

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791967

研究課題名（和文） 口腔扁平上皮癌の浸潤・転移に対する血管新生阻害剤および線維芽細胞増殖抑制剤の効果

研究課題名（英文） Effects of angiogenesis inhibitor and fibroblast growth inhibitor on invasion and metastasis of oral squamous cell carcinoma.

研究代表者

野口 夏代 (NOGUCHI NATSUYO)

金沢大学・附属病院・医員

研究者番号：90547176

研究成果の概要（和文）：口腔扁平上皮癌の臨床での浸潤および転移を忠実に再現できるマウス正所性移植モデルを用いて、抗癌剤と線維芽細胞増殖抑制剤の効果を検討した。癌細胞は高悪性度である浸潤様式 4D 型ヒト口腔扁平上皮癌細胞株である OLC-01 細胞を使用し、ヌードマウスの舌に移植した。抗癌剤はシスプラチンを線維芽細胞増殖抑制剤はトラニラストを用いて、浸潤と転移の阻止効果を調べた。その結果、併用群に腫瘍の大きさ、結合組織量、癌間質線維芽細胞の変化にそれぞれ効果を認め、臨床的にも有意義であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：Using an orthotopic implantation mice model in which the invasion and metastasis of oral cancer can be reproduced, we investigated the inhibitory effects of anticancer agent and fibroblast growth inhibitor on invasion and metastasis. A highly invasive and metastatic human oral squamous cell carcinoma cell line, OLC-01, was implanted into the tongue of nude mice, and cisplatin or tranilast were administered to the mice after the implantation. The effects of each drug on cancer invasion and metastasis were investigated. Tumor sizes and stromal collagen fiber volumes were significantly reduced in combination group of cisplatin and tranilast. And tumor stromas were changed properties in combination group. The use of anticancer agent and fibroblast growth inhibitor considering these effects may be clinically very useful.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,300,000	690,000	2,990,000

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：口腔扁平上皮癌、増殖抑制、線維芽細胞増殖抑制剤、シスプラチン、血管新生阻害剤、浸潤、転移

1. 研究開始当初の背景

当講座の山本は、1983 年に新しい浸潤様式分類を発表（Yamamoto E. et al.: Cancer 51:

2175-2180, 1983.）して以来、口腔癌の浸潤像と転移や予後との関連性についての研究を行ってきた。その結果、臨床病理学的には

浸潤像が転移や予後と最も相関する因子であることが明らかになり、浸潤機序の解明が治療成績の向上につながるものと確信し以後は基礎的研究を併せて行っている。浸潤機序を解明するには再現性のある実験モデルを用いた研究が必須である。しかし、口腔領域ではそのモデルに乏しく、忠実に生体での現象を再現できるものはなかった。そこで、当講座の川尻は、ヌードマウスの口腔内に口腔癌を移植する正所性移植法を用いた *in vivo* の浸潤・転移モデルを作製したところ、このモデルにおいては臨床における浸潤や転移の病態を忠実に再現できることが判明した (Eur J Cancer, Oral Oncology 31B(4): 216-221, 1996)。そこで、本研究計画においては、通常の臨床で用いている抗癌剤および最近臨床応用が期待される線維芽細胞増殖抑制剤が口腔癌の増殖、浸潤や転移を抑制する効果を有するか否か、この自然転移モデルを用いて検討する。

2. 研究の目的

臨床において抗癌剤を使用する目的は「癌を小さくする」ことである。本研究の目的は抗癌剤の口腔癌に対する増殖抑制効果のみならず、浸潤や転移に対する効果についても検討することである。また近年、癌間質線維芽細胞の病理形態像の検討により、癌間質量や線維芽細胞増殖性の強さが患者予後と強く相関し、癌間質線維芽細胞の存在様式は癌悪性度と強く相関していると考えられる。腫瘍間質の反応の違いにおいては線維芽細胞増殖抑制剤を用いて検討を行った。

多くの口腔癌患者の治療には抗癌剤が使用され、その臨床上的目的は腫瘍の縮小である。また、抗癌剤効果判定は腫瘍の大きさで行っているため、抗癌剤の臨床での効果や *in vivo* の実験での効果は腫瘍の縮小率で検討されたものが多く、癌の浸潤や転移に対する効果を検討したものはほとんどない。しかし、悪性腫瘍の治療を行う際に問題となるのは局所での増殖よりはむしろ周囲組織への浸潤や他臓器への転移である。特に転移の有無は癌患者の予後を左右する最も重要な因子であり、治療の成否は転移巣を制御し得るか否かが深く関与している。化学療法を行う上で浸潤や転移に対する効果を知ることは非常に重要である。なぜならたとえ腫瘍の縮小効果がなくとも浸潤や転移を抑制する効果があれば化学療法を行う意義があるからである。

しかしながら、浸潤や転移の研究を行う際にはそれを再現できるモデルが必要であるが、われわれの開発したモデルは臨床での浸潤・転移の様相を忠実に再現することが可能である。本モデルを用いた浸潤ならびに転移の機序に関する研究の成果の一部はすで

に報告したが、その結果、口腔癌細胞をヌードマウスの背部皮下に移植しても浸潤像を再現することはできないが、舌または口底に移植した場合、移植癌細胞数を少なくすることで、浸潤像を再現できることを報告した。本研究計画においてはこの同所性移植モデルを用い、口腔癌に対する抗癌剤の浸潤や転移に対する効果を検討する。抗癌剤は臨床で最もよく頻用されるシスプラチンを使用する。また、腫瘍の縮小効果、浸潤様式のダウングレード、リンパ節転移抑制効果、抗癌剤の組織学的抗腫瘍効果との関係やその機序についても検討する。間質反応の検討には線維芽細胞増殖抑制剤トラニラスト (現在術後の癒痕形成抑制やケロイド治療薬として市販され臨床ですでに用いられている薬剤) を用いる。なお、トラニラストは腫瘍間質の線維芽細胞の増殖を抑制すると共に血管新生も阻害することが明らかとなっている。また同様に、腫瘍の縮小効果、浸潤様式のダウングレード、リンパ節転移抑制効果、抗癌剤の組織学的抗腫瘍効果との関係やその機序についても詳細に検討した。

3. 研究の方法

用いる浸潤・転移モデルに関する基礎的な研究は既に行われており、本研究では最も高浸潤・高転移性を示した OLC-01 細胞 (65 歳女性舌癌患者の頸部リンパ節転移巣より樹立した中分化型の扁平上皮癌細胞・浸潤様式 4D 型) を用いて、ヌードマウスの舌に正所性移植し、浸潤および転移に対する影響を観察する。用いるマウスは 6 週齢・雌の BALB/c nu/nu のヌードマウス体重は 15~20g で、金沢大学医学部附属動物実験施設内で特定病原体除去環境下、室温 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 5\%$ にて飼育して使用する。OLC-01 細胞は 10% となるように牛胎児血清を加えたイーグル最小必須培地でインキュベーター内 (温度 37°C 、湿度 100%、5% CO_2) において継代培養し、必要に応じて使用する。ヌードマウスへの移植方法はまず、OLC-01 細胞を 0.2% トリプシン液で分散し、10% 牛胎児血清加イーグル最小必須培地中で細胞数を 1.6×10^7 個に調整した後に、その 0.020ml (3.2×10^5 個) を 26 ゲージ針付きの注射器でジエチルエーテル麻酔を行ったヌードマウスの舌粘膜下に移植する。OLC-01 細胞を本モデルに応用し、得られた組織を検討したところ、組織学的には浸潤様式は 4D 型であることがすでに判明している。移植腫瘍の浸潤に対する効果を検討するために腫瘍の HE 染色標本を用い、光顕的に観察して下里分類に従って分類し組織学的効果を判定した後に、山本-小浜の癌浸潤様式に準じて化学療法後の残存腫瘍の浸潤形態について評価する。実験に

使用する抗癌剤は臨床において頻用されるシスプラチンを使用する。抗癌剤の投与の量については、シスプラチンにおいては1.5mg/kg とすることにし、投与経路は腹腔内投与とした。また、それぞれ生食水を投与した群をコントロールとして同様の検討を行う。また、トラニラスト（線維芽細胞増殖抑制剤で術後の癒痕形成抑制やケロイド治療薬として臨床で用いられている薬剤）を用いる予定である。本剤は線維芽細胞の増殖抑制とともに血管新生も抑制することが知られており、癌細胞周囲の間質線維芽細胞の状態の変化について検討を加える。トラニラストの投与スケジュールは、これまでの同剤を用いた報告を参考にし、移植した癌細胞が局所に生着した後の移植後2日目から連日投与とする。浸潤に対する効果は同様に、切除した腫瘍のHE染色標本を用い、光顕的に観察して下里分類に従って分類し組織学的効果を判定した後に、山本-小浜の癌浸潤様式に準じて化学療法後の腫瘍の浸潤効果について評価する。また、転移に対する効果も同様に、頸部リンパ節のHE染色標本を用い、光顕的に観察して病理組織学的に転移形成の有無を確認し、対照群の転移形成率と比較検討するとともに、転移腫瘍の組織学的進展度を本間らの分類に従って判定し、頸部リンパ節転移腫瘍の進展についても検討する。

4. 研究成果

2010年度は線維芽細胞増殖抑制剤（トラニラスト）の腫瘍増殖や浸潤・転移に対する抑制効果を検討した。高浸潤性のヒト口腔扁平上皮癌細胞株のOLC-01細胞（浸潤様式4D型）をヌードマウスの舌に移植した後に、薬剤を投与した。その結果、移植腫瘍の大きさの平均はコントロール群とトラニラスト投与群、併用群では差が認められなかった。リンパ節転移に関しても両群に差は認められなかった。病理組織像で移植腫瘍がトラニラストを投与することで浸潤様式4C型や3型にダウングレードする傾向は認められなかった。しかし、癌細胞の細胞増殖活性を観察するために増殖細胞核抗原PCNA抗体を、腫瘍組織の低酸素状態を観察するために低酸素誘導性因子HIF-1 α 抗体を用い免疫染色を行ったところトラニラスト投与群で細胞増殖活性の陽性率は減少し、HIF-1 α 抗体の陽性率が高い結果となった。また、トラニラストと抗癌剤（シスプラチン）を併用した群では用いたヌードマウスの約半数が実験期間中に死亡し明確な結果を得られなかった。浸潤様式4D型を示すOLC-01細胞を使用した群、それぞれの単剤投与では効果がほとんど認められなかった。しかしながら、抗癌剤併用群ではマウスの死亡例が認められたものの抗腫瘍効果が観察された。

2011年度は、口腔扁平上皮癌の浸潤と転移を臨床に近い状態で再現できる正所性移植モデルを用いて線維芽細胞増殖抑制剤（トラニラスト）と抗癌剤であるシスプラチンの両剤を使用し、増殖、浸潤、転移に対する抑制効果があるか否かを検討することに加え、腫瘍間質の反応の検討についても取り組んだ。マウスの舌に移植した細胞は口腔扁平上皮癌で最も悪性度の高い浸潤様式4D型と診断された舌癌患者の頸部リンパ節より樹立されているOLC-01細胞を使用し、翌日よりトラニラスト群、シスプラチン群、併用群、コントロール群に分け腹腔内投与をした。その結果、移植腫瘍の大きさの平均はコントロール群と併用群の間に有意差があった。リンパ節転移率は全体で8.33%と低く検討不能であった。結合組織量を観察するためアザン染色を行ったが、トラニラスト群では結合組織量が顕著に抑制されていたが、筋線維芽細胞のマーカーである α -SMA抗体、高浸潤癌の線維芽細胞に発現するMT-MMP1抗体による発現は減弱されていなかった。しかしながら、併用群では α -SMA抗体の発現の減弱が顕著だった。

これは、線維芽細胞増殖抑制剤であるトラニラストは結合組織量を減少させることはできるが、腫瘍間質の性質、すなわち癌細胞浸潤を誘導する癌間質線維芽細胞の性質は変化させることはできない。しかし、抗癌剤であるシスプラチンはその性質を減弱させることが可能であるのではないかと考えられた。これらの結果は、両剤を併用することによって腫瘍の増殖、浸潤に抑制効果がおおいに期待できることを明らかにした。トラニラストは確実に結合組織量を減少することのできる薬剤であり、副作用はほとんどないため、抗癌剤との併用は臨床で用いる薬剤として意義のあるものと考えられる。

実験期間中に若干数マウスが死亡したが検討可能な範囲内であり、現実験の投与薬剤濃度と投与頻度でマウス移植モデル実験を行った。今後はさらに個体数を増やして検討するとともに、血管新生阻害剤（アバスタチン）投与群も加え比較検討し、間質反応について明らかにしたいと考えている。また、臨床に応用する際に必要となる、抗癌剤と線維芽細胞増殖抑制剤との併用による投与量・投与方法に関する検討も予定している。

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4件）

- ① Kato K, Kawashiri S, Yoshizawa K, Kitahara H, Okamune A, Sugiura S, Noguchi N, Yamamoto E. Expression form of p53 and

PCNA at the invasive front in oral squamous cell carcinoma: correlation with clinicopathological features and prognosis. Journal of Oral Pathology and Medicine 40 (2011), 693-698, 査読有 DOI:10.1111/j.1600-0714.2011.01032.x

- ② Yoshizawa K, Nozaki S, Kitahara H, Kato K, Noguchi N, Kawashiri S, Yamamoto E. Expression of urokinase-type plasminogen activator/ urokinase-type plasminogen activator receptor and maspin in oral squamous cell carcinoma: Association with mode of invasion and clinicopathological factors. Oncology Report 26 (2011), 1555-1560, 査読有 DOI:10.3892/or.2011.1419
- ③ 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
- ④ 川尻秀一、加藤広祿、野口夏代、吉澤邦夫、北原寛子、山本悦秀. 口腔扁平上皮癌における臨床ならびに病理組織学的所見と予後との関係. 石川県歯科医師会歯科学報 1(2010), 9-13, 査読無

[学会発表] (計 9 件)

- ① 杉浦史郎、加藤広祿、野口夏代、吉澤邦夫、北原寛子、岡宗絢子、八木瑞希、木村依世、吉本 泰祐、川尻 秀一、口腔扁平上皮癌における接着分子としての CD44v3 の発現と臨床病理組織学的因子との関係, 第 30 回日本口腔腫瘍学会学術集会, 2012 年 1 月 26 日, 大宮ソニックシティ (埼玉)
- ② Kawashiri, S., Noguchi, N., Kato, K., Yoshizawa, K., Kitahara, H., Okamune, A., Sugiura, S., Yamamoto, E., Evaluation of clinical and histopathological factors for survival in squamous cell carcinoma of oral cavity. 20th International Conference of Oral and Maxillofacial Surgery, 2011.11.3, Casa Piedra Centro de Eventos Congressos, Santiago (Chile)
- ③ 北原寛子, 川尻秀一, 野口夏代, 加藤広祿, 吉澤邦夫, 岡宗絢子, 山本悦秀, E-Cadherin の口腔扁平上皮癌の浸潤への影響, 第 35 回日本頭頸部癌学会, 2011 年 6 月 10 日, ウィンクあいち (愛知県)
- ④ 杉浦史郎, 川尻秀一, 加藤広祿, 野口夏代, 吉澤邦夫, 北原寛子, 岡宗絢子, 八木瑞希, 木村依世, 山本悦秀, 口腔扁平上皮癌における接着分子としての CD44 の発現, 第 65 回日本口腔科学会学術集会, 2011 年 4 月 22 日, タワーホール船堀 (東京都)

- ⑤ Yoshizawa K, Kawashiri S, Kitahara H, Kato K, Noguchi N, Yamamoto E, uPA, uPAR and Maspin expression as a biomarker in invasive oral squamous cell carcinoma, 3rd International Conference on Innovative Approach in Head & Neck Oncology, 2011.2.25, Palau de Congressos de Catalunya Barcelona (Spain)
- ⑥ 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)
- ⑦ 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)
- ⑧ 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)
- ⑨ 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. 研究組織

(1) 研究代表者

野口 夏代 (NOGUCHI NATSUYO)

金沢大学・附属病院・医員

研究者番号: 90547176

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし