

機関番号：15501

研究種目：若手研究(スタートアップ)

研究期間：2009～2010年

課題番号：21890168

研究課題名(和文) 腫瘍血管新生抑制を標的とした口腔扁平上皮癌に対する分子標的療法の開発

研究課題名(英文) Development of the molecular target therapy for oral squamous cell carcinoma by tumor angiogenesis inhibit.

研究代表者

板敷 康隆 (ITASHIKI YASUTAKA)

山口大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：70530236

研究成果の概要(和文)：血管新生阻害剤の分子標的治療薬である bevacizumab と 5-FU 系抗癌剤である S-1 との併用は、ヒト口腔扁平上皮癌細胞株(HSC-2)の担癌ヌードマウスにおいて Control 群と比較し、bevacizumab 単独群、S-1 単独群においても抗腫瘍効果を認め、併用群ではさらなる抗腫瘍効果を認めたことから、口腔癌での新たな Tumor dormancy therapy となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Because the combination of bevacizumab and S-1 which was a 5-FU-based anticancer agent which was the molecular target drug of the vascularization repressor showed a significant antitumor effect in the implanted nude mouse of the oral squamous cell carcinoma cell, HSC-2, it was suggested that it was with new Tumor dormancy therapy for oral cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,050,000	315,000	1,365,000
2010年度	950,000	285,000	1,235,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

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：Bevacizumab、S-1、血管新生阻害、アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

テガフルの代謝産物である γ -butyrolactone (GBL) ・ γ -hydroxybutyric

acid (GHB) の血管新生抑制効果と分子標的薬である Bevacizumab (Bev) による血管新生阻害効果による口腔扁平上皮癌に対する抗腫瘍効果発現のメカニズムを解析し、分子標的

治療法の開発を目指す。

2. 研究の目的

ヒト口腔扁平上皮癌細胞に対して、S-1 および Bev をそれぞれ単独または併用した際の抗腫瘍効果発現のメカニズム・血管新生阻害効果について、*in vitro* と担癌ヌードマウスモデルを用いて検討を行い、将来臨床応用へと展開することを目的とする。

3. 研究の方法

ヒト口腔癌細胞を用い、Bev 単独、5-FU(S-1)単独、Bev と 5-FU(S-1)併用療法に対する *in vitro* 及び *in vivo* での効果判定を行う。また、血管内皮細胞株及び、マウス背部皮下法(DAS 法)を用い Bev 単独、S-1 単独、Bev と S-1 併用療法の評価を行う。また、ヒト口腔扁平上皮癌細胞株 HSC2 および SAS をそれぞれ $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 個をヌードマウス背部皮下に移植し作製したヌードマウス腫瘍(口腔癌担癌ヌードマウス腫瘍)が、推定体積 $100 \sim 200 \text{mm}^3$ になった時点で治療を開始する。

4. 研究成果

In Vitro において、ヒト口腔扁平上皮癌細胞株 (SAS・HSC-2) を Control (無血清培地で 48 時間後培養)、Bev ($10 \mu\text{g/ml}$) 単独、5-FU ($1 \mu\text{g/ml}$) 単独、Bev と 5-FU を併用処理し、VEGF-A の発現をウエスタンブロッド法にて確認したところ、SAS、HSC-2 共に Control と Bev 単独では発現に変化はなかったが、5-FU 単独では若干低下が生じ、併用群ではさらなる発現低下が生じた。

また、上記条件で 24 時間と 48 時間処理し

た培養液中の VEGF-A の濃度を ELISA 法で測定したところ、両細胞の 24 時間・48 時間処理では、Control 群と比較し、S-1 単独では低下が生じ、Bev 単独と併用群では著明な低下が生じていた。しかし、SAS、HSC-2 共に 5×10^4 個/ml を 96 ウェルのマイクロプレートに $100 \mu\text{l/well}$ ずつ播種し、Control (無血清培地で培養)、Bev ($1, 10, 100 \mu\text{g/ml}$ 、無血清培地) と 5-FU ($0.5, 1, \mu\text{g/ml}$ 、無血清培地) を併用処理した細胞に対する細胞増殖能を 24 時間と 48 時間処理し MTT assay にて評価した。その結果、24 時間処理、48 時間処理での SAS、HSC-2 の両細胞において、Control 群と比較し、5-FU の濃度依存による細胞増殖抑制は認められたもの、Bev の併用による濃度依存的な細胞増殖抑制効果は認められなかった。

以上のことから、口腔扁平上皮癌細胞株 (SAS、HSC-2) は VEGF を発現しており、産生した VEGF は培養液中に存在すると考えられた。培養液中に産生された VEGF はその中和抗体である Bev と結合すると考えられた。すなわち、Bev は培養液中の VEGF と特異的に結合し、癌細胞から産生された VEGF の量を減少させるが、Bev による直接的な癌細胞の増殖抑制効果は認められず、細胞増殖抑制効果は 5-FU によるものである可能性が示唆された。

In Vivo では、HSC-2 をヌードマウス背部皮下に移植し腫瘍形成後、Control 群、Bev 単独群 ($100 \mu\text{g}$ を週 2 回 3 週間腹腔内投与)、S-1 単独群 (6.9mg/kg/day 3 週間連続経口投与)、Bev と S-1 を併用し、21 日投与後の残存腫瘍では、特に Control 群と併用群において著明な差が認められた。期間中の全ヌードマウスの著明な体重減少は認められなかったことから、4 群ともに著明な副作用は生じていないと考えられた。

残存腫瘍での CD34 免疫染色では Control 群と比較し、S-1 単独、Bev 単独、併用群の順に腫瘍新生血管の低下が認められ、Ki67 免疫染色では Control 群、Bev 単独群、S-1 単独群、併用群の順に細胞増殖能の低下が認められた。TUNEL 法では Control 群、Bev 単独群、S-1 単独群、併用群の順に Apoptosis が増大していた。

以上の結果から、Bev は VEGF-A と直接結合し腫瘍の血管新生阻害を介し、抗腫瘍効果が生じると考えられた。一方、S-1 には直接的な抗腫瘍効果と共に、血管新生阻害作用を有していることが認められた。さらに、Bev と S-1 の併用により抗腫瘍効果が著明に認められた。

すなわち、Bev が VEGF-A と特異的に結合し、未熟な腫瘍血管を退縮させる結果、癌細胞への栄養供給阻害が生じ腫瘍細胞の増殖抑制や Apoptosis を引き起こし、抗腫瘍効果を発揮していることが考えられた。さらに、Bev 作用により残存血管が正常化され、腫瘍内へのドラッグデリバリーが改善した結果、抗癌剤の腫瘍への供給が高まる可能性が示唆された。そして、腫瘍内へ達した 5-FU は腫瘍細胞に対し DNA 合成阻害・RNA 機能障害を起こさせ、腫瘍細胞の増殖抑制や Apoptosis を誘導することにより単剤以上の抗腫瘍効果を発揮すると考えられた。また、Bev とは異なった機序による 5-FU には血管新生抑制作用も生じており、Bev と S-1 の併用するにより、2 次的ではあるが、Bev 単剤の血管新生阻害作用に上乘せする形で 5-FU の作用により腫瘍の血管新生阻害が生じ、5-FU の腫瘍へ供給をさらに高めることが可能になるため、Bev 単剤や S-1 単剤よりさらなる抗腫瘍効果が生じたと考えられた。

今回の研究において、分子標的治療薬の 1 つの抗 VEGF 抗体であるベバシズマブが、腫

瘍血管に変化を起こさせ、腫瘍増殖抑制に関与していると考ええる。すなわち、抗腫瘍効果の機序として、血管新生抑制を起こし、アポトーシスを誘導することが考えられた。現在行われている口腔癌の化学療法剤（5-FU 系・白金系・タキサン系など）は、副作用が強く、維持療法には適していない。ベバシズマブと S-1 の併用により腫瘍増大を有意に抑制できたことから、口腔癌での新たな Tumor dormancy therapy 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 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

- ① 口腔扁平上皮癌に対するベバシズマブと 5-フルオロウラシル併用効果の検討
(第 29 回 日本口腔腫瘍学会総会・学術大会、平成 23 年 1 月 8 日、熊本市) 崇城大学
- ② 分子標的治療薬ベバシズマブと TS-1 併用による単癌ヌードマウスに対する抗腫瘍効果
(第 55 回 (社) 日本口腔外科学会総会・学術大会、平成 22 年 10 月 17 日、千葉・幕張) 幕張メッセ
- ③ 血管新生阻害剤ベバシズマブの口腔扁平上皮癌に対する抗腫瘍効果の検討
(第 34 回 日本頭頸部癌学会、平成 22 年 6 月 10 日、東京・新宿) 京王プラザホテル

〔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

板敷 康隆 (ITASHIKI YASUTAKA)
山口大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：70530236

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし