

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20521

研究課題名(和文) 局所的炭酸ガス投与による口腔癌転移抑制効果の検討

研究課題名(英文) Transcutaneous carbon dioxide induces suppresses metastasis of oral squamous cell carcinoma

研究代表者

長谷川 巧実 (HASEGAWA, TAKUMI)

神戸大学・医学研究科・助教

研究者番号：50546497

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)：過去にわれわれは局所的炭酸ガス投与の低酸素環境改善による腫瘍抑制およびリンパ節転移抑制効果を報告したが、その詳細なメカニズムは不明であった。本研究では、口腔扁平上皮癌に対して局所的炭酸ガスを応用し、低酸素環境改善が、転移に深く関わる上皮間葉移行(EMT)関連因子に及ぼす影響について観察することを目的とした。局所的炭酸ガス投与によって口腔扁平上皮癌細胞は低酸素誘導因子およびEMT関連因子の発現が抑制された。したがって、局所的な経皮的炭酸ガス投与法は、腫瘍に対して低酸素環境を改善し、EMT発現を抑制することで、腫瘍抑制効果や転移抑制効果を示す可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We previously demonstrated that transcutaneous CO<sub>2</sub> suppresses the growth of primary human OSCC and metastasis to the regional lymph nodes by both improving hypoxia and increasing mitochondrial apoptosis in treated tissue. Therefore, we hypothesized that improving hypoxia by transcutaneous CO<sub>2</sub> could suppress EMT. In the present study, we investigated whether oxygen conditions affect HIF-1 and EMT factors in OSCC in vivo and whether transcutaneous CO<sub>2</sub> affects these factors in OSCC. In the present study, in vivo studies revealed that transcutaneous CO<sub>2</sub> increased E-cadherin expression with the decreased expression of HIF-1, Snail, Slug, N-cadherin, and Vimentin in treatment tumors. These results suggest that transcutaneous CO<sub>2</sub> could suppress EMT by improving hypoxia, resulting in the reduction of metastatic potential of OSCC. The findings indicate that transcutaneous CO<sub>2</sub> may be able to improve the prognosis of OSCC patients through the suppression of EMT.

研究分野：口腔外科学

キーワード：炭酸ガス 口腔癌 扁平上皮癌 転移

## 1. 研究開始当初の背景

現在、悪性腫瘍に対して、外科療法、放射線療法、化学療法などの治療があるが、それぞれ審美障害、機能障害、制御率、副作用などさまざまな問題がある。このような背景から癌治療については医療従事者あるいは研究者によって様々な研究が進められており、当科でも以前より、癌の早期発見や転移予防に対して研究をすすめてきた。癌治療においても、高齢化が進み、近年では、80歳以上の患者に標準治療を施行すると、健康余命(日常的な医療・介護に依存しないで、自立した生活ができる生存期間)が大幅に短縮されとの報告(Yamada et al. Oral Oncol. 2017)もある。また、現在、がん治療後の副作用により、治療後の患者のうち勤務者のおよそ3割が退職・解雇を余儀なくされている。少子高齢化に伴う介護や看護・働き手の担い手不足の観点からも副作用対策は急務である。近年、腫瘍免疫抑制をターゲットとした分子標的薬の台頭により、副作用軽減が期待されるが、その高額な医療費により国費を圧迫している。このように、いまだ癌を克服したとは言えないのが現状であり、これらの課題を解決するために、さらなる研究が望まれる。

さて、炭酸ガス療法は古くからヨーロッパで知られており、血流や微小循環の改善に用いられてきたが、炭酸ガスの局所への応用はなされておらず、癌組織に対しても使用されていなかった。近年、われわれは、局所的炭酸ガス投与装置を開発し、血管拡張作用とBohr効果により、局所の酸素供給を増やし、細胞内のミトコンドリア量が増加することを証明した(Oe K et al. Biochem Biophys Res Commun. 2011)。

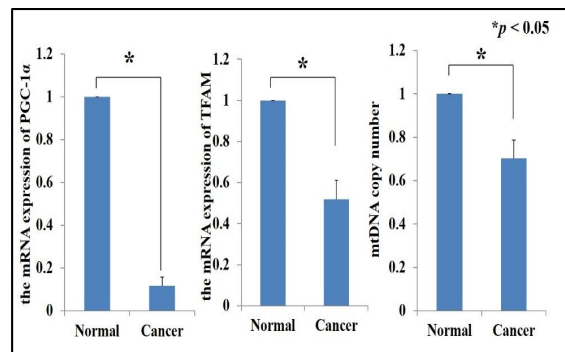
一方、癌細胞はミトコンドリアと密接な関係があり、アポトーシスにも重要な働きをしている(Willem H et al. Nat Rev Cancer. 2011)。われわれは、細胞内のミトコンドリア量に注目し、実験を行った結果、種々の癌細胞内のミトコンドリア量が、良性腫瘍より少ないことを確認した。われわれは、細胞内のミトコンドリアの量に注目し、実験を行った結果、ヒト口腔扁平上皮癌のミトコンドリア量やその機能維持に関わる因子(PGC-1, TFAM)が、正常組織内より少ないことを確認した(Takeda D et al. Head Neck. 2016) (図1)。

そこで、ヌードマウスに移植したヒト扁平上皮癌に対し、局所的炭酸ガス投与を行ったところ、癌細胞内のミトコンドリア量増加が確認された。それにより、ミトコンドリア経路のアポトーシスの活性化が生じ、癌の増殖抑制がおこることを発見した(2012年~2014年:若手B「ミトコンドリアをターゲットとした口腔癌新規治療の開発」)(Takeda D et al.

PLoS One. 2014)。さらには同実験において、リンパ節転移の抑制効果も確認された(第58, 59回日本口腔外科学会総会発表)。

この局所的炭酸ガス投与装置によるリンパ節転移の抑制効果は、ミトコンドリア経路のアポトーシスの活性化と低酸素環境改善などによる可能性が考えられるが、詳しい機序は不明である。

図1. 正常細胞と癌細胞におけるミトコンドリア関連因子の比較



## 2. 研究の目的

口腔扁平上皮癌に対して局所的炭酸ガスを応用し、リンパ節転移抑制の機序について明らかにすることを目的とした。転移に重要なステップとして、血管新生、遊走能の亢進、細胞接着能の低下、アポトーシスの抑制などが挙げられるが、特に重要な細胞遊走能と接着能に深くかかわる上皮間葉移行(epithelial-mesenchymal transition: EMT)のマーカーについて詳細に検討していくこととした。EMTは、上皮細胞が間葉細胞に転換する可逆的な変化で、細胞遊走能を獲得したり、接着能の低下を引き起こしたりすることで、上皮系の悪性腫瘍が他部位へ転移する一因として注目されている。

## 3. 研究の方法

*in vitro*で、ヒト口腔扁平上皮癌由来細胞を20%酸素下(normoxic group)および1%酸素下(hypoxic group)で4日間培養し、低酸素誘導因子(HIF-1)およびEMT関連因子である転写因子(Snail, Slug) 上皮系マーカー(E-cadherin)、間葉系マーカー(N-cadherin, Vimentin)の発現について検討した。

また、*in vivo*で、ヌードマウスに口腔扁平上皮癌由来細胞を移植し、われわれがすでに報告した方法(Oe K et al. 2011)で炭酸ガスを作用させ、腫瘍を採取して、*in vitro*と同様に、低酸素誘導因子(HIF-1)およびEMT関連因子である転写因子(Snail, Slug) 上皮系マーカー(E-cadherin)、間葉系マーカー(N-cadherin, Vimentin)の発現につい

て検討した。

### (1) 癌細胞の準備

ヒト口腔扁平上皮癌由来細胞 HSC-3 を用い、10%FBS、1000 U/mL ペニシリン/ストレプトマイシン、MEM 培地にて、インキュベーター内で 37℃、5%CO<sub>2</sub> の条件下で培養した。

### (2) *in vitro* における低酸素環境および EMT 関連マーカーの解析

上記細胞を 20%酸素下 (normoxic group) および 1%酸素下 (hypoxic group) で 4 日間それぞれ培養した。実験終了後、細胞を採取し、Snail, Slug, E-cadherin, N-cadherin, Vimentin を Real-time PCR 法で測定した。また、HIF-1 を Western blot 法で測定した。

### (3) ノードマウスへの癌細胞の移植

7 週齢の Nude Mouse 24 匹 (CO<sub>2</sub> 実験群 : 12 匹、コントロール群 : 12 匹) を用いて、実験を行う。HSC-3 (2 × 10<sup>6</sup> cell) を Nude Mouse 背部に皮下移植し、移植 7 日後より週 2 回、処置を開始した。

### (4) *in vivo* における局所的炭酸ガス投与

CO<sub>2</sub> 吸収促進ゲルをマウス背部に塗布し、投与時間 20 分間、週 2 回を経皮的に行い、21 日間のうちに評価する。投与方法は、われわれがすでに報告した方法 (Oe K et al. 2011) で行った。コントロール群は CO<sub>2</sub> 吸収促進ゲルのみの塗布とした。

### (5) *in vivo* における低酸素環境および EMT 関連マーカーの解析

実験終了後、腫瘍を採取して、転写因子 (Snail, Slug) および間葉系マーカー (N-cadherin, Vimentin) を Real-time PCR 法および Western blot 法で測定した。また、低酸素誘導因子 (HIF-1) を Western blot 法で測定した。組織学的解析は、Snail, Slug, E-cadherin, N-cadherin, Vimentin の免疫染色を行った。

## 4. 研究成果

### (1) *in vitro* における低酸素環境および EMT 関連マーカーの評価

hypoxic group は normoxic group と比較して、低酸素誘導因子 (HIF-1) 、転写因子 (Snail, Slug) および間葉系マーカー (N-cadherin, Vimentin) の発現増加と上皮系マーカー (E-cadherin) の発現減少を認めた。(図 2,3)

図 2. *in vitro* における EMT 関連マーカーの変化

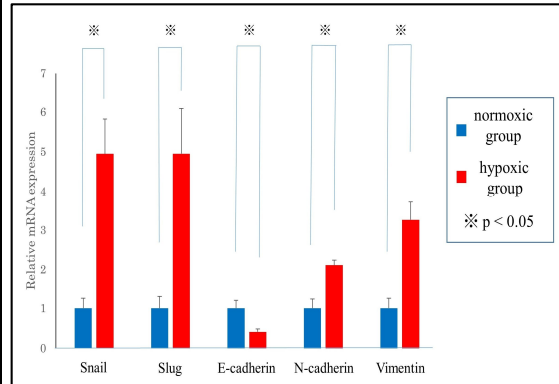
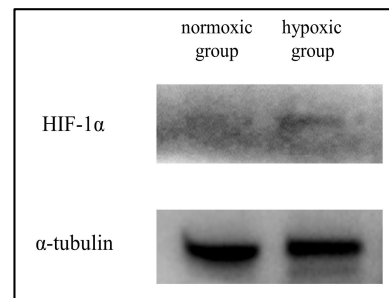


図 3. *in vitro* における HIF-1 の変化



### (2) *in vivo* における低酸素環境および EMT 関連マーカーの評価

Real-time PCR 法および免疫染色にて、コントロール群と比較し、炭酸ガス投与群で、転写因子 (Snail, Slug) および間葉系マーカー (N-cadherin, Vimentin) の発現減少と上皮系マーカー (E-cadherin) の発現増加を認めた。(図 4,5)

また、Western blot 法でコントロール群と比較し、炭酸ガス投与群で、HIF-1 、転写因子 (Snail, Slug) および間葉系マーカー (N-cadherin, Vimentin) の発現減少と上皮系マーカー (E-cadherin) の発現増加を認めた。(図 6)

図 4. *in vivo* における EMT 関連マーカーの変化 (Real-time PCR 法)

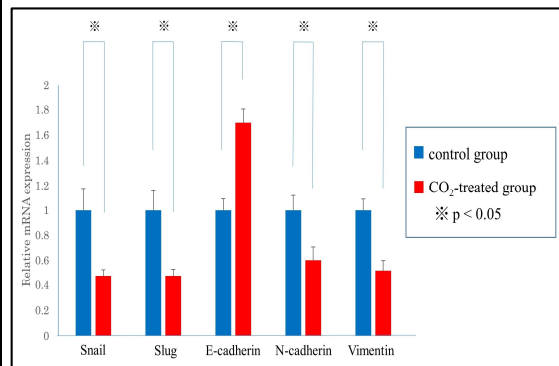


図 5. *in vivo* における EMT 関連マーカーの変化(免疫染色)

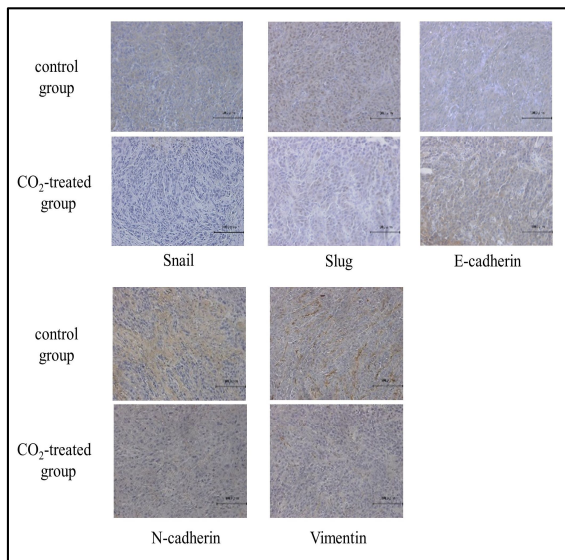
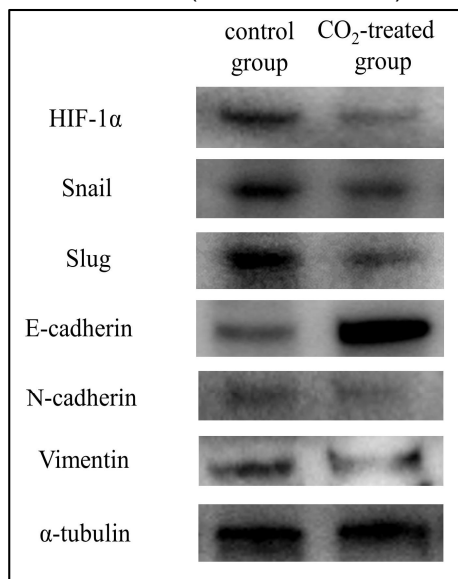


図 6. *in vivo* における HIF-1 および EMT 関連マーカーの変化(Western blot 法)



本研究では、*in vitro*の実験により、低酸素環境において HSC-3 細胞は低酸素誘導因子と EMT 関連因子の発現が増大することが確認できた。

また、*in vivo* 実験により、経皮的炭酸ガス投与によって HSC-3 は低酸素誘導因子および EMT 関連因子の発現が抑制された。これらの結果より、局所的な経皮的炭酸ガス投与法は、腫瘍に対して、低酸素環境を改善し、EMT 発現を抑制することで、腫瘍抑制効果や転移抑制効果を示す可能性が示唆された。

今後、扁平上皮癌に対して、局所的炭酸ガス投与が応用されることにより、縮小手術、化学療法に使用される薬物量の減少、放射線療法での使用線量の減少等につながれば、治療に伴う合併症の軽減できる可能性がある。

今後、転移抑制の詳細なメカニズムや、局所的炭酸ガス投与と放射線療法や化学療法の併用効果を検討していきたい。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Iwata E, Hasegawa T, Takeda D, Ueha T, Kawamoto T, Akisue T, Sakai Y, Komori T. Transcutaneous carbon dioxide suppresses epithelial-mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol.* 査読有, 48(4):1493-1498, 2016, doi: 10.3892/ijo.2016.3380.

〔学会発表〕(計 3 件)

岩田英治, 長谷川巧実, 武田大介, 明石昌也, 南川勉, 古森孝英, 「経皮的炭酸ガス投与による口腔癌上皮間葉移行の抑制効果」, 第 60 回日本口腔外科学会総会・学術大会, 2015.10.16-18、名古屋国際会議場(名古屋)

岩田英治, 長谷川巧実, 武田大介, 齋藤 泉, 有本智美, 明石昌也, 南川勉, 古森孝英, 「Development of the new treatment of OSCC by local application of transcutaneous carbon dioxide.」, The 23<sup>rd</sup> European Association for Cranio Maxillo-Facial Surgery (EACMFS), 2016.9.13-16、London (UK)

岩田英治, 長谷川巧実, 武田大介, 齋藤 泉, 有本智美, 明石昌也, 南川勉, 古森孝英, 「口腔癌放射線治療における新規併用療法の開発」, 第 35 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会, 2017.1.27-28、福岡国際会議場(福岡)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

長谷川 巧実 (HASEGAWA, Takumi)  
神戸大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号：50546497

### (2)研究協力者

岩田 英治 (IWATA, Eiji)  
武田 大介 (TAKEDA, Daisuke)  
上羽 岳志 (UEHA, Takeshi)  
酒井 良忠 (SAKAI, Yoshitada)  
古森 孝英 (KOMORI, Takahide)