

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19791534  
 研究課題名（和文） 口腔癌の腫瘍血管形成時に誘導される遺伝子群の解析とその分子標的治療法の確立  
 研究課題名（英文） The analysis of gene induced at tumor angiogenesis in oral cancer and the establishment of molecular target therapy  
 研究代表者  
 萩 和弘（OGI KAZUHIRO）  
 札幌医科大学・医学部・助教  
 研究者番号：40433114

研究成果の概要：本研究では、低酸素環境下での Hypoxia-inducible factor-1(HIF-1)の働きと腫瘍血管新生に関与する遺伝子群の解析を行った。口腔癌においては p53 異常を伴う腫瘍が約半数を占めており、特に血管形成の際誘導される VEGF(vascular endothelial growth factor)の発現が誘導されやすい。研究結果の概要としては1) 口腔癌細胞株を用いた実験系では、低酸素状態(1.0%の酸素下)で転写因子である NF-kB が HIF-1 を誘導する事が明らかにされた。2) 低酸素領域にある腫瘍細胞に着目し、Laser Capture Microdissection (LCM) にて癌細胞を切り出し、Total RNA を抽出した。その結果 COX-2 や MMP-1 の発現が見られた。3) 低酸素領域にある癌細胞の特性を検索する為、放射線治療と抗癌剤同時併用療法後の切除組織における残存組織内での血管新生因子の発現検索を行った。対象は13例の口腔癌とし、研究結果により生検組織における HIF-1 $\alpha$  の発現陽性は12/13例、VEGF の発現陽性(+++)は9/13例であった。その発現の程度と化学放射線治療感受性との関連性は認められなかった。生検組織における VEGF 陽性発現(+++)症例は、すべて HIF-1 $\alpha$  陽性(+++)症例であった。また手術時の切除組織では、5例中2例に生存癌細胞が認められた。これらの生検組織では、HIF-1 $\alpha$  かつ VEGF ともに強陽性(++)発現を認めた。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,800,000	0	2,800,000
2008年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	150,000	3,450,000

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：口腔癌、低酸素環境、LCM

## 1. 研究開始当初の背景

・癌の増殖には血管新生が必要であり、その要因として特に低酸素状態にある腫瘍細胞から分泌される血管新生因子が注目されている。最近腫瘍血管系の発生とそれに関わる因子が明らかにされてきた。特に低酸素領域の腫瘍細胞は、周囲の血流分布が無秩序であり薬物療法に抵抗性を示すと考えられるが、一方その低酸素の程度によっては感受性を示すとの報告も散見される。近年、口腔扁平上皮癌 (oral squamous cell carcinoma : OSCC) に対する放射線治療と抗癌剤同時併用療法が顕著な治療効果を発揮している。

・口腔扁平上皮癌における頸部リンパ節転移は患者の予後を決定する重要な因子の一つであるが、悪性腫瘍の所属リンパ節転移の機序において血管新生の関与が注目されている。腫瘍組織内の低酸素状態にある部分では、vascular endothelial growth factor - C, - D (VEGF-C, -D) およびVEGF receptor - 2, - 3 (VEGF-2, -3) の発現が明らかとなっている。

・VEGFの腫瘍細胞における誘導には種々の癌遺伝子、癌抑制遺伝子の異常が直接関係し、また低酸素などの腫瘍内微小環境が腫瘍細胞、腫瘍間質細胞双方におけるVEGFの高発現に深く関与することが知られている。癌細胞はそうして腫瘍血管を得て増殖しながら、その腫瘍血管を介して血行性に転移し、またVEGF-C, -Dなどの影響を受けた新生リンパ管を介してリンパ行性転移を生ずる。

## 2. 研究の目的

近年臨床で行われている口腔癌治療での選択的動注化学療法による頸部転移リンパ節に対する効果は、原発巣に高濃度の抗癌剤を投与すれば転移リンパ節に対して血行性あるいはリンパ行性に薬剤が移行し、一定の抗腫瘍効果があることが推測されてきた。したがって、これらの理論を関連付ける研究が急務とされる。本研究ではこれらを背景に術前の選択的動注化学療法での抗腫瘍効果をモニターする分子マーカーの開発を目的とする。

## 3. 研究の方法

・低酸素環境下で各種口腔癌細胞株を培養し、HIF-1 $\alpha$ の発現を制御している遺伝子の検索を行った。

・2006年1月から2007年10月まで当科で化学放射線療法を施行した13例の口腔癌を対象とし、低酸素領域に着目した化学放射線治療効果と血管新生因子との関連性を検討した。

## 4. 研究成果

1) 口腔癌細胞株を用いた実験系では、低酸素状態 (1.0%の酸素下) で転写因子であるNF- $\kappa$ BがHIF-1 $\alpha$ を誘導する事が明らかにされた。さらに si-RNAp65を癌細胞に直接遺伝子導入したところHIF-1 $\alpha$ の発現低下が認められ、その標的遺伝子であるVEGFの発現低下をも認めた。

2) 低酸素領域にある腫瘍細胞に着目し、Laser Capture Microdissection (LCM) にて癌細胞を切り出し、Total RNAを抽出した。発現変動する遺伝子にはCOX-2やMMP-1、およびDNA修復に関わる多く遺伝子が含ま

れていることがわかった。

3) 低酸素領域にある癌細胞の特性を検索する為、放射線治療と抗癌剤同時併用療法後の切除組織における残存組織内での血管新生因子の発現検索を行った。対象は13例の口腔癌で、研究結果により生検組織におけるHIF-1 $\alpha$ の発現陽性は12/13例、VEGFの発現陽性(++/+)は9/13例であった。その発現の程度と化学放射線治療感受性との関連性は認められなかった。生検組織におけるVEGF陽性発現(++/+)症例は、すべてHIF-1 $\alpha$ 陽性(++/+)症例であった。手術時の切除組織では、5例中2例に生存癌細胞が認められた。これらの生検組織では、HIF-1 $\alpha$ かつVEGFともに強陽性(++)発現を認めた。

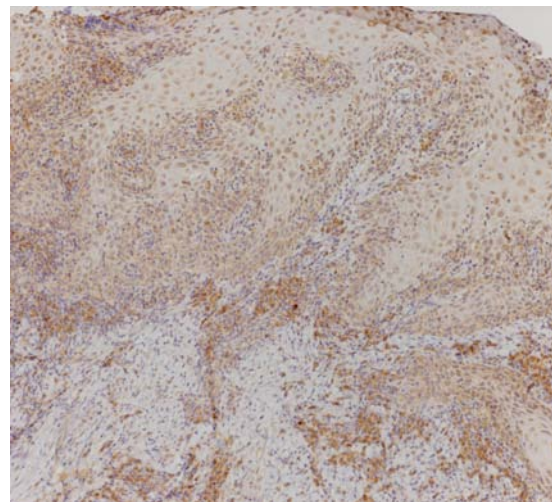
表1. 生検時におけるHIF-1 $\alpha$ の発現と臨床所見との相関

カテゴリー	HIF-1 $\alpha$ (核内)		
	(+/+)	(-)	
性別	男性	8	1
	女性	2	2
T分類	T2	4	1
	T3/T4	6	2
N分類	N0	4	2
	N1-3	6	1
Stage	II	3	1
	III/IV	7	2
臨床効果	SD	0	2
	PR	5	0
	CR	5	1

表2. 生検時におけるVEGFの発現と臨床所見との相関

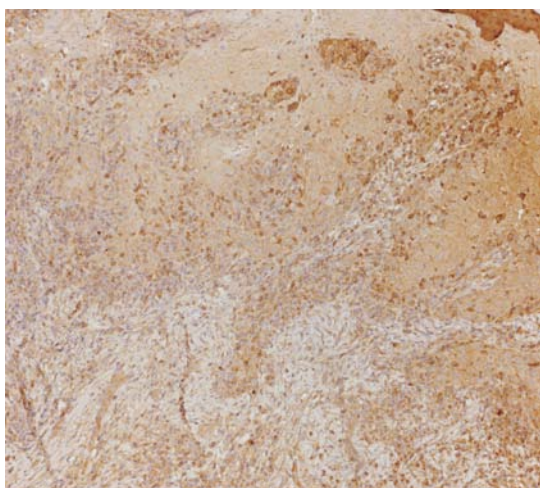
カテゴリー	VEGF (核内)		
	(+/+)	(-)	
性別	男性	7	1
	女性	3	2
T分類	T2	3	2
	T3/T4	7	1
N分類	N0	3	2
	N1-3	7	1
Stage	II	6	3
	III/IV	4	0
臨床効果	SD	2	0
	PR	4	1
	CR	4	2

図1. 免疫組織染色 (HIF-1 $\alpha$ 陽性(+)症例)



腫瘍細胞の50%以下で核内発現見られる

図2. 免疫組織染色 (VEGF 陽性(++)症例)



腫瘍細胞の50%以上で核内発現見られる

#### 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)

①Sogabe Y, Suzuki H, Toyota M, Ogi K, Imai T, Nojima M, Sasaki Y, Hiratsuka H, Tokino T. Epigenetic inactivation of SFRP genes in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol.* 2008 Jun;32(6):1253-61. 査読有

②Imai T, Toyota M, Suzuki H, Akino K, Ogi K, Sogabe Y, Kashima L, Maruyama R, Nojima M, Mita H, Sasaki Y, Itoh F, Imai K, Shinomura Y, Hiratsuka H, Tokino T. Epigenetic inactivation of RASSF2 in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Sci.* 2008 May;99(5):958-66. 査読有

③Ricci MS, Kim SH, Ogi K; Reduction of TRAIL-induced Me1-1 and cIAP2 by c-Myc or sorafenib sensitizes resistant human cancer cells to TRAIL-induced death. *Cancer Cell*, 2007 Jul;12(1):66-80. 査読有

[学会発表] (計7件)

①宮崎晃亘、山口 晃、荻 和弘ら；口腔癌は克服できたかー癌浸潤様式4C、4D型症例の治療成績；日本癌治療学会総会、2008年10月30日 名古屋

②荻 和弘、仲盛健治ら；口腔癌における低酸素領域での血管新生因子に関する臨床的検討；日本癌学会総会、2008年10月28日 名古屋

③荻 和弘、仲盛健治ら；口腔がんにおける低酸素領域での血管新生因子に関する臨床的検討；日本口腔外科学会総会、2008年10月

20日 徳島

④Ogi K, Kenji N.; Clinical investigation of the roles of angiogenic factors in hypoxic regions of oral cancer アメリカ癌学会総会、2008年4月14日 サンディエゴ、米国

⑤今井 崇、荻 和弘ら；口腔扁平上皮癌におけるRAS関連遺伝子の異常の解析；日本口腔外科学会総会；2007年9月29日 名古屋

⑥今井 崇、秋野公臣、荻 和弘ら；口腔扁平上皮癌におけるRAS関連遺伝子のジェネティックおよびエピジェネティックな解析の解析；日本口腔科学会総会；2007年4月19日 神戸

⑦Ogi K, Wafik S, El-deiry; Silencing of NF-kappaB p65 subunit inhibits HIF-1 alpha expression during hypoxia and sensitizing HCT116 colon cancer cells to CPT11 but not TRAIL; アメリカ癌学会総会、2007年4月14日 ロスアンゼルス、米国

[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]

なし

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

荻 和弘 (OGI KAZUHIRO)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：40433114

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし