

令和元年6月14日現在

機関番号：33920

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17115

研究課題名(和文) CDDP,ATO併用による口腔癌抗腫瘍効果の分子基盤解析及び効率的化学療法の開発

研究課題名(英文) Molecular basis analysis of anticancer effect by combined arsenic trioxide-cisplatin treatment and development of efficient chemotherapy

研究代表者

大野 隆之(Ono, Takayuki)

愛知医科大学・医学部・講師

研究者番号：20434623

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：OSCC細胞株を用いて、ATO単独投与、CDDP単独投与、ATO/CDDP投与後に細胞増殖アッセイを行った。次に、ATO/CDDP療法によるCIおよびDRIを算出した。その結果、相乗的な効果を認め、薬剤低減化が可能であることが示された。さらに、網羅的な遺伝子発現解析を行った結果、ATO/CDDPはROS産生を誘導し、がん関連遺伝子と細胞接着関連遺伝子の活性を転写レベルで低下させ、OSCC細胞のアポトーシスを誘導する可能性が強く示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、口腔癌に対しては三種併用療法が主流となっている。しかしながら、再発・転移症例に対する十分な治療法は未だ確立されていない。このような現状を打破するためには、新たな治療法の開発、または既存の治療法の更なる効率化を図ることが必要である。そこで、口腔癌に対する新たな治療戦略を提供するために、近年注目されている抗がん剤である三酸化ヒ素(以下ATO)に着目した。本研究において、ATOとCDDPの併用療法による抗腫瘍効果の増強作用、薬剤投与量の低減作用および細胞死の作用機序に寄与すると示唆される遺伝子発現を同定できたことは、現在の治療法の更なる効率化や新規治療法の開発へと道を開く一助となる。

研究成果の概要(英文)：We assessed the efficacy of a combinatorial arsenic trioxide (ATO) and cisplatin (CDDP) treatment in human OSCC cells. The combinational effect of ATO/CDDP on the growth and apoptosis of OSCC cell lines was evaluated using MTT assay. Chou-Talalay analyses were performed to evaluate the combinational effects of ATO/CDDP on the dosereduction index (DRI). Combination index (CI) analyses revealed that a synergistic interaction of ATO and CDDP elicits a wide range of effects. As a result, a synergistic effect was recognized, and it was shown that drug reduction was possible. To clarify the mechanism underlying the ATO/CDDP anticancer effect, we also performed microarray analysis and GSEA. As a result, it was strongly suggested that ATO / CDDP may induced ROS production, reduced the activity of cancer-related genes and cell adhesion-related genes at the transcriptional level, and induced apoptosis of OSCC cells.

研究分野：口腔外科学

キーワード：Arsenic trioxide chemotherapy squamous cell carcinoma Apoptosis Reactive oxygen species
Cisplatin 細胞接着関連遺伝子

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

1. 研究開始当初の背景

近年、口腔癌に対しては外科的切除・化学療法・放射線療法、更にそれらを組み合わせた三種併用療法が主流となっており、治療成績は以前と比べ飛躍的に向上した。しかしながら、再発・転移症例に対する十分な治療法は未だ確立されておらず、予後不良となる症例も多々存在する。上記治療法はいずれにおいても、その性質から無制限に施行することが極めて困難である。このような現状を打破するためには、新たな治療法の開発、または既存の治療法の更なる効率化を図ることが必要である。そこで申請者は、口腔癌に対する新たな治療戦略を提供するために、近年注目されている抗がん剤である三酸化ヒ素(以下 ATO)に着目した。ATO は、難治性 APL の治療薬として確立しており、現在固形がんへの臨床応用も検討されている有望な薬剤である。また ATO は、CDDP に見られる重篤な副作用は有しておらず、既存の抗がん剤投与量の低減化による副作用の軽減を図ることができる。

2. 研究の目的

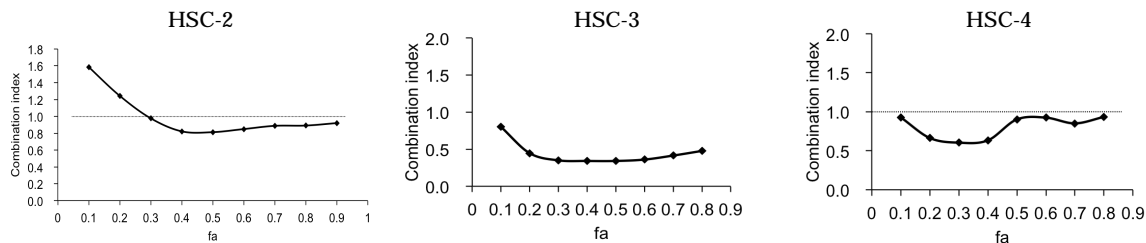
本研究では、口腔癌細胞株を利用して ATO と CDDP の併用療法 (以下 ATO/CDDP 療法) による抗腫瘍効果の増強作用、薬剤投与量の低減作用および細胞死の作用機序を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

ATO/CDDP 併用療法の抗腫瘍効果を解析するために、口腔癌細胞株である HSC-2, HSC-3, HSC-4 および OSC-19 を利用する。現在までに、HSC-2 細胞に対する ATO/CDDP 併用療法の細胞増殖抑制効果を見出した。残りの 3 つの細胞株に対しても同様の実験を行う。各細胞株に対する併用療法の相乗効果を数値化するためにコンビネーション・インデックス (CI) と薬剤低減化インデックス (DRI) を算出し併用療法の有効性を検討する。併用効果の指標の一つとして、アポトーシス経路の活性化を検出・比較する。最後にマイクロアレイを利用した網羅的遺伝子発現解析によって併用療法の抗腫瘍効果に関わる遺伝子を同定し、その分子基盤を解明する。

4. 研究成果

(1) HSC-2,3,4 細胞を細胞培養プレートにまきこみ、ATO 単独投与、CDDP 単独投与、ATO/CDDP 投与後 48 時間後に細胞増殖 (MTT) アッセイを行い、細胞増殖の抑制の程度を比較した。次に、ATO/CDDP 療法の CI および DRI を算出した。その結果、CI 値は 50%細胞増殖抑制を示す濃度において各 0.813, 0.340, 0.902 であり、ATO/CDDP 併用療法が相乗的な効果を示すことが示唆された。さらに DRI 値から、50%細胞増殖抑制を示す濃度において CDDP は各約 2.6, 5.1, 2.5 倍の薬剤低減化が可能であることが示された。



DRI analysis of CDDP and ATO combination in HSC2/HSC3/HSC4 cell lines

Cell	fa	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
HSC-2	CDDP	1.15	1.68	2.23	2.54	2.56	2.44	2.32	2.35	2.15
	ATO	1.40	1.54	1.89	2.33	2.37	2.28	2.19	2.14	2.19
HSC-3	CDDP		3.26	4.55	4.91	5.10	4.93	4.36	3.87	
	ATO		7.16	7.71	7.29	6.89	6.38	5.41	4.59	
HSC-4	CDDP		1.76	2.44	2.63	2.54	1.66	1.60	1.73	
	ATO		2.76	3.95	4.48	4.17	3.33	3.34	3.67	

ATO, arsenic trioxide; CDDP, cisplatin; DRI, dose-reduction index.

(2) この相乗的な増殖抑制作用に関わる分子基盤を明らかにするために、網羅的な遺伝子発現解析を行った。

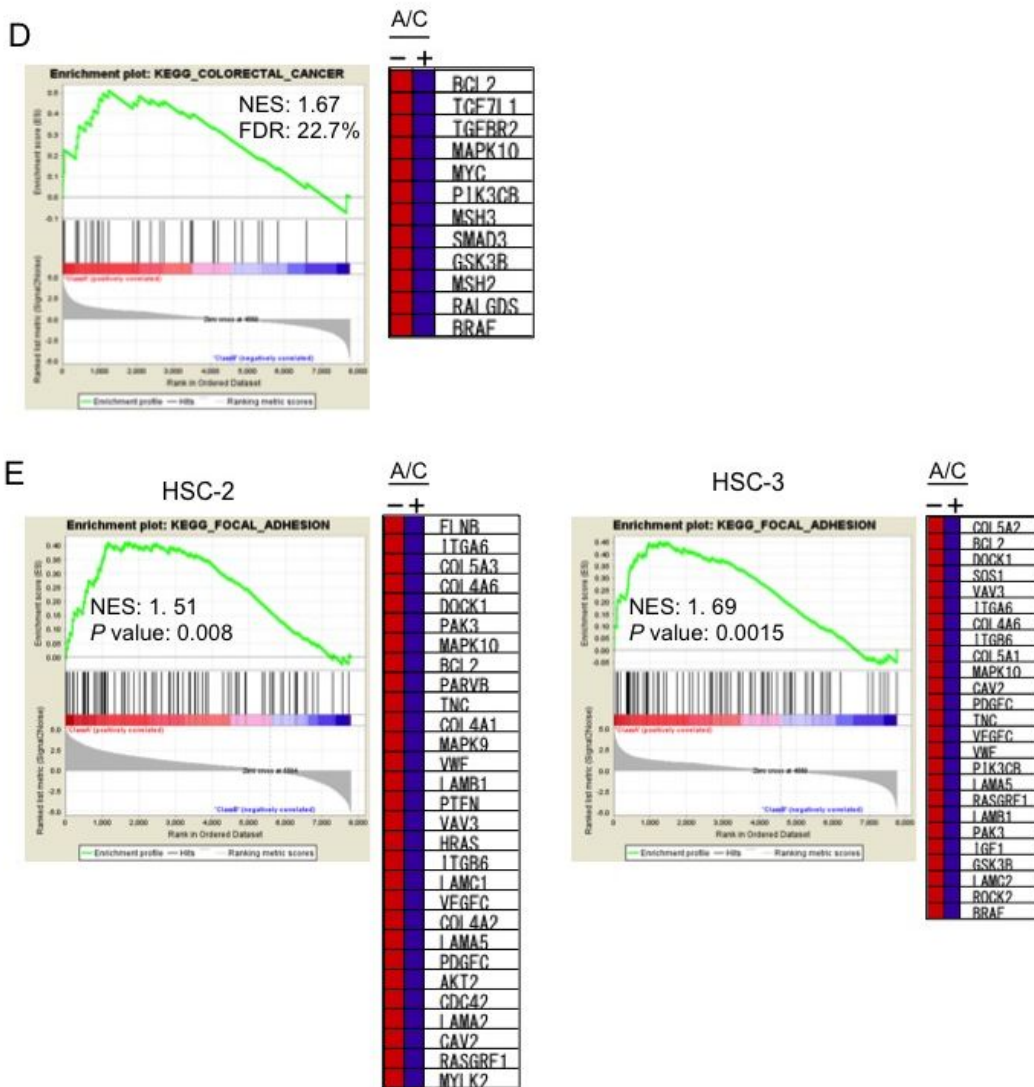
OSCC 細胞株 HSC-2 と HSC-3 に対して ATO/CDDP を投与し 24 時間後に RNA を回収し、マ

マイクロアレイ解析およびGSEAを行った。

HSC-3を用いたGSEAの結果、ATO/CDDPは活性酸素誘導遺伝子群(A、MPO、G6PD、SOD1)、グルタチオン代謝関連遺伝子群(B、GPX2、GSTM1、G6PD)、アポトーシス関連遺伝子群(C、CASP3、CASP4、BTG2)の発現レベルを有意に増強した。

一方で、大腸がんに関連する遺伝子群(D、BCL2、TGFB2、MYC)の発現レベルを有意に低下させた。

また、Focal adhesionに関わる遺伝子群(E、DOCK1、ITGA6、MAPK10)の発現レベルがHSC-2およびHSC-3の両細胞株とともに低下した。



以上より、ATO/CDDPはROS産生を誘導し、がん関連遺伝子と細胞接着関連遺伝子の活性を転写レベルで低下させ、OSCC細胞のアポトーシスを誘導する可能性が強く示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 0件)

[学会発表](計 0件)

[図書](計 0件)

[産業財産権]
出願状況(計 0件)

名称:

発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

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。