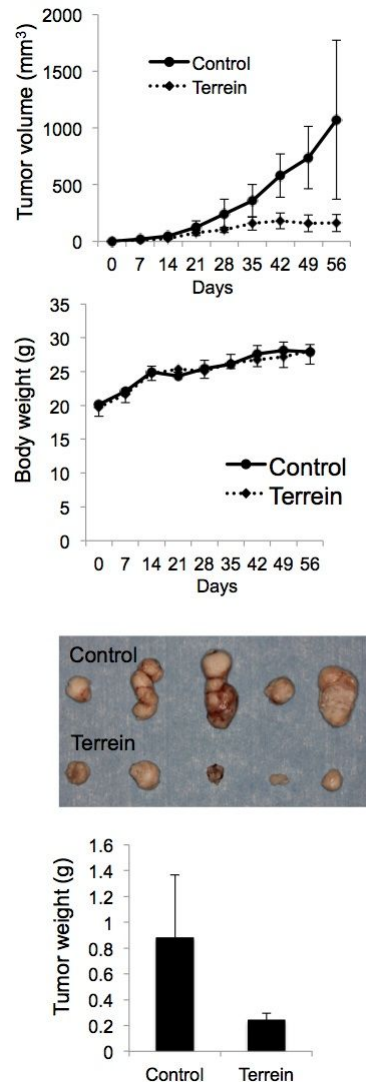


図 4 ヌードマウスに植え付けた HSC-2 細胞腫瘍の増殖に対する terrein の影響

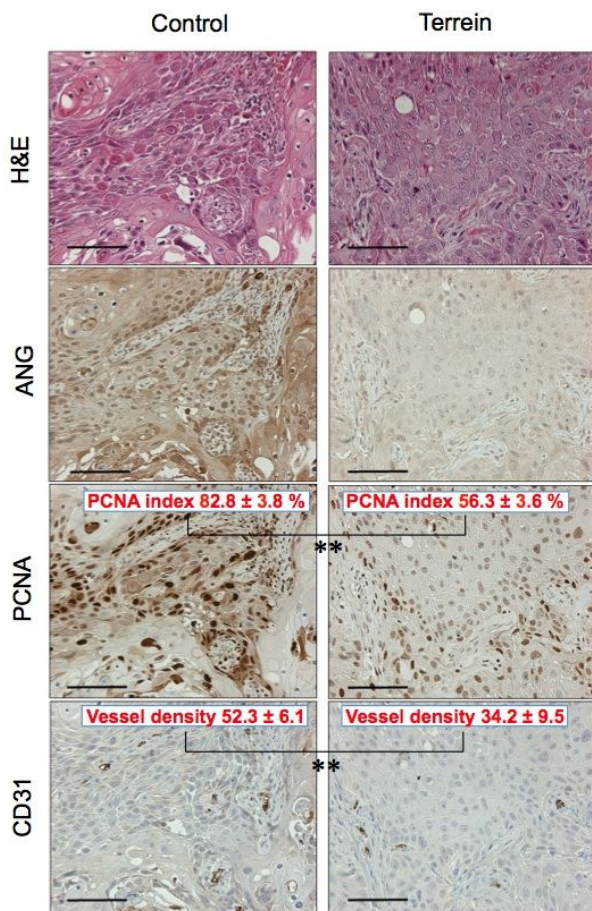


図5 HSC-2 細胞腫瘍の免疫組織化学的染色  
Bars, 100  $\mu$ m

## 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1件)

Akane Shibata, Soichiro Ibaragi, Hiroki Mandai, Toki Tsumura, Koji Kishimoto, Tatsuo Okui, Nur Mohammad Monsur Hassan, Tsuyoshi Shimo, Kazuhiro Omori, Guo-Fu Hu, Shogo Takashiba, Seiji Suga, Akira Sasaki. Synthetic Terrein Inhibits Progression of Head and Neck Cancer by Suppressing Angiogenin Production. Anticancer Res, 36, 2161-2168, 2016, 査読有,  
<http://ar.iiajournals.org/content/36/5/2161.abstract>

〔学会発表〕(計2件)

柴田 茜 6 名、新規血管新生阻害薬 terrein の口腔癌に対する抗腫瘍効果、第 62 回日本口腔科学会中国・四国地方部会、2014

年 10 月 25 日、徳島

岸本晃治 6 名 Angiogenin is a molecular target for oral cancer drug development. 22 Congress of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery, 2014 年 9 月 22 日-26 日, Prague (Czech Republic)

〔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

<http://okomfsweb.ccsv.okayama-u.ac.jp/index.php>

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

岸本 晃治 (KISHIMOTO Koji)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教  
研究者番号：40243480

(2)研究分担者

伊原木 聡一郎 (IBARAGI Soichiro)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教  
研究者番号：80549866

(3)連携研究者

吉岡 徳枝 (YOSHIOKA Norie)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教  
研究者番号：50362984