

令和元年6月20日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K11240

研究課題名(和文) カテキンの上皮成長因子受容体分解作用を応用した口腔癌治療の検討

研究課題名(英文) Oral cancer treatment which applied the epidermal growth factor receptor degradation by catechin

研究代表者

吉村 仁志 (Yoshimura, Hitoshi)

福井大学・学術研究院医学系部門・准教授

研究者番号：40362917

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、口腔扁平上皮癌(OSCC)に対するエピガロカテキン-3-ガレート(EGCG)の有用性を評価した。in vitroでEGCGは、HSC-3細胞の生存率を時間および用量依存的に抑制した。EGCGは腫瘍細胞のG1期での停止を誘導した。EGCGは、カスパーゼ3および7の活性、アポトーシス細胞の割合を有意に増加させた。in vivo異種移植片実験では、EGCGは腫瘍サイズの減少をもたらした。EGCGと対照群の間にKi-67発現に有意差があり、EGCG群のアポトーシス細胞の割合は有意に大きかった。本研究は、EGCGが細胞周期の進行およびアポトーシスに影響を及ぼし細胞増殖を阻害することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔扁平上皮癌(OSCC)は口腔領域で最も一般的な悪性腫瘍の1つである。現在の治療戦略にもかかわらず、生存率は数十年間改善されていない。したがって、OSCCの治療への新しいアプローチを開発することは重要であった。我々の結果は、口腔癌治療への新しいアプローチとしてのエピガロカテキン-3-ガレート(EGCG)の治療応用への可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：EGCG is a major constituent of green tea. The aim of this study was to evaluate the therapeutic potential of EGCG for targeting human OSCC in vitro and in vivo. In the in vitro experiments, EGCG suppressed HSC-3 cell viability in a time- and dose-dependent manner. Cell cycle analysis showed that EGCG induced G1 phase arrest of the tumor cells. Treatment with EGCG significantly increased caspase 3 and 7 activities, and the percentage of apoptotic cells as compared to control cells. In the in vivo xenograft experiment on mice, EGCG treatment resulted in a 45.2% reduction in tumor size as compared with the control group. There were significant differences in Ki-67 expression between the EGCG treatment group and control group, and the percentage of apoptotic cells in the EGCG treatment group was significantly greater than that in the control group. These results indicated that EGCG significantly inhibited cell proliferation by affecting the cell cycle progression and apoptosis.

研究分野：口腔癌

キーワード：口腔癌 カテキン 増殖抑制 アポトーシス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

口腔癌は頭頸部悪性腫瘍の1つであり、発生率に関しては全身の癌の6番目に多い形態であり、再発のリスクが高い。2012年の世界における発生例は30万症例で、性別は3分の2が男性に発生している。頭頸部癌は一般に咽頭または喉頭に発生するが、全症例のほぼ50%が口腔に発生する。一般的には舌が多く、そして歯肉、頬粘膜、口底、口蓋、または唇にも発生する。口腔癌の病因に寄与する重要な危険因子は、アルコール摂取とタバコの喫煙である。組織学的に、口腔癌の90%以上が口腔扁平上皮癌(OSCC)と診断されている。OSCC患者の5年生存率は、外科手術、放射線療法、化学療法などの治療の進歩にもかかわらず、数十年間で約50%のままである。生存率の低さは、局所領域の再発と局所リンパ節転移に起因している。OSCCは依然として治療が困難な疾患であり、新規の抗増殖治療方法を開発することは重要である。

2. 研究の目的

緑茶は世界的に一般的な飲料であり、健康への有用性に関して研究されている。疫学的研究は、緑茶が癌に対する予防効果を持つことを明らかにしてきた。緑茶の生物活性は、そのポリフェノール成分(乾燥重量の30%を占める)に起因している。緑茶中のポリフェノールには、エピガロカテキン-3-ガレート(EGCG)、エピガロカテキン(EGC)、エピカテキン-3-ガレート(ECG)、エピカテキン(EC)など、多くのカテキンが含まれており、EGCGが最も効果的なポリフェノールとされている。EGCGの使用は、肺癌、肝癌、乳癌、結腸直腸癌、前立腺癌および皮膚癌のようないくつかの癌タイプにおいて、*in vitro* および動物モデルにおいて癌の進行を抑制することが示されている。それにもかかわらず、我々の知る限りでは、特に実験動物モデルにおいて、ヒトOSCC細胞に対するEGCGの効果を扱った研究はほとんどない。

本研究では、ヒトOSCC細胞株HSC-3を用いて*in vitro*にて細胞増殖とアポトーシスを調べ、また*in vivo*異種移植マウスモデルに対するEGCGの効果を評価した。これらにより、口腔癌治療のためのEGCGの治療の可能性について検討することを目的とした。

3. 研究の方法

in vitro および *in vivo* でヒトOSCCに対するEGCGの治療的可能性を評価した。

in vitro 実験では、HSC-3細胞を用いてMTSアッセイにて生存率を時間および用量の影響を検討した。細胞周期分析は、フローサイトメーターを用いて検討した。アポトーシスは、アネキシンVおよびヨウ化プロピジウム染色、カスパーゼ3および7活性のアッセイ、ならびにTdTを介したdUTPニックエンドラベリング(TUNEL)染色によって調べた。

in vivo 実験ではヌードマウスでの異種移植片実験を行った。また *in vivo* 細胞増殖およびアポトーシスは免疫組織化学的Ki-67染色およびTUNEL染色によって評価した。(詳細については論文に記載あり)

4. 研究成果

EGCGによる*in vitro*でHSC-3細胞の増殖抑制効果

HSC-3細胞を種々の濃度の異なる濃度のEGCGと共に培養した。細胞生存率に基づいて、阻害率をMTSアッセイにより計算した。EGCGは用量および時間に依存して細胞生存率を有意に阻害した(図1)。24時間、48時間および72時間でのIC50値はそれぞれ $>100\mu\text{M}$ 、 $43.2\mu\text{M}$ および $39.3\mu\text{M}$ であった。50 μM を超える濃度で阻害効果に有意差はなかった。我々は以後の実験のために50 μM のEGCGを使用した。

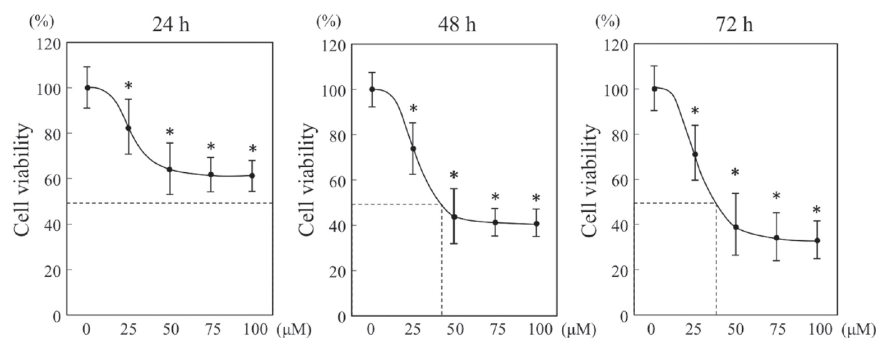


図1 EGCGによる*in vitro*でHSC-3細胞の増殖抑制効果

EGCGによる*in vitro*でG1期での細胞周期停止

0時間および24時間にEGCG処理を用いてまたは用いずに処理したHSC-3細胞のDNA含有量を調べた。フローサイトメトリー分析は、対照細胞と比較してG1期細胞の割合の有意な増加($64.3 \pm 4.5\%$ vs $46.2 \pm 4.7\%$)および対照と比較したG2/M期細胞の割合の有意な減少を明らかにした。24時間後の細胞($11.6 \pm 5.1\%$ vs $26.0 \pm 5.5\%$)(図2AおよびB)。これらの結果は、EGCGが細胞周期のG1チェックポイントでHSC-3細胞を停止させることができることを示した。

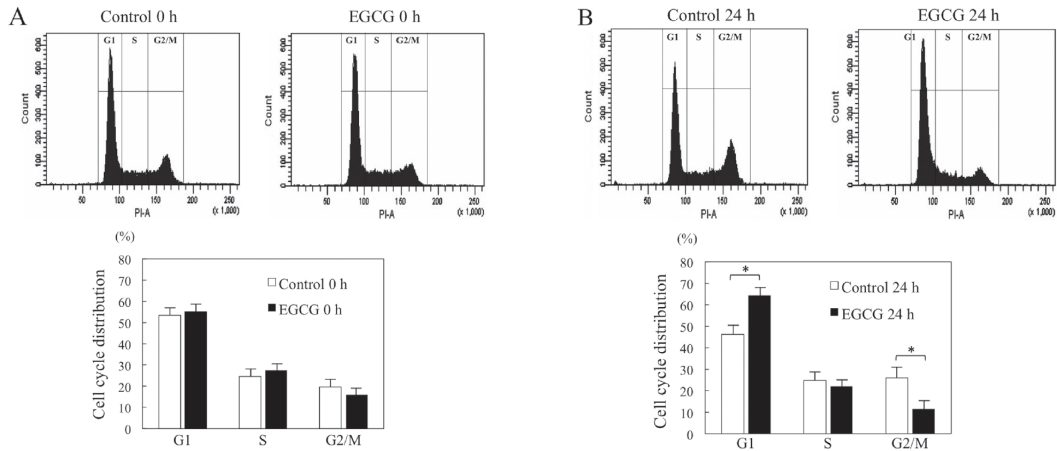


図2 EGCGによる in vitro で G1 期での細胞周期停止

EGCG による in vitro での HSC-3 細胞のアポトーシス誘導

細胞を EGCG の存在下または非存在下で 6 時間インキュベートした後、アネキシン V を用いてフローサイトメトリーで分析してアポトーシス率を決定した。EGCG による処理は、対照細胞と比較してアポトーシス細胞の割合を有意に増加させた (初期アポトーシス細胞: $2.6 \pm 0.4\%$ vs $0.6 \pm 0.2\%$ 、後期アポトーシス細胞: $21.0 \pm 1.2\%$ vs $3.8 \pm 0.6\%$) (図 3A および B)。カスパーゼ 3 および 7 の活性に対する EGCG の効果も評価した。カスパーゼ 3 および 7 の活性は、対照細胞と比較して、EGCG での処理の 12 時間後に有意に増加した (2861.4 ± 580.7 RFU vs 884.6 ± 76.6 RFU) (図 3C)。本研究ではカスパーゼ 3 および 7 阻害剤 (Ac-DEVD-CHO) を使用し、それはこれらの活性を有意に抑制した。インビトロでのアポトーシスに対する EGCG の効果を TUNEL アッセイによって調べた。24 時間の EGCG 処置のアポトーシス細胞の割合は、対照細胞群におけるそれよりも有意に大きかった ($2.8 \pm 1.1\%$ vs $0.3 \pm 0.5\%$) (図 3D および E)。これらの結果は、EGCG が HSC-3 細胞においてアポトーシスを誘導することを示唆した。

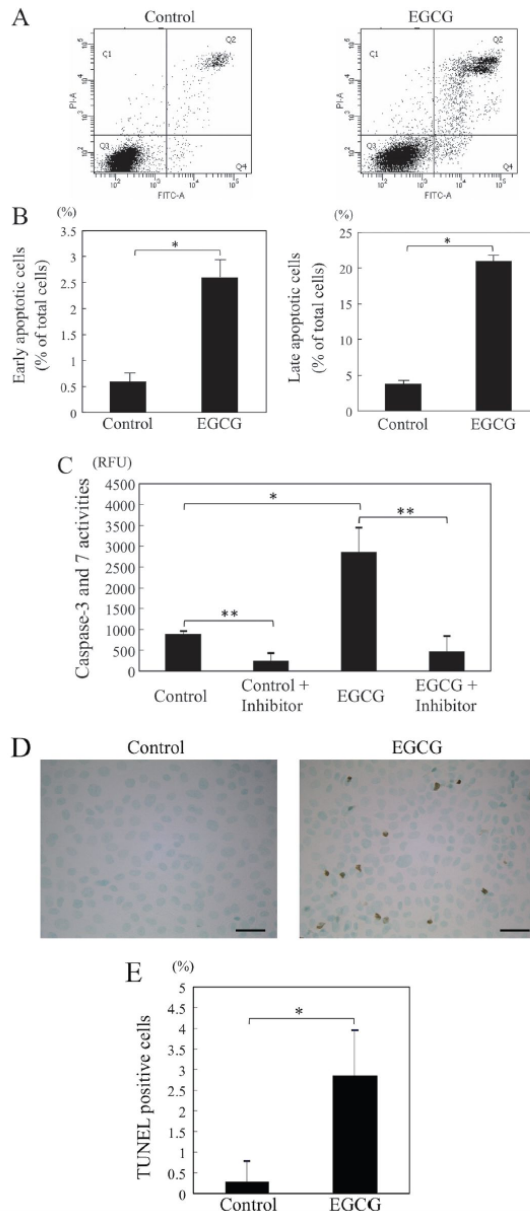


図3 EGCGによる in vitro での HSC-3 細胞のアポトーシス誘導

EGCG による in vivo での HSC-3 細胞の腫瘍増殖抑制

HSC-3 細胞をヌードマウスの背中に皮下移植した。HSC-3 細胞移植の 2 週間後、75 mg/kg の EGCG または生理食塩水を 1 週間に 2 回 4 週間腹腔内投与した。EGCG 投与 1 週間後から有意差が認められた。4 週間の EGCG 投与により、対照動物と比較して腫瘍体積が 45.2% 減少した ($46.7 \pm 17.8 \text{ mm}^3$ vs $103.4 \pm 12.4 \text{ mm}^3$) (図 4A-C)。マウスの体重は有意には減少せず、そして EGCG 処置群の平均体重は $23.3 \pm 1.5 \text{ g}$ であり、対照群の体重 ($24.2 \pm 1.2 \text{ g}$) とほぼ等しい (図 4D)。in vitro データと一致して、EGCG は我々の異種移植モデルにおいて腫瘍増殖を有意に阻害した。

EGCG による in vivo での HSC-3 細胞の分裂抑制

EGCG 処置と対照群との間で平均 Ki-67 発現に有意差があった ($8.8 \pm 3.2\%$ vs $5.0 \pm 2.4\%$) (図 5A および B)。結果は、異種移植腫瘍における細胞増殖に対する EGCG の阻害効果を示した。

EGCG による in vivo での HSC-3 細胞のアポトーシス誘導

TUNEL アッセイにより、インビボでのアポトーシスに対する EGCG の効果を調べた。EGCG 処置群におけるアポトーシス細胞の割合は、対照群におけるそれよりも有意に大きかった ($10.6 \pm 4.2\%$ vs $4.4 \pm 2.3\%$) (図 6A および B)。

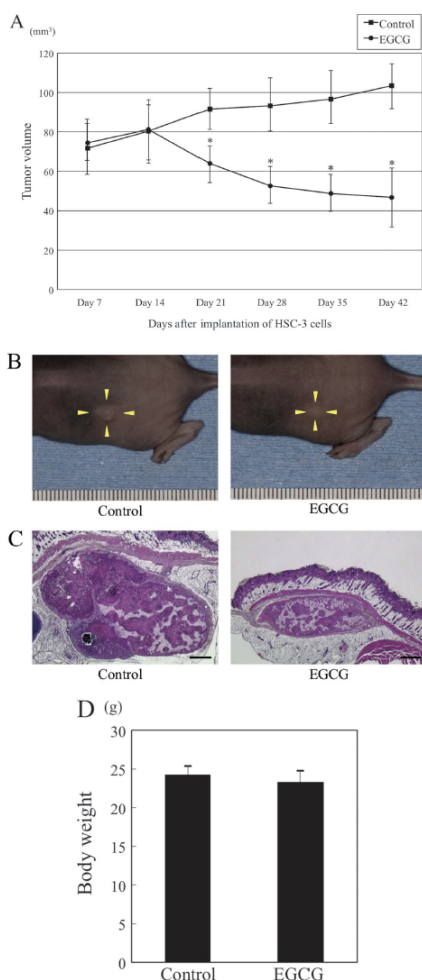


図 4 EGCG による in vivo での HSC-3 細胞の腫瘍増殖抑制

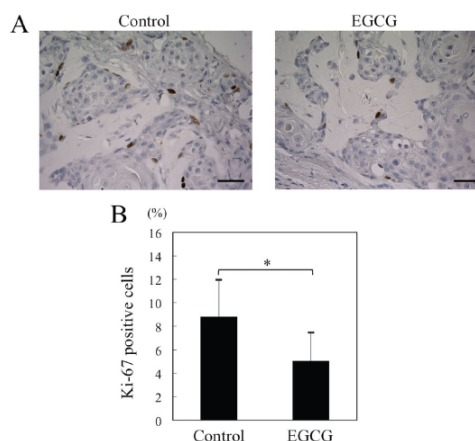


図 5 EGCG による in vivo での HSC-3 細胞の分裂抑制

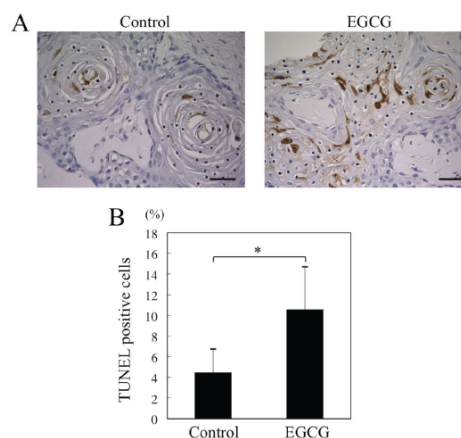


図 6 EGCG による in vivo での HSC-3 細胞のアポトーシス誘導

考察

我々は EGCG がヒト OSCC 細胞において細胞周期停止およびアポトーシスを誘導し、in vitro および in vivo で抗増殖効果をもたらすことをマウスモデルにおいて実証した。OSCC 腫瘍の有意な増殖阻害が、体重の減少なしに EGCG 投与マウスにおいて認められた。したがって、我々は EGCG が OSCC 治療のための有用な薬剤となりうると考えた。口腔癌治療に対する EGCG の有用性を明らかにするためには、さらなる研究、特に分子レベルおよび臨床レベルでの研究が必要である。今後我々は上皮増殖因子受容体に対する影響について検証を行う予定である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1件)

1. Yoshimura H, Yoshida H, Matsuda S, Ryoke T, Ohta K, Ohmori M, Yamamoto S, Kiyoshima T, Kobayashi M, Sano K: The therapeutic potential of epigallocatechin-3-gallate against human oral squamous cell carcinoma through inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis: In vitro and in vivo murine xenograft study. Mol Med Rep. (査読あり) 2019, in press. doi: 10.3892/mmr.2019.10331. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 31173211.

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。