

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24593033

研究課題名(和文) 口腔癌細胞自身が発現する VEGF 受容体シグナルを標的とした新しい治療法の開発研究

研究課題名(英文) Development research of new therapies targeting VEGF receptor that was expressed in oral cancer cells, and its signaling

研究代表者

小泉 浩一 (Koizumi, Koichi)

広島大学・医歯薬保健学研究院・助教

研究者番号：30335682

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：血管内皮増殖因子(VEGF)は腫瘍細胞によって産生され、パラクライン機構を介して腫瘍の増殖や浸潤・転移を制御していることが知られている。

本研究では、腫瘍細胞自身がVEGF受容体を発現していることを明らかにし、その運動能や増殖能がVEGF受容体/PI3/Akt系を介したオートクライン機構で制御されている可能性を示唆した。現在VEGF受容体系を分子標的とした新しい治療法の開発を研究中である。

研究成果の概要(英文)：It is known that vascular endothelial growth factor (VEGF) is produced by tumor cells, and control the tumor growth, invasion and metastasis through a paracrine mechanism.

In this study, we revealed that tumor cells express VEGF receptors, and the possibility of its motility and proliferation ability is controlled by autocrine mechanism via the VEGF receptor / PI3 / Akt system. We are currently studying the development of new therapies targeting the VEGF receptor system.

研究分野：外科系歯学

キーワード：VEGF 口腔癌 分子標的治療薬 オートクライン機構 PI3-Akt系

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍の特徴は周囲組織への著しい浸潤性増殖と遠隔臓器への転移巣の形成であり、それを制御するための治療法として血管新生の重要な担い手である血管内皮増殖因子(Vascular Endothelial Growth Factor: VEGF)が注目されている。VEGFは腫瘍細胞によって産生され、パラクライン機構を介して腫瘍周囲の血管内皮細胞の増殖や遊走を亢進することにより、腫瘍組織での血管新生を誘導し、腫瘍の増殖や浸潤・転移を制御していることが知られている。その代表薬としてペバシズマブ(アバスチン®)は大腸癌の治療薬として広く使用されているが、出血、血栓症、消化管穿孔、創傷治療の遅延、血圧上昇などの副作用が問題となっている。その一方で、我々は腫瘍細胞自身がVEGF受容体を発現していることを明らかにしており、細胞自身が産生するVEGFsがオートクライン機構を介して癌細胞の浸潤・転移に関与しているものと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、VEGFsのオートクライン機構の解析を行うとともにVEGF・同受容体系を分子標的とした新しい口腔癌の治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

VEGFが口腔扁平上皮癌細胞の増殖や浸潤に与える影響について実験し、さらにそのシグナル伝達系を解析することにより、VEGF・同受容体系のオートクライン機構の解明を行う。又in vivoでVEGF・同受容体系を分子標的とした薬剤を投与しその効果を検討し、新しい治療法の開発を目指す。

(1) 口腔扁平上皮癌細胞におけるVEGFに対する増殖能および運動能の検討

VEGF(-A、-B、-C)が増殖に関して関与しているかどうかを検討。
口腔扁平上皮癌細胞を各濃度のVEGF存在下の無血清培養で7日間培養し、その細胞数を比較検討。

運動能に与えるVEGFsの影響の検討。
ケモタキセル(クラボウ社)を用いたボイデンチャンバーの変法にて、種々の濃度のVEGFをupper wellおよびlower wellに添加し、口腔扁平上皮癌細胞においての運動能を検討し、VEGFsがケモタキセルまたはケモカインesisに機能しているかどうかを解析する。

(2) 口腔扁平上皮癌細胞の増殖能、運動能に及ぼすVEGF受容体チロシンキナーゼ阻害剤の検討

VEGF受容体のチロシンキナーゼ阻害剤を用いた実験

VEGFR1(flt-1)及びVEGFR2(KDR)のチロシンキナーゼ阻害剤である4-フェニルアミノ6,7-ジメトキシキナゾリンを用いて、VEGFによる運動能の影響について検討する。各濃度のflt-1及びKDRチロシンキナーゼ阻害剤で口腔扁平上皮癌細胞を処理し、VEGF存在下での遊走細胞数を算定し比較検討する。

VEGFR2(KDR)のチロシンキナーゼ阻害剤を用いた実験

KDRのチロシンキナーゼ阻害剤(5-プロモ-3-メチレン-1,3-ジヒドロインドール)で口腔扁平上皮癌細胞を処理した時の運動能をと同様の方法で検討する。とを比較検討することによりいずれのVEGF受容体が関与しているのかを検索する。

VEGF受容体の中和抗体における実験
flt-1及びKDRの中和抗体を用いてVEGFによる運動能の影響について検討する。

(3) VEGFs、VEGF受容体のsiRNAを導入した癌細胞における増殖能と運動能についての検討

VEGFs、VEGFR1(flt-1)、VEGFR2(KDR)のsmall interfering RNA(siRNA)を導入した口腔扁平上皮癌細胞の運動能について解析する。FITC標識されたsiRNAを口腔扁平上皮癌細胞および唾液腺癌細胞に添加し、24時間後、蛍光顕微鏡にてsiRNAが大部分の細胞の核に移行しているのを確認した後、口腔扁平上皮癌細胞の運動能に与える影響について、ボイデンチャンバーの変法にて検討する。

VEGFs、VEGFR1(flt-1)、VEGFR2(KDR)のsmall interfering RNA(siRNA)を導入した口腔扁平上皮癌細胞の増殖能について検討する。siRNAを導入した口腔扁平上皮癌細胞を無血清培養下で経時的变化を比較検討する。

これら細胞の運動能・増殖能に及ぼすVEGFsの影響についても検討する。

(4) VEGF・同受容体の下流のシグナル伝達系についての検討

口腔扁平上皮癌細胞において、VEGF刺激によりMAPキナーゼカスケードの活性化が誘導されているか解析する。口腔扁平上皮癌細胞をVEGF存在下で培養し、Erkのリン

酸化をウエスタンブロット法にて検討する。

口腔扁平上皮癌細胞において、VEGF 刺激により PI3K/Akt の活性化が誘導されているかどうか解析する。口腔扁平上皮癌細胞を VEGF 存在下で培養し、Akt のリン酸化をウエスタンブロット法にて検討する。

Erk および Akt のリン酸化が先の VEGF 受容体チロシンキナーゼ阻害剤により抑制されるかどうか検討。Erk および Akt のシグナル伝達系阻害が運動能に与える影響について検討する。

(5) ヌードマウス背部皮下移植口腔扁平上皮癌の増殖能の検討

ヌードマウス背部皮下に口腔扁平上皮癌細胞を移植し、腫瘍を増殖させた後、Invitro の検討にて効果が認められた si-RNA (VEGFs、flt-1、KDR) を遺伝子銃 (Biorad 社製：現有) またはエレクトロポレーションシステムを用いて経皮的に移植口腔癌組織に導入しその増殖に及ぼす影響を検討する。

さらに、flt-1、および KDR の中和抗体 (flt-1 モノクローナル抗体: KM1750 協和発酵、KDR モノクローナル抗体: KM1992: 協和発酵) を腹腔内に投与し腫瘍の増殖能を比較検討する。同様の検討を、Avastin などの抗 VEGF 抗体でも行う。

腫瘍細胞のアポトーシス、血管新生等の有無を組織学および免疫組織学的に検討する。

4. 研究成果

(1) 口腔扁平上皮癌細胞における VEGF に対する増殖能および運動能の検討

(invitro 実験) 口腔扁平上皮癌細胞の増殖能には VEGF は影響を与えなかった。

(invitro 実験) 口腔扁平上皮癌細胞の運動能には VEGFs がケモタキシスおよびケモカイネシスに機能していた。

VEGF は in vitro の実験では増殖能には影響を与えないが、運動能には影響を与えることが確認された。

(2) 口腔扁平上皮癌細胞の増殖能、運動能に及ぼす VEGF 受容体チロシンキナーゼ阻害剤の検討

VEGF 受容体チロシンキナーゼ阻害剤で処理することにより、VEGF によって亢進された運動能は低下した。

VEGFR2 チロシンキナーゼ阻害剤の処理では、VEGF によって亢進された運動能は変化を見せなかった。

VEGFR1 の中和抗体で処理することにより、VEGF によって亢進された運動能は低下したが、VEGFR2 の中和抗体で処理すると運動能には影響を受けなかった。

VEGF の運動能の亢進は VEGFR1 を介したシグナル伝達系であることが示唆された。

(3) VEGFs、VEGF 受容体の siRNA を導入した癌細胞における増殖能と運動能についての検討

siVEGFR1 導入細胞では、コントロールと比較して運動能の低下が見られ、VEGF 添加によっても亢進は認めなかった。一方で siVEGFR2 導入細胞はコントロールとほぼ同様の結果となった。

siVEGFR1 導入細胞は増殖能にも影響を与えたが、siVEGFR2 導入細胞は影響を受けなかった。

VEGF による運動能亢進は (2) の実験結果と同様に VEGFR1 を介したシグナル伝達系であることが示唆された。さらに、VEGFR1 をノックアウトすることで増殖能にも影響を与えることが確認された。

(4) VEGF・同受容体の下流のシグナル伝達系についての検討

VEGF 刺激による MAP キナーゼカスケード / Erk のリン酸化は認められなかった。VEGF 添加後 60 分〜で PI3K/Akt の活性化が誘導された。

Akt のリン酸化は VEGF 受容体チロシンキナーゼ阻害剤では抑制されたが、VEGFR2 チロシンキナーゼ阻害剤では抑制されなかった。

VEGF は VEGFR1 と結合し、PI3/Akt 系を介してシグナル伝達していることが示唆された。

(5) ヌードマウス背部皮下移植口腔扁平上皮癌の増殖能の検討

ヌードマウス背部皮下に 5×10^6 個の口腔扁平上皮癌細胞を移植し、4 日目より VEGFR モノクローナル抗体 (KM1750) を隔日に腹腔内に投与し腫瘍の増殖能を比較検討したところ、10 日目ごろまでは差がなく、15 日目より腫瘍増殖が活発化してきたが、その立ち上がりは変わらずにずれる程度で有意差は認めなかった。

以上の結果より、口腔癌細胞は VEGF / VEGFR1 / PI3 / Akt 系を介したオートクライン機構で運動能を制御しており、このシグナル伝達系を分子標的とした治療法を開発中である。

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 0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

小泉 浩一 (KOIZUMI KOICHI)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院
・助教
研究者番号：30335682

(2)研究分担者

吉岡 幸男 (YOSHIOKA YUKIO)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院
・助教
研究者番号：20335665

林堂 安貴 (HAYASHIDO YASUTAKA)
広島大学・病院・講師
研究者番号：70243251

岡本 哲治 (OKAMOTO TETUJI)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院
・教授
研究者番号：00169153