

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 25 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24792209

研究課題名(和文)ミトコンドリアをターゲットとした口腔癌新規治療法の開発

研究課題名(英文)Development of the new treatment in oral cancer related to mitochondrial apoptosis

研究代表者

長谷川 巧実(HASEGAWA, TAKUMI)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：50546497

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、口腔扁平上皮癌に対して局所的炭酸ガスを応用し、癌細胞内のミトコンドリア経路を介したアポトーシス関連因子、転移関連因子、癌の増殖抑制効果およびリンパ節転移抑制効果を観察することを目的とした。in vivoにおいてマウスに移植したヒト口腔扁平上皮癌由来細胞 HSC-3に局所的炭酸ガスを投与することで、癌の増殖抑制とリンパ節転移抑制効果が確認された。炭酸ガス投与群で、Caspase-3,9、PARPの増加、PGC-1、TFAMの上昇、HIF-1、VEGF、MMP2,9の減少を認めた。局所的炭酸ガス投与は口腔癌に対する新規治療法となり得る可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the effects of transcutaneous CO2 on cancer apoptosis and lymphogenous metastasis using human SCC xenografts. Our results showed that transcutaneous CO2 affects expressions of PGC-1 and TFAM and protein levels of cleavage products of caspase-3, caspase-9 and PARP, which relatives mitochondrial apoptosis. They also showed that transcutaneous CO2 significantly inhibits SCC tumor growth and affects expressions of HIF-1, VEGF, MMP-2 and MMP-9, which play essential roles in tumor angiogenesis, invasion and metastasis. In conclusion, transcutaneous CO2 suppressed tumor growth, increased mitochondrial apoptosis and decreased the number of lymph node metastasis in human SCC by decreasing intra-tumoral hypoxia and suppressing metastatic potential with no observable effect in vivo. Our findings indicate that transcutaneous CO2 could be a novel therapeutic tool for treating human SCC.

研究分野：口腔外科

キーワード：炭酸ガス 低酸素 扁平上皮癌 口腔癌 転移

1. 研究開始当初の背景

日本における悪性腫瘍は、死亡要因のトップであり、現在も増加し続けている。これらに対して、外科療法、放射線療法、化学療法などの治療があるが、それぞれの治療において、機能障害を含めた合併症は患者にとって多大な苦痛を与える。このような背景から癌治療については医療従事者あるいは研究者によって様々な研究が進められており、当科でも以前より、癌の早期発見や転移予防に対して研究をすすめてきた。近年では、副作用や有効性の観点から分子標的治療が注目されているが、未だ解決すべき課題は多い。このように、いまだ癌を克服したとは言えないのが現状であり、さらなる研究が望まれる。

さて、炭酸ガス療法は古くからヨーロッパで知られており、血流や微小循環の改善に用いられてきたが、炭酸ガスの局所への応用はなされておらず、癌組織に対しても使用されていなかった。近年われわれは、局所的炭酸ガス投与装置を開発し、血管拡張作用と Bohr 効果により、局所の酸素供給を増やし、細胞内のミトコンドリア量が増加することを証明した(Oe K et al. 2011)。一方、癌細胞はミトコンドリアと密接な関係がある。また、ミトコンドリアは、アポトーシスにも重要な働きをしており、癌細胞がアポトーシスに抵抗性になる原因はミトコンドリアにおける酸化リン酸化の低下にあるという報告もある(Willem H et al. 2011)。われわれは、細胞内のミトコンドリア量に注目し、実験を行った結果、種々の癌細胞内のミトコンドリア量が、良性腫瘍より少ないことを確認した。つまり、癌細胞内のミトコンドリア量を増加させれば、癌細胞内のミトコンドリアを介したアポトーシス経路が活性化し、癌細胞をアポトーシスに誘導できる可能性がある。

これら二つの背景から、癌組織に対して局所的に炭酸ガスを応用し、癌細胞内のミトコンドリア量を増加させ、癌組織の縮小が観察されるならば、癌治療における新たな知見となり、新規治療法として breakthrough となり得ると考えた。

2. 研究の目的

口腔扁平上皮癌に対して局所的炭酸ガスを応用し、癌細胞内のミトコンドリア経路を介したアポトーシス関連因子および癌の増殖抑制効果を観察することを目的とした。

3. 研究の方法

in vivo で、ヌードマウスに口腔扁平上皮癌由来細胞を移植し、われわれがすでに報告した方法(Oe K et al. 2011)で炭酸ガスを作用させ、腫瘍径(治療効果)、マウス体重(副作用)の変化を測定した。さらに、腫瘍を採取して、PGC-1、TFAM などミトコンドリア経路のアポトーシスに関連する因子を解析した。また、癌の増殖と浸潤、血管新生などに必須の役割を果たしていると考えられる

MMP2,9、VEGF や HIF-1 を解析し、実際のリンパ節転移についても検討した。

(1) 癌細胞の準備

ヒト口腔扁平上皮癌由来細胞 HSC-3 を用い、10%FBS、1000 U/mL ペニシリン/ストレプトマイシン、MEM 培地にて、インキュベーター内で 37℃、5%CO₂ の条件下で培養した。

(2) ヌードマウスへの癌細胞の移植

7 週齢の Nude Mouse 16 匹(CO₂ 実験群: 8 匹、コントロール群: 8 匹)を用いて、実験を行う。HSC-3(2 × 10⁶ cell)を Nude Mouse 背部に皮下移植し、移植 7 日後より週 2 回、処置を開始した。

(3) *in vivo* における局所的炭酸ガス投与

CO₂ 吸収促進ゲルをマウス背部に塗布し、投与時間 20 分間、週 2 回を経皮的に行い、21 日間ののちに評価する。投与方法は、われわれがすでに報告した方法(Oe K et al. 2011)で行った。コントロール群は CO₂ 吸収促進ゲルのみの塗布とした。

(4) 癌の増殖抑制効果および副作用の検討

腫瘍の体積 $V=(最大径) \times (最小径)^2 \times /6$ で求め、比較検討した。また、マウス体重の測定を行った。

(5) ミトコンドリア経路のアポトーシスの解析

実験終了後、腫瘍を採取して、PGC-1、TFAM、Caspase-3,9、PARP を Western blot 法、Real-time PCR 法で測定した。また、癌の増殖・浸潤の抑制の解析として、VEGF、MMP2,9 を同様に測定した。組織学的解析は、HIF-1、VEGF、MMP2,9 の免疫染色を行った。

(6) リンパ節転移の評価

マウスの腋下リンパ節組織を採取し、ヒト α -globin を用いた RT-PCR 法(Shigeta T et al. 2008)によりリンパ節転移数を比較、検討した。

4. 研究成果

(1) 局所的炭酸ガス投与による癌細胞の増殖抑制効果及び副作用

コントロール群と比較し、炭酸ガス投与群において、腫瘍体積の増殖抑制効果が認められた。また、副作用として体重減少の有無を比較したが、両群において有意な差は認められなかった。(図 1、2)

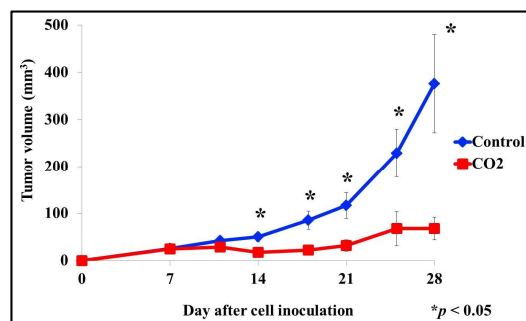


図 1. 局所的炭酸ガス投与による癌細胞の増殖抑制効果

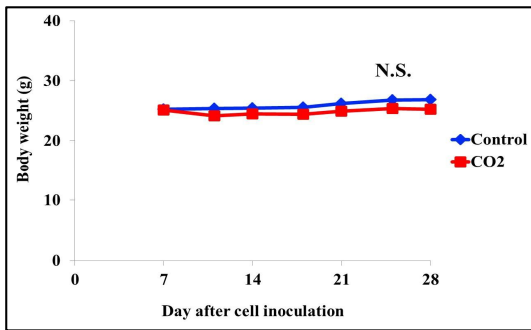


図 2 . 各群におけるマウス体重の変化

(2)アポトーシス関連因子の評価

コントロール群に比較し、炭酸ガス投与群で、ミトコンドリア経路のアポトーシス関連因子である Caspase-3, 9、PARP の増加を認めた。(図 3) また、同様に炭酸ガス投与群で、ミトコンドリア量の調節因子である PGC-1、TFAM の上昇を認め、転移抑制因子である VEGF、MMP2, 9 の減少を認めた。免疫染色において、炭酸ガス投与群で、HIF-1、VEGF、MMP2, 9 の減少を認めた。(図 4、5、6)

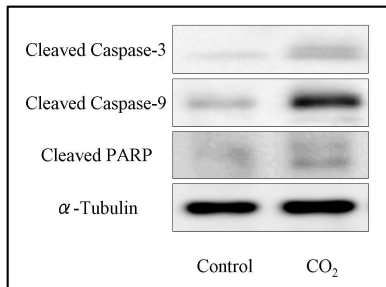


図 3 局所的炭酸ガス投与による Caspase-3, 9、PARP の変化

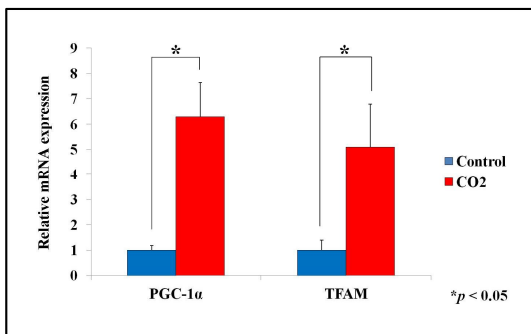


図 4 . 局所的炭酸ガス投与による PGC-1、TFAM の変化

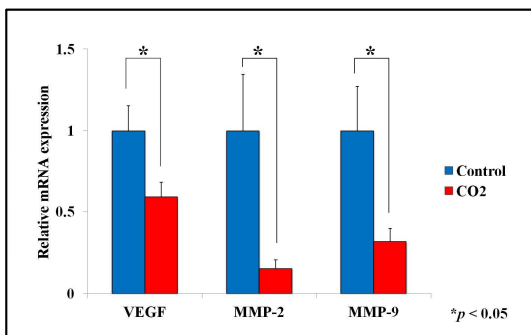


図 5 . 局所的炭酸ガス投与による VEGF、MMP2, 9 の変化

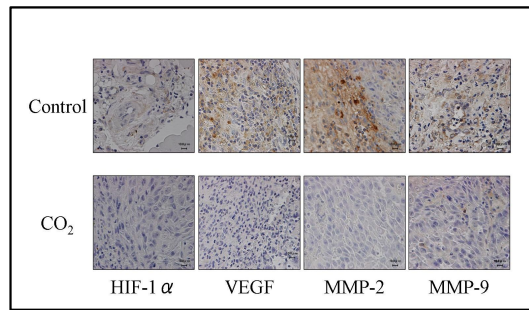


図 6 . 局所的炭酸ガス投与による HIF-1、VEGF、MMP2, 9 の変化

(3)リンパ節転移の評価

コントロール群では 62.5%、炭酸ガス投与群では 12.5%の腋下リンパ節転移が確認され、リンパ節転移抑制が認められた。(図 7)

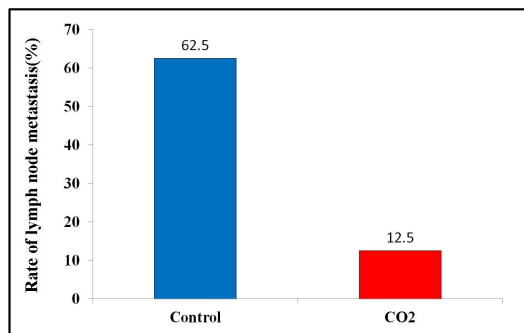


図 7 . 局所的炭酸ガス投与によるリンパ節転移抑制効果

本研究では、*in vivo* においてマウスに移植したヒト口腔扁平上皮癌由来細胞 HSC-3 に局所的炭酸ガスを投与することで、癌細胞の増殖抑制が確認された(図 1)。その機序のひとつとして、ミトコンドリア経路を介した癌細胞のアポトーシスが関連している可能性が示唆された(図 3、4)。

また、局所的炭酸ガス投与は、リンパ節転移の抑制効果も示した(図 7)。その背景として、腫瘍体積の減少(原発巣縮小)だけでなく、低酸素環境改善や転移能自体の減少も関連していると考えられた(図 5、6)。

今後、扁平上皮癌に対して、局所的炭酸ガス投与が応用されることにより、縮小手術、化学療法に使用される薬物量の減少、放射線療法での使用線量の減少等につながれば、治療に伴う合併症の軽減できる可能性がある。今後、転移抑制の詳細なメカニズムや、局所的炭酸ガス投与と放射線療法や化学療法の併用効果を検討していきたい。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Takeda D, Hasegawa T, Ueha T, Imai Y, Sakakibara A, Minoda M, Kawamoto T, Minamikawa T, Shibuya Y, Akisue T, Sakai Y, Kurosaka M, Komori T. Transcutaneous carbon dioxide induces mitochondrial

apoptosis and suppresses metastasis of oral squamous cell carcinoma in vivo. PLoS One. 査読有, 9(7), 2014, e100530. doi: 10.1371/journal.pone.0100530. eCollection 2014.

〔学会発表〕(計2件)

武田大介, 長谷川巧実, 今井佑輔, 榊原晶子, 重田崇至, 南川勉, 渋谷恭之, 古森孝英、「ミトコンドリア経路に関連した口腔癌新規治療法の開発」, 第58回日本口腔外科学会総会・学術大会、2013.10.11-13、福岡国際会議場(福岡)

武田大介, 長谷川巧実, 今井佑輔, 榊原晶子, 明石昌也, 南川勉, 渋谷恭之, 古森孝英、「局所的炭酸ガス投与による口腔癌新規治療法の開発」, 第59回日本口腔外科学会総会・学術大会、2014.10.17-19、幕張メッセ(千葉)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長谷川 巧実 (HASEGAWA, Takumi)

神戸大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号: 50546497

(2) 研究協力者

武田 大介 (TAKEDA, Daisuke)

上羽 岳志 (UEHA, Takeshi)

河本 旭哉 (KAWAMOTO, Teruya)

古森 孝英 (KOMORI, Takahide)