

研究種目：基盤研究 (C)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19592339  
 研究課題名 (和文) 口腔癌に対するTS-1・プロテアソーム阻害剤・放射線同時併用療法の開発  
 研究課題名 (英文) Development of the therapy for oral cancer by S-1 and proteasome inhibitor in combination with concurrent radiotherapy.  
 研究代表者  
 原田 耕志 (HARADA KOJI)  
 山口大学・大学院医学研究科・助教  
 研究者番号：60253217

研究成果の概要：プロテアソーム阻害剤 1 (PSI1)は口腔扁平上皮癌細胞に対して、単剤で細胞増殖抑制効果を示し、5-FU および放射線 (RT) との3者併用処理にて強い細胞増殖抑制効果が見られた。ヌードマウス腫瘍に対しても PSI1 は単剤で抗腫瘍効果を示し、TS-1 およびRT との3者併用では顕著な抗腫瘍効果を示した。なお in vitro において PSI1 は口腔扁平上皮癌細胞のNF- $\kappa$ B 活性を有意に抑制し、PSI1 と5-FU はともにRT で活性化された口腔扁平上皮癌細胞のNF- $\kappa$ B 活性を抑制した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：プロテアソーム阻害剤, 5-FU, TS-1, 放射線, 併用療法, NF- $\kappa$ B, アポトーシス, オートファジー

## 1. 研究開始当初の背景

(1)プロテアソーム阻害剤 (PSI) は細胞周期制御、腫瘍増殖抑制、アポトーシス誘導、転写抑制、血管新生抑制など多彩な作用を発揮すると共に、癌細胞に対する抗癌剤の感受

性を増強させることや、放射線増感効果を有している可能性が報告されている。

(2)プロテアソーム阻害剤は、癌細胞において、アポトーシスだけでなく、オートファジーも誘導する可能性が示唆されており、癌治

療において有用と考えられる。プロテアソーム阻害剤I (PSI1)はNF- $\kappa$ Bの抑制因子であるI $\kappa$ B- $\alpha$ の分解を阻止する26Sプロテアソームを阻害することが知られているが、これと同様なメカニズムを有するBortezomibは、初めて臨床応用されたプロテアソーム阻害剤であり、米国では、頭頸部癌を含めた様々な固形癌において臨床試験が進行中である。

(3)我々は5-FU または放射線とPSI1との併用療法は、ヌードマウス背部皮下腫瘍に対して相乗効果を惹起することを示唆する所見を得ている。

## 2. 研究の目的

本研究では口腔扁平上皮癌細胞において、

- (1) 5-FU、PSI1、放射線(RT)の3者併用療法の治療効果
- (2) TS-1、PSI1、RTの3者併用療法の治療効果
- (3) 3者併用療法の治療効果発現のメカニズムにつき検討を行う。

## 3. 研究の方法

In vitro の系では、5-FU、PSI1、RTの3者併用処理を口腔扁平上皮癌細胞に対して行い、細胞増殖抑制効果をMTT assayにて、生細胞数の評価をTrypan blue dye exclusion assayにて、アポトーシスの検出をHoechst 33258 stainingにて、Caspase-3, 8, 9の活性をColorimetric activity assay (Bio Vision)にて、NF- $\kappa$ B活性の評価をReporter assay (SEAP System, Takara)にて、アポトーシス・オートファジー関連蛋白の検出をWestern blottingにて検討した。In vivo の系では、TS-1、PSI1、RTの3者併用を療法を口腔扁平上皮癌細胞移植モデル(ヌードマウス背部皮下移植モデル)に対して行い、抗腫瘍効果・体重の変化につき検

索した。さらに背部皮下腫瘍をホルマリン固定、薄切切片を作成し、アポトーシス・オートファジー関連蛋白の検出をimmunohistochemistryを用いて検討し、アポトーシスの検出をTUNEL法にて検索した。なお検索には下記の抗体を用いた。

Beclin-1(BECN1) ラビットポリクロナル抗体[Santa Cruz]、LC-3(MAP LC3) ラビットポリクロナル抗体[Santa Cruz]、Caspase-3 ラビットポリクロナル抗体[Santa Cruz]、PARP-1 ラビットポリクロナル抗体[Santa Cruz]、 $\alpha$ -tubulin マウスモノクロナル抗体(B-7) [Santa Cruz]、Bcl-2 ラビットポリクロナル抗体[Santa Cruz]、NF- $\kappa$ B p65 ラビットポリクロナル抗体[Santa Cruz]。

## 4. 研究成果

(1) プロテアソーム阻害剤1 (PSI1)は口腔扁平上皮癌細胞株B88に対して、2, 4, 20ng/ml 72h 処理にてそれぞれ約 20, 50, 80%の細胞増殖抑制効果を示し、5-FUは1, 2, 4 $\mu$ g/ml 72h 処理にてそれぞれ約 30, 50, 80%の細胞増殖抑制効果を示し、RTは5, 7.5, 10Gy 照射後 72hにてそれぞれ約 10, 40, 60%の細胞増殖抑制効果を示した。そこでPSI1 1ng/ml 72h 処理(5%抑制)、5-FU 1 $\mu$ g/ml 72h 処理(30%抑制)、RT 7.5Gy (72h 後 40%抑制)の3者併用処理を行ったところ約 80%の細胞増殖抑制効果が見られた。同様にPSI1 2ng/ml 72h 処理(20%抑制)、5-FU 1 $\mu$ g/ml 72h 処理(30%抑制)、RT 7.5Gy (72h 後 40%抑制)の3者併用処理を行ったところ約 90%の細胞増殖抑制効果が見られた。B88ヌードマウス腫瘍に対しては、PSI1 0.1, 0.5mg/kg 3回/週 15日目にてそれぞれ約 30, 60%の腫瘍増殖抑制効果が見られ、5-FU 10, 25mg/kg 3回/週 15日目にてそれぞれ約 20, 40%の腫瘍増殖抑制効果が見られ、RT 1.5Gy/日 3回/週 15日目に

て約 40%の腫瘍増殖抑制効果が見られた。そこで PSI1 0.1mg/kg 3回/週、5-FU 10mg/kg 3回/週、RT 1.5Gy/日 3回/週 にて 21 日間併用治療を行ったところ、それぞれ単独では約 40, 30, 50%、PSI1 と RT との 2 者併用では約 75%、3 者併用では約 90%の腫瘍増殖抑制効果が見られた。なお in vitro において PSI1 は、4ng/ml 以上の濃度にて B88 細胞の NF- $\kappa$ B 活性を有意に抑制し、5-FU は 2 $\mu$ g/ml 以上の濃度にて B88 細胞の NF- $\kappa$ B 活性を有意に抑制した。さらに PSI1 と 5-FU はともに RT で活性化された B88 細胞の NF- $\kappa$ B 活性を抑制した。

(2) PSI1は口腔扁平上皮癌細胞株HSC3に対して、1, 2, 10ng/ml 72h処理にてそれぞれ約 10, 40, 70%の細胞増殖抑制効果を示し、5-FU は1, 2, 4 $\mu$ g/ml 72h処理にてそれぞれ約30, 50, 80%の細胞増殖抑制効果を示し、RTは5, 7.5, 10Gy照射後 72hにてそれぞれ約10, 40, 60%の細胞増殖抑制効果を示した。次にPSI1 1ng/ml 72h処理(10%抑制)、5-FU 1 $\mu$ g/ml 72h処理(30%抑制)、RT 7.5Gy (72h後40%抑制)の 3 者併用処理を行ったところ約90%の細胞増殖抑制効果が見られた。同様にPSI1 2ng/ml 72h処理(40%抑制)、5-FU 1 $\mu$ g/ml 72h処理(30%抑制)、RT 7.5Gy (72h後40%抑制)の 3 者併用処理を行ったところ約95%の細胞増殖抑制効果が見られた。PSI1はHSC4に比較して HSC3に対して強い増殖抑制効果を示した。HSC3ヌードマウス腫瘍に対しては、PSI1 0.1, 0.5mg/kg 3回/週 15日目にてそれぞれ約 20, 50%の腫瘍増殖抑制効果が見られ、5-FU 10, 25mg/kg 3回/週 15日目にてそれぞれ約20, 40%の腫瘍増殖抑制効果が見られ、RT 1.5Gy/日 3回/週 15日目にて約40%の腫瘍増殖抑制効果が見られた。次にPSI1 0.1mg/kg 3回/週、5-FU 10mg/kg 3回/週、RT 1.5Gy/日 3回/週 にて21日間併用治療を行ったところ、そ

れぞれ単独では約25, 25, 50%、PSI1とRTとの 2 者併用では約80%、3 者併用では約95%の腫瘍増殖抑制効果が見られた。なおin vitroにおいてPSI1は、4ng/ml 以上の濃度にてHSC3, HSC4細胞のNF- $\kappa$ B活性を有意に抑制し、5-FUは2 $\mu$ g/ml 以上の濃度にてHSC3, HSC4細胞のNF- $\kappa$ B活性を有意に抑制した。さらにPSI1と5-FUはともにRTで活性化された HSC3, HSC4細胞のNF- $\kappa$ B活性を抑制した。

(3)以上の結果から TS-1、プロテアソーム阻害剤、放射線の三者併用療法は、有用な治療法となる可能性が示唆された。

## 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10件)

①Harada K, Ferdous T, Itashiki Y, Takii M, Mano T, Mori Y, Ueyama Y. Cepharranthine inhibits angiogenesis and tumorigenicity of human oral squamous cell carcinoma cells by suppressing expression of vascular endothelial growth factor and interleukin-8. *Int J Oncol.*, 2009. 査読有り

②Harada K, Ferdous T, Itashiki Y, Takii M, Mano T, Mori Y, Ueyama Y. Effects of cepharanthine alone and in combination with fluoropyrimidine anticancer agent, S-1, on tumor growth of human oral squamous cell carcinoma xenografts in nude mice. *Anticancer Res.* 2009, 29 (4): 1263-70. 査読有り

③Ueyama Y, Okafuji M, Harada K, Mano T, Mihara M, Uchida K, Horinaga D, Wada N. Clinical phase I trial of S-1 in the combination with DOC using super-selective intra-arterial infusion with oral cancer. *Gan To Kagaku Ryoho.* 2009, 36 (3): 395-9. 査読有り

④Motegi K, Harada K, Ohe G, Jones SJ, Ellis IR, Crouch DH, Schor SL, Schor AM. Differential involvement of TGF- $\beta$ 1 in mediating the motogenic effects of TSP-1 on endothelial cells, fibroblasts and oral tumour cells. *Exp Cell Res.* 2008, 1; 314 (13): 2323-33. 査読有り

⑤Harada K, Sato M, Ueyama Y, Nagayama M, Hamakawa H, Nagahata S, Yoshimura Y,

Osaki T, Ryoike K, Oral Cancer Study Group of Chugoku-Shikoku. Multi-institutional phase II trial of S-1 in patients with oral squamous cell carcinoma. Anticancer Drugs. 2008, 19 (1): 85-90. 査読有り

⑥Harada K, Ferdous T, Yoshida H. Investigation of optimal schedule of concurrent radiotherapy with S-1 for oral squamous cell carcinoma. Oncol Rep. 2007, 18 (5): 1077-83. 査読有り

⑦Harada K, Tamatani T, Bando T, Yoshida H. A case of oral squamous cell carcinoma responding to S-1. Gan To Kagaku Ryoho. 2007, 34 (9): 1455-8. Japanese. 査読有り

⑧Itashiki Y, Harada K, Ferdous T, Yoshida H. Effects of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand alone and in combination with fluoropyrimidine anticancer agent, S-1, on tumor growth of human oral squamous cell carcinoma xenografts in nude mice. Anticancer Res. 2007, 27 (4B): 2365-75. 査読有り

⑨Harada K, Kawashima Y, Uchida D, Yoshida H. A case of advanced oral squamous cell carcinoma responding to concurrent radiotherapy with S-1. Gan To Kagaku Ryoho. 2007, 34 (5): 745-7. Japanese. 査読有り

⑩Harada K, Supriatno, Kawashima Y, Yoshida H, Sato M. S-1 inhibits tumorigenicity and angiogenesis of human oral squamous cell carcinoma cells by suppressing expression of phosphorylated Akt, vascular endothelial growth factor and fibroblast growth factor-2. Int J Oncol. 2007, 30 (2): 365-74. 査読有り

[学会発表] (計8件)

①原田耕志、口腔扁平上皮癌に対するTS-1とDocetaxel併用療法の有用性の検討、日本口腔腫瘍学会  
2009年1月29日、宇都宮

②原田耕志、ヒト口腔扁平上皮癌におけるTSP-1による血管新生阻害因子TSP-1の誘導、日本口腔科学会地方会、2008年11月

29日、米子

③原田耕志、口腔扁平上皮癌に対するTS-1・プロテアソーム阻害剤・放射線同時併用療法の開発、日本癌治療学会、2008年10月31日、名古屋

④原田耕志、TS-1配合成分ギメラシルのDNA二重鎖断裂修復機構への影響、日本癌学会、2008年10月28日、名古屋

⑤原田耕志、口腔癌に対する5-FU・プロテアソーム阻害剤・放射線同時併用療法の開発、日本口腔外科学会総会、2008年10月20日、徳島

⑥原田耕志、口腔扁平上皮癌におけるTS-1の感受性予測因子の検討、日本口腔外科学会総会、2008年10月21日、徳島

⑦原田耕志、口腔扁平上皮癌に対するレンチナンのフッ化ピリミジン系抗癌剤増強効果、日本頭頸部癌学会、2008年6月11日東京

⑧原田耕志、口腔扁平上皮癌細胞に対するDocetaxelと5-FUの投与順序による抗腫瘍効果の検討、日本口腔科学会総会、2008年4月18日、博多

[図書] (計0件)

[産業財産権]  
○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]  
ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原田 耕志 (HARADA KOJI)  
山口大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号：60253217

(2) 研究分担者   なし

(3) 連携研究者   なし