

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：42723

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11286

研究課題名(和文)新規分子標的薬による口腔がんの浸潤転移抑制機構の解明と臨床応用に向けた戦略的研究

研究課題名(英文) Investigation of potential use of molecular targeted medicine on inhibition of oral cancer invasion and metastasis

研究代表者

藤原 久子 (Fujihara, Hisako)

鶴見大学短期大学部・歯科衛生科・准教授

研究者番号：80396746

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、口腔がん細胞の転移・浸潤のメカニズムについて、PARP阻害剤を投与することによって生じる変化について比較検証した。3種類の口腔がん細胞、PARP阻害剤はオラパリブを使用した。初年度は、細胞レベルにおいて、オラパリブが 接着能、遊走能、浸潤能それぞれを低下させることを明らかにした。次年度は、口腔がん細胞をヌードマウスの咬筋付近に移植して腫瘍を形成させ、オラパリブ投与群とコントロール群における腫瘍の下顎骨への浸潤程度を比較検証した。画像所見、病理組織学的評価、浸潤能関連因子の免疫組織学的評価を行い、オラパリブ投与によって、in vivoでも浸潤能が低下することが分かった。

研究成果の概要(英文)：In this report, mechanism of oral cancer invasion and metastasis was analyzed using PARP inhibitor which is one of molecular target drugs and currently under clinical trial for breast cancer. Materials used in this reports are three kinds of oral cancer derived cells, Ca9-22, SAS, and HSC-2 and Olaparib (AZD2281) as PARP inhibitor. In the first year, PARP inhibitor showed significant decrease of 1) cell proliferation, 2) cell migration, 3) cell infiltration, and 4) cell adhesion except cell (Ca9-22) adhesion for laminin coating, which showed significant increase of cell adhesion using with Olaparib. Next, xenografted tumors were generated by injection of tumor cells into masseter muscles. Tumor volumes of control group mice increased during the experimental period. However, tumor growth rate of AZD2281 group significantly decreased compared to the control group after tumor cell injection. Xenografted tumor invasion to mandible was also compared between Olaparib/control groups.

研究分野：口腔外科

キーワード：口腔がん 転移 浸潤 分子標的治療薬

1. 研究開始当初の背景

今日に至るまで、がん治療は格段の進歩をとげたが、局所再発か遠隔転移が制御不能になり死に至るため、再発や転移は未だ大きな課題である。再発と転移の制御が、がんの制御と生命予後の改善につながることから、多くの研究がなされてきた結果、病理組織学的には癌細胞の浸潤様式ならびにリンパ管浸潤と血管浸潤の有無が重要であること、分子生物学的にはがんの浸潤ならびに転移において上皮間葉転換が関与すること、さらにがんの治療抵抗性や再発・転移にはがん幹細胞が中心的役割を果たすことが報告されてきた。

近年では、がんの分子異常を標的とした分子標的薬の開発も進められている。

頭頸部癌領域では、2012年に抗EGFR抗体であるセツキシマブ(アービタックス®)の適応が承認されたが、副作用が強いという問題点がある。一方、乳癌における分子標的薬の1つにPARP (polyADP-ribose polymerase)阻害剤があるが、現在各国で臨床試験が進められている。我々は、平成24年~26年度に取得した科学研究費を用いて、口腔がんに対するPARP阻害剤の有効性を検討、PARP阻害剤は抗悪性腫瘍薬CDDPの感受性を増強させることを明らかにし、PARP阻害薬の口腔がん治療における有用性が示唆された。

更にPARP阻害剤は、上皮間葉転換に関与することも報告されていることを勘案して、口腔がん領域においても上皮間葉転換に関与して、癌の浸潤と転移を抑制するのではないかと仮説をたて、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

ポリ ADP-リボース合成酵素 (PARP) は、DNA 修復の他、遺伝子安定性や細胞死誘導、細胞間シグナル、テロメアの安定性など、発がんやがん細胞の増殖に重要な役割を果たすことが報告されてきた。我々は口腔がん細胞に抗悪性腫瘍薬と PARP 阻害剤を併用した

結果、有意に抗悪性腫瘍薬に対する感受性が上昇し、がんの初期治療に有用であることを見出した。更に PARP 阻害剤は、がん細胞の遊走能を低下させることが分かり、浸潤転移への関与が示唆された。本研究では、PARP の口腔がんの浸潤転移機構における役割を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

口腔がん細胞株は、未処理の口腔がん細胞株3種(SAS, Ca9-22, HSC2)を用いた。

(1) 細胞の増殖能：細胞増殖については、通常通りに細胞を増殖させ、毎日細胞数をカウントした。

(2) 細胞移動能：細胞移動能の定量は、スクラッチアッセイ法で検証した。6-well プレートに口腔がん細胞を播種・培養し、コンフルエントにする。5 µg/ml Mitomycin C 処理で細胞増殖能を阻害し、細胞シートに傷をつけ、細胞のない空間に細胞外移動してくる細胞を1時間ごとに観察し、遊走残存面積を計測した。

(3) 浸潤能：3種類の口腔がん細胞を包埋したコラーゲンゲルを作製し、6-well プレートに注入、その後、口腔がん細胞浮遊液を注いで、浸潤モデルを作製する。1~2週間培養し、コラーゲンゲルを10%中性ホルマリンで固定、パラフィン切片作製してヘマトキシリン・エオジン染色を行い観察する。

(4) 細胞接着能：コラーゲンI溶液とラミニン溶液を用いて培養皿をコーティングした後、細胞懸濁液を注いで接着モデルを作製する。1時間培養後、接着しなかった細胞を洗い流し、グリセル化ゼラチンを注入してゲルを効果させた。その後、顕微鏡下で観察し、細胞の写真をグレースケールに転換、輝度比を計測して比較検証した。

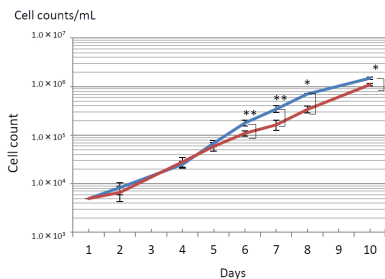
4. 研究成果

(1) 口腔がん細胞の増殖能に対する PARP 阻害剤の影響について

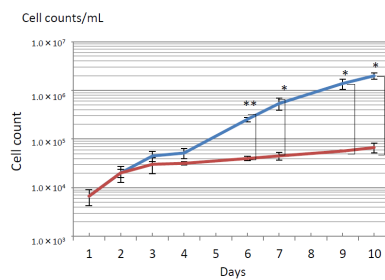
3種類の口腔がん細胞において、いずれも PARP 阻害剤によって有意に増殖能の抑制が

認められた。

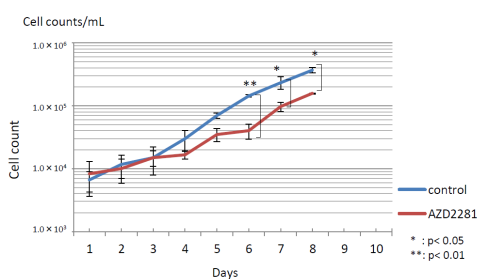
Ca9-22



SAS

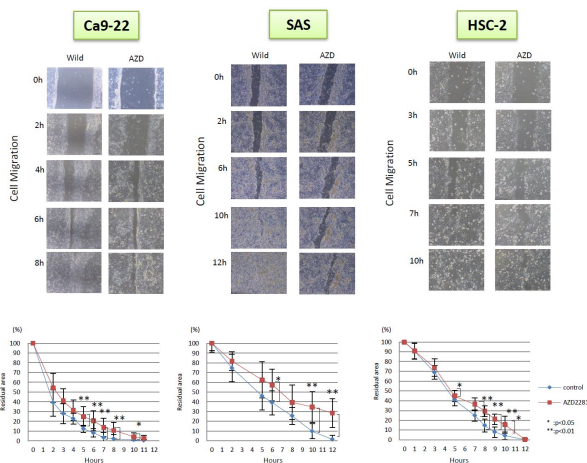


HSC-2



(2) 口腔がん細胞の移動能に対する PARP 阻害剤の影響について

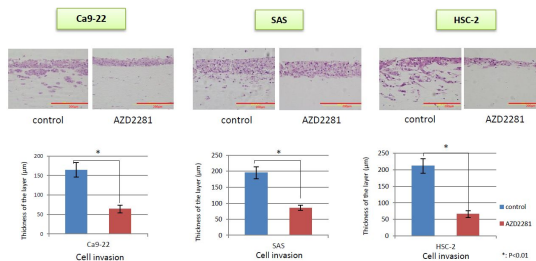
3種類の口腔がん細胞において、いずれも PARP 阻害剤を投与した方が、細胞の移動能が有意に抑制されることが分かった。



(3) 口腔がん細胞の浸潤能に対する PARP 阻害剤の影響について

3種類の口腔がん細胞において、いずれも PARP 阻害剤を投与した方が、細胞の浸潤能が有意に抑制されることが分かった。特に、

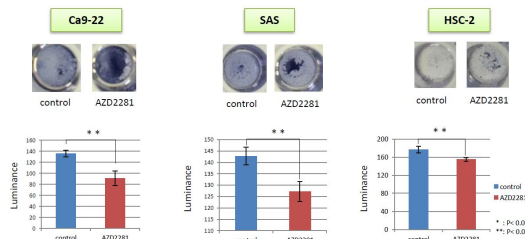
Ca9-22 ならびに SAS においては、その抑制率が顕著に高かった。



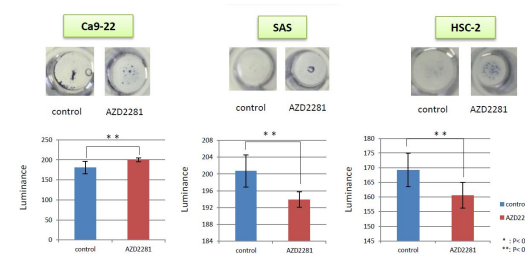
(4) 口腔がん細胞の接着能に対する PARP 阻害剤の影響について

細胞の接着能に対する PARP 阻害剤の影響については、コラーゲンIコーティングとラミニンコーティングによって、細胞間に差異が認められた。

まず、コラーゲンIコーティングの場合は、PARP 阻害剤の投与によって、いずれの細胞においても接着能の有意な低下が認められた。



一方、ラミニンコーティングの場合は、PARP 阻害剤投与によって、SAS と HSC-2 では接着能の有意な低下が認められたが、Ca9-22 では逆に接着能が上昇する結果が得られた。



本研究より、PARP 阻害剤の投与によって、口腔がん細胞の浸潤転移能が有意に抑制されることが分かったが、Ca-22 のラミニンに対する接着能だけは上昇したことから、細胞

の種類によって薬剤の影響が真逆になることが分かった。

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 3 件)

Yuta Kishi, Hisako Fujihara, Koji Kawaguchi, Hiroyuki Yamada, Ryoko Nakayama, Nanami Yamamoto, Yuko Fujihara, Yoshiki Hamada, Kazuhito Satomura, Mitsuko Masutani. PARP Inhibitor PJ34 Suppresses Osteogenic Differentiation in Mouse Mesenchymal Stem Cells by Modulating BMP-2 Signaling Pathway. International Journal of Molecular Science 査読有、16, 24820-24838, 2015
DOI:10.3390/ijms161024820
Masaaki Yasukawa, Hisako Fujihara, Hiroaki Fujimori, Koji Kawaguchi, Hiroyuki Yamada, Ryoko Nakayama, Nanami Yamamoto, Yuta Kishi, Yoshiki Hamada, Mitsuko Masutani. Synergetic Effects of PARP Inhibitor AZD2281 and Cisplatin in Oral Squamous Cell Carcinoma in Vitro and in Vivo. International Journal of Molecular Science 査読有、17, 272, 2016
DOI:10.3390/ijms17030272
Yamamoto Nanami, Kawaguchi Koji, Fujihara Hisako, Hasebe Mitsuhiro, Kishi Yuta, Yasukawa Masaaki, Kumagai Kenichi, Hamada Yoshiki. Detection accuracy for epithelial dysplasia using an objective autofluorescence visualization method based on the luminance ratio. International Journal of Oral Science 査読有、9, 2017, e2
DOI: 10.1038/ijos.2017.37

[学会発表](計 2 件)

岸悠太, 藤原久子, 山本那々美, 山田浩之, 川口浩司, 濱田良樹: ポリ ADP-リボシル化反応はマウス間葉系間細胞 (MSC) の骨芽細胞分化に関与する. 第 61 回日本口腔外科学会総会・学術大会 2016 年 11 月 25 ~ 27 日 千葉
安川仁章, 藤原久子, 藤森浩彰, 川口浩司, 山田浩之, 中山亮子, 山本那々美, 岸悠太, 濱田良樹: 口腔扁平上皮がん細胞に対するシスプラチンと PARP 阻害剤 AZD2281 の相乗効果. 第 61 回日本口腔外科学会総会・学術大会 2016 年 11 月 25 ~ 27 日 千葉

[図書](計 1 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤原 久子 (FUJIHARA, Hisako)
鶴見大学短期大学部・歯科衛生科・准教授
研究者番号: 80396746

(2) 研究分担者

川口 浩司 (KAWAGUCHI, Koji)
鶴見大学・歯学部・准教授
研究者番号: 50277951

宮嶋 千秋 (MIYAJIMA, Chiaki)
鶴見大学・歯学部・学部助手
研究者番号: 50723722
平成 29 年 3 月 15 日削除

馬杉 亮彦 (BASUGI, Akihiko)
鶴見大学・歯学部・助教
研究者番号: 80351922
平成 28 年 6 月 20 日削除

山田 浩之 (YAMADA, Hiroyuki)
岩手医科大学・歯学部・教授
研究者番号: 90267542