

機関番号：13301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20791503

研究課題名（和文） 口腔扁平上皮癌に対する AMPK 活性化薬剤の増殖・浸潤・転移抑制効果の検討

研究課題名（英文） Examination of the suppressant effect of progression, invasion and metastasis in oral squamous cell carcinoma by AMPK activated reagent

研究代表者

加藤 広禄 (KATO KOROKU)

金沢大学・附属病院・医員

研究者番号：30444201

研究成果の概要（和文）： MTS assay ならびに Western blot にて AMPK 活性化薬剤である AICAR の口腔扁平上皮癌細胞の増殖抑制効果とアポトーシス関連蛋白の変動について検討を行った。その結果、AICAR の濃度依存的、時間依存的な細胞増殖抑制効果が確認された。また、それに伴い AMPK α 、Phospho-AMPK α 、bax、p53 の経時的な発現増加ならびに bcl-2、PCNA の経時的な発現減弱を認めた。

研究成果の概要（英文）： The suppressant effect of progression and the time-dependent change of the apoptotic related protein in oral squamous cell carcinoma cell by AICAR, as AMPK activated reagent were examined using a MTS assay and western blotting. As a result, dose-dependent and time-dependent suppressant effect of progression by AICAR was confirmed. Furthermore, time-dependent increase of AMPK α , Phospho-AMPK α , bax and p53 and time-dependent decrease of bcl-2 and PCNA were confirmed by western blotting.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：臨床腫瘍学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：癌，細胞・組織，AMPK，アポトーシス，浸潤・転移

1. 研究開始当初の背景

正常細胞は種々の外界からのストレスに対し、多くの場合細胞周期をコントロールすることにより増殖スピードを一時的に落として、その間にストレスによるダメージに対処しようとする。ダメージからの回復が不可能な場合にはアポトーシスが

誘導されて、細胞は死に向かう。癌細胞はこのアポトーシスという機能から逸脱することにより、無秩序な細胞増殖を獲得して腫瘍塊を形成し、周囲組織への浸潤能の獲得とそれに引き続く転移形成が癌治療を困難としている。また、癌治療において、

抗癌剤や放射線照射法の進歩に伴い外科的手術なく完治する症例が増えてきている一方で、化学療法や放射線療法に耐性を有し、治療の効果が表れなくなり、予後不良となってくる進行癌症例が臨床の場でしばしば見られる。よって治療に対し耐性を獲得した癌細胞に対し、いかにしてアポトーシスを起こさせるかが重要となってくる。

癌細胞は継続的無秩序な増殖を特徴としているため、癌の増殖とその関連する遺伝子の異常を研究することは、癌の本態解明と治療法の開発にとって重要なことと考えられる。細胞周期を司る遺伝子の中でも癌抑制遺伝子である p53 遺伝子は現在でもなお注目され続ける遺伝子であり、その変異の存在を検索することが腫瘍の進展や予後を推定する指標の一つとされている。また、p53 依存性アポトーシスを誘導する際に細胞内アポトーシス制御因子として Bcl-2 ファミリータンパク質と IAP ファミリータンパク質が働いており、細胞外からのアポトーシス制御はこれらのタンパク質を量的、質的に調節することにより行われている。研究代表者はこれまでに口腔扁平上皮癌の生検組織における浸潤先進部での p53 ならびに p53 関連タンパクである PCNA、p21 の発現を免疫組織化学的に検出し、臨床経過と比較検討することにより、タンパク発現と予後との関係を見だし、予後想定因子となりうるとの研究結果を得た (Kato K, et al. *Pathol Oncol Res*, 2008. 加藤広祿. 十全医学会誌, 2003)。さらに Bcl-2 ファミリータンパク質の発現が臨床病理学的に予後と相関することを確認している (Kato K, et al. *Oral Pathol Med*, 2008)。近年行われている遺伝子治療のターゲット遺伝子の多くはこの p53 遺伝

子であり、p53 遺伝子異常の頭頸部癌においても遺伝子治療の臨床治験が行われることが予想されてはいるが、現在の遺伝子治療は従来の治療法を補完するだけで、根治的な治療には結びついていない。

そこで、種々の臓器や細胞におけるエネルギー代謝調節に関わっている AMP-activated protein kinase (AMPK) が重要となってくる。この AMPK は、p53 に働きかけることにより細胞増殖に深く関わっているとされており、大腸がんにおいて AMPK ががん細胞の生成に大きく関与していることが発見され (Jun HL et al. *Nature*, 2007)、現在、糖尿病治療薬として市販されている AMPK 活性化薬剤 (AICAR; 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside ならびにメトホルミン) の腫瘍増殖抑制効果に大きな期待が寄せられている (Buzzai M, et al. *Cancer Res*, 2007)。これまでに口腔扁平上皮癌に対する研究はほとんどされておらず、今後は口腔扁平上皮癌に対する AMPK 活性化薬剤によるアポトーシス制御因子の変動を調査し、これにより口腔扁平上皮癌細胞の増殖・浸潤・転移を抑制できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

口腔扁平上皮癌においては、深部組織への浸潤像が癌の悪性度と密接な関係があるとする報告が多くみられ、び漫性に浸潤する口腔扁平上皮癌の局所ならびに転移制御の困難さは癌治療担当者を悩ませており、集学的治療が望まれている。これまでわれわれは一貫として高浸潤性口腔扁平上皮癌における接着、基質分解、運動、増殖、脈管新生など、組織学的特徴ならびに細胞生物学的特徴について研究を行っ

てきた。それにより高浸潤性口腔扁平上皮癌細胞今後その特徴を踏まえた上で、いかにして高浸潤癌に対する治療を行っていくか、つまり、遺伝子治療や分子標的治療を含めた癌細胞の無力化を研究課題としていくことが重要と考えた。

そこで口腔扁平上皮癌に対し、アポトーシスを誘導する AMPK 活性化薬剤を使用することによる癌細胞の増殖・浸潤・転移抑制効果を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、p53 調節因子である AMPK に着目し、口腔扁平上皮癌由来細胞株ならびに抗癌剤耐性細胞株に対し、現在市販されている AMPK 活性化薬剤(AICAR)を用いて、①MTS assay 法を用いた細胞増殖抑制効果の検討、②Western blot を用いた細胞内のアポトーシス関連蛋白発現変動の検討、③invasion assay を用いた浸潤抑制効果の検討を行った。

口腔扁平上皮癌の癌浸潤様式である山本-小浜分類 4D 型由来細胞株である HOC313 細胞、4C 型由来細胞株である OSC-19 細胞ならびに 3 型由来細胞株である OSC-20 細胞を使用し、まずは濃度依存的効果を検討するため、0.1、0.2、0.5、1、2、5、10mM の濃度に調整し、作用させた。次に、時間依存的効果を検討するため、2mM の AICAR を 24、48、72 時間作用させ、AICAR の口腔扁平上皮癌細胞の増殖活性に対する効果を検討した。

また、口腔扁平上皮癌の癌浸潤様式 4D 型由来細胞株であり、高浸潤性・高転移性を有する HOC313 細胞を用い、2mM の AICAR を 1、2、4、8、24 時間作用させ、その細胞質ならびに核内のタンパク質を抽出し、AMPK α ならびにその活性型である

Phospho-AMPK α 、アポトーシス関連因子である bcl-2、bax、p53、PCNA の経時的変化を Western Blot 法を用いて検討した。

AICAR の口腔扁平上皮癌の細胞浸潤に対する効果についても invasion assay を用いて検討した。マトリゲルインサートならびにコントロールインサートに HOC313 細胞を播種し、37°C、5%CO₂ 下で 24 時間培養した。それぞれのインサートメンブレンを移動したメンブレン下面の細胞数から浸潤率を算定し、比較した。

4. 研究成果

MTS assay 法を用いた細胞増殖抑制効果の検討の結果、癌浸潤様式の異なる 3 種類いずれの細胞も時間依存的にも細胞増殖抑制効果があることが確認できた。

Western Blot 法を用いたタンパク質発現の変動を検討した結果、AMPK α 、Phospho-AMPK α ともに経時的に発現量の増加を認めた。また、アポトーシス抑制因子である bcl-2 の発現減弱、アポトーシス促進因子である bax の発現増加を認め、さらに、経時的な p53 の増加ならびに PCNA の減弱を認めた。

Invasion assay による AICAR の癌細胞浸潤に対する効果を検討した結果、顕著な細胞浸潤抑制効果が認められた。

以上の結果より、AMPK 活性化薬剤である AICAR の細胞増殖抑制効果ならびに浸潤抑制効果が確認され、今後の臨床における癌治療に対して期待できる薬剤であることが示唆された。今後は癌細胞の転移に対する効果ならびに抗癌剤耐性癌細胞に対する効果を明らかにしていきたい。

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 9 件)

① 加藤広禄、川尻秀一、北原寛子、吉澤邦

夫、山本悦秀. AMPK活性化薬剤による口腔扁平上皮癌の細胞増殖抑制効果の検討. 日本口腔組織培養学会誌 20(2010), 15-16, 査読無

- ② Noguchi N, Kawashiri S, Kato K, Yoshizawa K, Kitahara H, Yamamoto E. Expression of Hypoxia-Inducible Factor-1 Alpha in oral squamous cell carcinoma. XX Congress of the European Association of Cranio-Maxillo-Facial Surgery 1(2010), 53-57, 査読無
- ③ Chiba T, Maeda G, Kawashiri S, Kato K, Imai K. Epigenetic loss of mucosa-associated lymphoid tissue 1 expression in patients with oral carcinomas. Cancer Research. 69(2009), 7216-7223, 査読有
- ④ Yoshizawa K, Nozaki S, Okamune A, Kitahara H, Ohara T, Kato K, Kawashiri S, Yamamoto E. Loss of maspin is a negative prognostic factor for invasion and metastasis in oral squamous cell carcinoma. Journal of Oral Pathology and Medicine 38(2009), 535-539, 査読有
- ⑤ Kawashiri S, Tanaka A, Noguchi N, Hase T, Nakaya H, Ohara T, Kato K, Yamamoto E. Significance of stromal desmoplasia and myofibroblast appearance at the invasive front in squamous cell carcinoma of the oral cavity. Head Neck 31(2009), 1346-1353, 査読有
- ⑥ Kawashiri S, Noguchi N, Tanaka A, Nakaya H, Kato K, Yamamoto E. Inhibitory effect of neoadjuvant chemotherapy on metastasis of oral squamous cell carcinoma in a mouse model. Oral Oncology 45(2009), 794-797, 査読有
- ⑦ Ohara T, Kawashiri S, Tanaka A, Noguchi N, Kitahara H, Okamune A, Kato K, Hase T, Nakaya H, Yamamoto E. Integrin expression levels correlate with invasion, metastasis and prognosis of oral squamous cell carcinoma. Pathology and Oncology Research 15(2009), 429-436, 査読有
- ⑧ Kato K, Kawashiri S, Tanaka A, Noguchi N, Nakaya H, Hase T, Yamamoto E. Predictive value of measuring p53 labeling index at the invasive front of oral squamous cell carcinomas. Pathology and Oncology Research 14(2008), 57-61, 査読有
- ⑨ Kato K, Kawashiri S, Yoshizawa K, Kitahara H, Yamamoto E. Apoptosis-associated markers and clinical outcome in h

uman oral squamous cell carcinomas. Journal of Oral Pathology and Medicine 37(2008), 364~371, 査読有

[学会発表] (計15件)

- ① 吉澤邦夫, 能崎晋一, 八木瑞希, 木村依世, 杉浦史郎, 岡宗絢子, 北原寛子, 加藤広祿, 野口夏代, 川尻秀一, 中川清昌, 山本悦秀, 口腔扁平上皮癌における Mapin 発現と uPA/uPAR 発現—浸潤様式と予後との関連について—, 第 29 回日本口腔腫瘍学会総会, 2011 年 1 月 27 日, 崇城大学市民ホール (熊本県)
- ② 加藤広祿, 川尻秀一, 北原寛子, 吉澤邦夫, 山本悦秀, AMPK 活性化薬剤による口腔扁平上皮癌の細胞増殖抑制効果の検討, 第 47 回日本口腔組織培養学会学術大会, 2010 年 11 月 13 日, 高知城ホール (高知県)
- ③ 加藤広祿, 川尻秀一, 木村依世, 八木瑞希, 杉浦史郎, 岡宗絢子, 北原寛子, 吉澤邦夫, 野口夏代, 山本悦秀, AMPK 活性化薬剤による口腔扁平上皮癌の細胞増殖抑制効果の検討, 第 55 回日本口腔外科学会総会, 2010 年 10 月 18 日, 幕張メッセ (千葉県)
- ④ Noguchi, N., Kawashiri, S., Kato, K., Yoshizawa, K., Kitahara, H., Yamamoto, E., Expression of Hypoxia-Inducible Factor-1 Alpha in oral squamous cell carcinoma, XX Congress of the European Association of Cranio-Maxillo-Facial Surgery, 2010.9.14, Concertgebouw (Belgium)
- ⑤ 川尻秀一, 野口夏代, 加藤広祿, 吉澤邦夫, 山本悦秀, 口腔扁平上皮癌における予後予測因子の検討, 第 64 回日本口腔科学会総会, 2010 年 6 月 24 日, 札幌プリンスホテル国際館パミール (北海道)
- ⑥ 岡宗絢子, 川尻秀一, 北原寛子, 吉澤邦夫, 加藤広祿, 中川清昌, 山本悦秀, 口腔扁平上皮癌における微小血管密度・リンパ管密度と臨床および病理組織学的因子との関連について, 第 34 回日本頭頸部癌学会, 2010 年 6 月 11 日, 京王プラザホテル (東京都)
- ⑦ 吉澤邦夫, 能崎晋一, 岡宗絢子, 北原寛子, 加藤広祿, 野口夏代, 川尻秀一, 中川清昌, 山本悦秀, 口腔扁平上皮癌における Mapin 発現と uPA/uPAR 発現について, 第 28 回日本口腔腫瘍学会総会, 2010 年 1 月 28 日, 学術総合センター (東京都)
- ⑧ 川尻秀一, 大原照比差, 野口夏代, 北原寛子, 岡宗絢子, 吉澤邦夫, 杉浦史郎, 加藤広祿, 山本悦秀, 口腔扁平上皮癌におけるインテグリン発現と運動能との関係, 第 54 回日本口腔外科学会総会, 2009 年 10 月 9 日, 札幌コンベンションセンター (北海

道)

- ⑨ Kawashiri, S., Noguchi, N., Kitahara, H., Okamune, A., Kato, K., Yoshizawa, K., Yamamoto, E., Matrix metalloprotease and active type gelatinase of oral squamous cell carcinoma, The second world congress of the international academy of oral oncology, 2009.7.10, Sheraton Centre Toronto Hotel (Canada)
- ⑩ 加藤広祿, 川尻秀一, 吉澤邦夫, 北原寛子, 山本悦秀, 口腔扁平上皮癌における AMPK の発現に関する検討, 第 33 回日本頭頸部癌学会, 2009 年 6 月 11 日, ロイトン札幌 (北海道)
- ⑪ 吉澤邦夫, 能崎晋一, 岡宗絢子, 北原寛子, 加藤広祿, 川尻秀一, 中川清昌, 山本悦秀, 口腔扁平上皮癌由来細胞株における Maspin 発現と浸潤および予後との関連, 第 27 回日本口腔腫瘍学会総会, 2009 年 1 月 30 日, 栃木県総合文化センター (栃木県)
- ⑫ 川尻秀一, 田中 彰, 野口夏代, 中谷弘光, 加藤広祿, 長谷剛志, 吉澤邦夫, 大原照比差, 北原寛子, 岡宗絢子, 能崎晋一, 山本悦秀, ワークショップ『高悪性度口腔癌は克服できたか』癌浸潤様式 4D 型の生物学的性状, 第 46 回日本癌治療学会総会, 2008 年 10 月 31 日, 名古屋国際会議場 (愛知県)
- ⑬ 加藤広祿, 川尻秀一, 吉澤邦夫, 北原寛子, 岡宗絢子, 中谷弘光, 長谷剛志, 能崎晋一, 中川清昌, 山本悦秀, 口腔扁平上皮癌治療における摘除生検 (excisional biopsy) の有用性に関する検討, 第 53 回日本口腔外科学会総会, 2008 年 10 月 21 日, アスティ徳島 (徳島県)
- ⑭ Yoshizawa, K., Nozaki, S., Kitahara, H., Ohara, T., Kato, K., Kawashiri, S., Yamamoto, E., Maspin as a biomarker in oral squamous cell carcinoma, 3rd European Conference on Head and Neck Oncology, 2008.5.9, Zagreb(Croatia)
- ⑮ 吉澤邦夫, 能崎晋一, 北原寛子, 大原照比差, 加藤広祿, 川尻秀一, 中川清昌, 山本悦秀, 口腔扁平上皮癌における Maspin 発現と浸潤様式および予後との関連, 第 62 回日本口腔科学会総会, 2008 年 4 月 17 日, 福岡国際会議場 (福岡県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 広祿 (KATO KOROKU)
金沢大学・附属病院・医員
研究者番号: 30444201

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし