

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861724

研究課題名(和文) 口腔癌に対するNF- $\kappa$ Bを分子標的とした併用化学療法の開発

研究課題名(英文) Development of combination chemotherapy using NF-kappaB as molecular target for oral cancer

研究代表者

可児 耕一 (KANI, Koichi)

徳島大学・病院・助教

研究者番号：60709583

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：口腔癌細胞株B88細胞に対し、抗癌剤docetaxelとビタミンEの $\alpha$ -tocotrienolを併用することによって、著明な抗腫瘍効果が認められた。本研究においてはNF- $\kappa$ Bに着眼し、検討を行った。すなわち、docetaxelと $\alpha$ -tocotrienolの併用により、NF- $\kappa$ B活性は抑制された。さらにNF- $\kappa$ Bによって制御されるアポトーシス抑制タンパクの抑制、およびアポトーシス関連タンパクの発現を介してアポトーシスを誘導していると考えられた。本研究で得られた知見を基に、新規癌化学療法の開発に向けて研究を継続したいと考える。

研究成果の概要(英文)：A marked antitumor effect was confirmed by using anti-cancer agent docetaxel and  $\alpha$ -tocotrienol of vitamin E in combination with oral cancer cell line B88 cells. In this study, we focused on NF-kappaB and examined it. That is, the combination of docetaxel and  $\alpha$ -tocotrienol suppressed NF-kappaB activity. Furthermore, it was thought that it induces apoptosis through inhibition of apoptosis inhibitory protein controlled by NF-kappaB and expression of apoptosis-related protein. Based on the findings obtained in this study, we would like to continue our research toward developing novel cancer chemotherapy.

研究分野：口腔外科学

キーワード：臨床腫瘍学

### 1. 研究開始当初の背景

一般に癌に対する治療は、手術療法・放射線療法・化学療法が単独または併用されている。化学療法に関しては、癌の発生、伸展、浸潤、転移に關与する特定分子を標的とした分子標的治療法が急速に発展しつつある。従来よりわれわれは、癌細胞の増殖、浸潤および転移に關与する分子を解析し、口腔癌細胞や唾液腺癌細胞が正常口腔粘膜細胞や唾液腺細胞に比較して、転写因子 NF- $\kappa$ B 活性が増強していることを明らかにした (Cancer Lett 171: 1656-172, 2001.)。すなわち、このことは NF- $\kappa$ B が口腔扁平上皮癌に対する化学療法の重要な分子標的になりうることを示唆している。

一方、タキサン系抗癌剤である docetaxel の口腔癌治療における有効性が明らかにされ、その作用機序は docetaxel が細胞内微小管に作用し、細胞分裂を阻害することにより抗腫瘍効果を示す。しかしながら、この抗腫瘍効果には docetaxel によって誘導される NF- $\kappa$ B の活性化を原因とする殺細胞効果に対する減弱作用が引き起こされることが示唆される。したがって、docetaxel によって誘導される NF- $\kappa$ B 活性を抑制する薬剤の併用が、化学療法における新たな治療戦略として期待される。

われわれは、ヒト口腔扁平上皮癌細胞に対して増殖抑制を示さない濃度の docetaxel とビタミン E である  $\alpha$ -tocotrienol の併用が、この細胞増殖を抑制することを明らかにし、その増殖抑制は  $\alpha$ -tocotrienol による NF- $\kappa$ B 活性の抑制に起因することを解明した。したがって、docetaxel と  $\alpha$ -tocotrienol の併用が、NF- $\kappa$ B を分子標的とした新たな治療戦略になり得ることが期待されることから、本研究においては、ヒト口腔癌細胞移植ヌードマウスに対する抗腫瘍効果を検討することとした。

### 2. 研究の目的

口腔癌細胞に対して増殖抑制を示さない濃度の docetaxel および  $\alpha$ -tocotrienol を併用することにより惹起される細胞増殖の抑制が、如何なる分子機構によるものかを明らかにすることは、新たな癌化学療法の開発への大きな足掛かりになり得ると考えられる。従来よりわれわれは、NF- $\kappa$ B 活性および NF- $\kappa$ B により制御されるアポトーシス関連遺伝子産物 (Caspase-8、-9、-3、Apaf-1 および cytochrome c) およびアポトーシス抑制遺伝子産物 (Survivin、c-IAP1、c-IAP2、XIAP および Bcl-2) に着目し、抗癌剤によって誘発されるアポトーシスの分子機構について解明することを目標としている。アポトーシス関連遺伝子産物である Caspase-8、-9 はアポトーシス開始因子として、また Caspase-3 はアポトーシス実行因子として、アポトーシスにおいてそれぞれ極めて重要な役割を果たしている。すなわち、

Caspase-8 は外因系アポトーシスに關与し、また Caspase-9 は内因系アポトーシスに關与するとされている。さらに Apaf-1 および cytochrome c にも内因系アポトーシスに關与するとされ、これらは最終的に Caspase-3 を活性化し、この結果アポトーシスを誘導するとされている。また、アポトーシス抑制遺伝子産物である Survivin は Caspases の活性化を阻害し、アポトーシスを抑制するとされる。また c-IAP1、c-IAP2 および XIAP は Caspases に直接結合し、その活性化を阻害する。Bcl-2 はミトコンドリア膜を制御し、アポトーシスを抑制する働きを有する。

そこで本研究においては、B88 細胞に対する docetaxel および  $\alpha$ -tocotrienol の NF- $\kappa$ B 活性への影響を検討するとともに、アポトーシス関連遺伝子産物の発現およびアポトーシス抑制遺伝子産物の発現の評価を *in vitro* システム系を用いて行う。B88 細胞移植ヌードマウスを用いて docetaxel と  $\alpha$ -tocotrienol の併用が腫瘍の増殖に及ぼす影響を *in vivo* システム系において検討する。

### 3. 研究の方法

抗癌剤 docetaxel とビタミン E の  $\alpha$ -tocotrienol を併用することにより、*in vitro* においてヒト口腔癌細胞株 B88 に対する抗腫瘍効果を増強するか否かの検討を行う。対象としてヒト舌扁平上皮癌由来細胞株 B88 を用いる。使用薬剤として、各薬剤を培養液 (ダルベッコ改良イーグル最少必須培地) 中に添加する。用いる濃度はすでにこれまでの研究結果より得られた殺細胞効果を示さない濃度、すなわち以下の濃度とした。  
Group1: docetaxel (0.5 nM)  
Group2:  $\alpha$ -tocotrienol (50  $\mu$ M)  
Group3: docetaxel (0.5 nM) +  $\alpha$ -tocotrienol (50  $\mu$ M)

評価方法として、MTT アッセイ: docetaxel (0.5 nM)、 $\alpha$ -tocotrienol (50  $\mu$ M) およびこれらの併用により、B88 細胞の細胞増殖能に与える影響を検討する。Cell Proliferation Kit I を用いて検討する。Electrophoretic mobility shift assay (EMSA 法): docetaxel (0.5 nM)、 $\alpha$ -tocotrienol (50  $\mu$ M) およびこれらの併用により B88 細胞を処理する。それぞれの核抽出物と B site を有する標識化プローブ (5'-AGTTGAGGGGACTTTCACAGGC-3') を結合バッファーを用いて反応させ、サンプルとする。サンプルを 6% ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動し、ナイロン膜に転写した後、UV によるクロスリンクを行う。その後 Streptavidin-HP conjugate にて標識し、化学発光基質と反応させる。そして、メンブレンを X-ray film に感光させる。以上の方法により、docetaxel (0.5 nM)、 $\alpha$ -tocotrienol (50  $\mu$ M) およびこれらの併用による B88 細胞の NF- $\kappa$ B 活性に及ぼす

影響につき検討を行う。 Western blotting: docetaxel(0.5 nM),  $\gamma$ -tocotrienol (50  $\mu$ M) およびこれらの併用により、アポトーシス関連遺伝子産物( Caspase-8、-9、-3、Apaf-1 および cytochrome c )の発現、アポトーシス抑制遺伝子産物 ( Survivin、c-IAP1、c-IAP2、XIAP および Bcl-2)の発現を検討する。 アポトーシスアッセイ: Hoechst 33258 染色を用いて、アポトーシス細胞の観察を行う。すなわちスライドガラス上の固定した細胞を、5  $\mu$ g/ml の Hoechst 33258 にて30分間染色する。PBS にて洗浄した後、80% glycerol を含む PBS にて封入し、蛍光顕微鏡を用いて核濃縮や分断化を認める細胞数を算定する。

*in vivo* において、docetaxel と  $\gamma$ -tocotrienol を併用することにより、ヒト口腔癌移植ヌードマウスに対する抗腫瘍効果を増強するか否かの検討を行う。

対象としてヒト口腔癌移植ヌードマウス:100 mm ディッシュ上にてセミコンフルエントまで培養したヒト口腔癌細胞 B88 を回収する。細胞回収後に8週齢、雄の BALB/c ヌードマウスの背面に  $5 \times 10^6$  cells/body の細胞濃度にて移植する。移植後約1週間で、腫瘍体積が80~100 mm<sup>3</sup>に到達した時点を実験開始日とする。

使用薬剤として各薬剤とも1週間に3回(月曜日、水曜日および金曜日)、下記 Group に従い薬剤の腹腔内投与を実施する。

- Group1 : docetaxel ( 3 mg/kg )
- Group2 :  $\gamma$ -tocotrienol ( 0.5 mg/kg )
- Group3 : docetaxel ( 3mg/kg ) +  $\gamma$ -tocotrienol ( 0.5 mg/kg )
- Group4 : 生理食塩水 (コントロール)

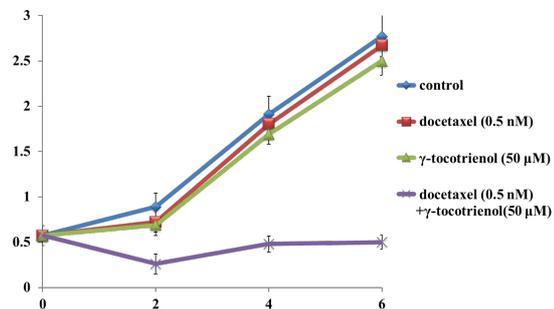
評価方法として 有害事象の評価:1週間に3回(月曜日、水曜日および金曜日)に、体重および食事量について評価を行う。薬剤投与開始後、28日目まで観察を行う。腫瘍体積の評価:計算式(腫瘍短径)<sup>2</sup>×(腫瘍長径)÷2を用いて、腫瘍の体積を計測し、経時的な変化の観察を行う。1週間に3回(月曜日、水曜日および金曜日、いずれも21時頃)につき計測を実施する。薬剤投与開始後、28日目まで観察を行う。CTを用いた評価:動物用マイクロCTを用い、腫瘍をより客観的な方法にて観察を行う。2週間に1回につき、撮影を実施する。病理組織切片による評価:薬剤投与開始後28日目に実験動物のチオペンタールの腹腔内投与による屠殺を行う。屠殺後に腫瘍サンプルを回収し、ホルマリン固定後に脱水操作、パラフィン包埋を行った後、病理組織切片の作製を行う。ヘマトキシリン・エオジン染色による病理組織の評価および NF- $\kappa$ B p65 抗体を用いた免疫染色を行い、NF- $\kappa$ B p65 発現の局在部位の評価を行う。血液検査による評価:動物実験の屠殺時に、血液サンプルの回収を行う。肝機能、腎機能さらに腫瘍関連マーカーの評価を行う。腫瘍における転写因

子 NF- $\kappa$ B の発現、アポトーシス関連遺伝子産物の発現、アポトーシス抑制遺伝子産物の発現の評価:屠殺動物より得られた腫瘍サンプルよりタンパク質の回収を行う。Western blotting および EMSA 法を用いて、担癌ヌードマウス腫瘍細胞における NF- $\kappa$ B の発現、アポトーシス関連遺伝子産物 ( Caspase-8、-9、-3、Apaf-1 および cytochrome c )の発現、アポトーシス抑制遺伝子産物( Survivin、c-IAP1、c-IAP2、XIAP および Bcl-2)の発現の評価を行う。

#### 4. 研究成果

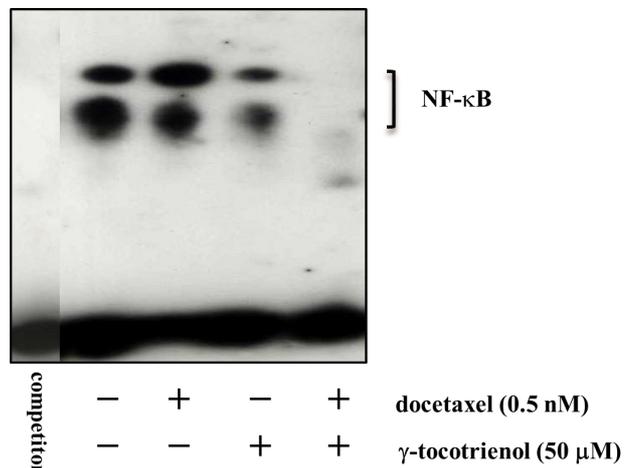
(1) docetaxel と  $\gamma$ -tocotrienol の併用により B88 細胞の細胞増殖能に与える影響

docetaxel(0.5 nM),  $\gamma$ -tocotrienol(50  $\mu$ M)それぞれ単独投与においては、B88細胞の細胞増殖は抑制されなかった。一方これらを併用したところ、下図に示すように B88 細胞の細胞増殖は著明に抑制された。



(2) docetaxel と  $\gamma$ -tocotrienol の併用による NF- $\kappa$ B の DNA 結合能に及ぼす影響

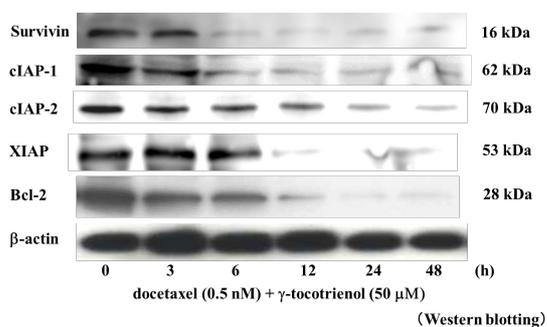
docetaxel(0.5 nM),  $\gamma$ -tocotrienol(50  $\mu$ M)それぞれ単独投与においては、NF- $\kappa$ B 活性は抑制されなかった。一方でこれらを併用により、下図に示すように NF- $\kappa$ B 活性は抑制された。



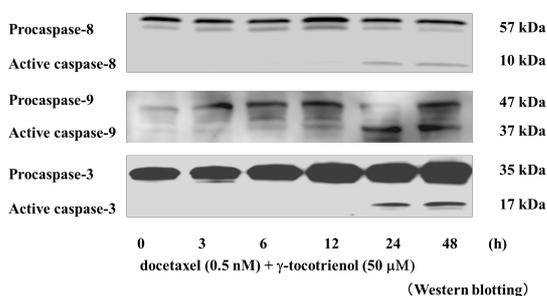
(3) docetaxel と  $\gamma$ -tocotrienol の併用によるアポトーシス抑制タンパクに及ぼす影響

docetaxel(0.5 nM),  $\gamma$ -tocotrienol(50  $\mu$ M)

M) の併用により、下図に示すようにアポトーシス抑制タンパクの発現は抑制された。



(4) docetaxel と  $\gamma$ -tocotrienol の併用によるアポトーシス関連タンパクに及ぼす影響  
docetaxel (0.5 nM) と  $\gamma$ -tocotrienol (50  $\mu$ M) の併用により、下図に示すようにアポトーシス抑制タンパクの発現は抑制された。



## 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 1 件)

(1) 可児耕一、桃田幸弘ほか、口腔癌担癌ヌードマウスに対する docetaxel および  $\gamma$ -tocotrienol 併用による抗腫瘍効果の検討、口腔組織培養学会誌、査読有り、24 巻、2015、23 - 30

〔学会発表〕(計 3 件)

(1) 可児耕一、口腔癌細胞移植ヌードマウス腫瘍に対する docetaxel・ $\gamma$ -tocotrienol 併用療法による抗腫瘍効果の検討、日本口腔組織培養学会、2015 年 11 月 21 日、徳島大学長井記念ホール(徳島市)

(2) 可児耕一、口腔がんにならないために - 予防と検診 -、中国四国高度がんプロ養成基盤プログラム、2015 年 2 月 25 日、徳島大学大塚講堂(徳島市)

(3) 可児耕一、がん治療における周術期口腔機能管理の現状と課題、徳島大学 Cancer Borad、2014 年 9 月 8 日、徳島大学病院(徳島市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

可児 耕一 (KANI, Koichi)

徳島大学・大学病院・助教

研究者番号：60709583