様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

# 科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２６ 年　５ 月 ２８ 日現在

機関番号：１５３０１
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2012～2013
課題番号：２４７９２２１６

研究課題名（和文）口腔癌の骨浸潤・骨破壊におけるＩＧＦ－１Ｒの役割

研究課題名（英文）The Role of Insulin-Iike Growth Factor-I Receptor in Oral Cancer Induced Bone Destruction

研究代表者
栗尾　奈愛（KURIO, NAITO）

岡山大学・大学病院・医員

研究者番号：８０６２２１４１

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　3,200,000円、（間接経費）　960,000円

研究成果の概要（和文）：インスリン様成長因子受容体は様々な癌細胞で高発現し，癌細胞の生存，増殖，浸潤に関与する。本研究ではIGF-1Rの阻害効果を持つメトホルミン塩酸塩の 口腔癌への抗腫瘍効果を検討した。結果、口腔癌細胞でIGF-1，IGF-1Rの高発現が認められ，腫瘍移植モデルで，メトホルミンによる増殖抑制効果を認めた。IGF-1添加で口腔癌細胞の細胞増殖が促進，メトホルミン濃度依存的に抑制された。IGF-1によりIGF-1Rがリン酸化されメトホルミンで抑制された。メトホルミン投与群ではTunnel陽性細胞が増加し，アポトーシスを誘導した。メトホルミンは口腔扁平上皮癌の腫瘍増殖を抑制する可能性を示唆した。

研究成果の概要（英文）：Insulin-like growth factors (IGFs), which are the most abundant growth factors stored in bone, have been implicated in progression and aggressiveness of many types of cancers.We planned the examination of the anti-tumor effects using Metformin, which have a inhibition effect of phosphorylation of IGF-1R. As a result, overexpression of IGF-1, IGF-1R was recognized in oral cancer cells. Treatment of mice with 1mg/kg metformin greatly decreased tumor cell proliferation. Metformin supprssed IGF-I stimulated proliferation, migration and phosphorylation of IGF-1R in vitro, and these effects were inhibited in the presence of Metformin with leading tumor cells to apoptosis. IGF-I signal was critically involved in oral cancer progression. And Inhibition of IGF-1R may be an effective therapeutic strategy for IGF-driven tumors.

研究分野：歯学

科研費の分科・細目：外科系歯学

キーワード：IGF-1R　メトホルミン塩酸塩　糖尿病治療薬　口腔癌　血管新生

## １．研究開始当初の背景

口腔癌において癌の顎骨浸潤・骨破壊はしばしば認められ，顎骨切除等の治療は，患者のQOLを著しく低下させ臨床上その克服は重要な課題である。癌の骨浸潤・骨破壊は破骨細胞性骨吸収が中心的な役割を担っている。骨組織は増殖因子を豊富に蓄積しており，破骨細胞性骨吸収によってIGF-1，TGF-β，FGF，PDGF等の増殖因子が骨髄中に放出される。骨髄内で最も優位な増殖因子は IGF-1 であり，正常状態では骨芽細胞の骨形成や血管新生に関与するが，癌細胞の IGF-1R に作用すると癌細胞の増殖を促進し，アポトーシスを抑制することが報告されている。癌細胞の増殖は腫瘍血管に依存し，癌細胞への血管新生が必要であり，IGF-1 は癌細胞に発現する IGF-1R を刺激し下流のシグナルである VEGF の発現を促し，血管新生による腫瘍増殖を促進することが知られている。以上よりIGF-1Rを高発現した口腔癌細胞は骨という特殊な環境下でIGF-1によって特異的に増殖が促進される可能性があり， IGF-1R は骨に浸潤する口腔癌の治療において分子標的となることが考えられ,IGF-1R を分子標的とした治療により癌の骨浸潤・骨破壊を制御できる可能性が示唆される。

## ２．研究の目的

IGF-1Rを分子標的とした治療は癌の骨浸潤・骨破壊病変において癌細胞の増殖抑制,血管新生抑制，破骨細胞性骨吸収抑制による治療効果が期待できることが示唆される。しかしながら口腔癌の骨浸潤・骨破壊病巣におけるIGF-1Rの関与については不明な点が多く生物学的な重要性はいまだ明らかにされておらず，IGF-1 シグナルの癌および癌骨破壊病巣における役割の解明は，口腔癌などの骨破壊病変の予防およびその治療において臨床上重要な課題として位置づけられると考える。

## ３．研究の方法

(1) 各種癌細胞における IGF-1R および IGF-1関連関連タンパクの発現

各種口腔扁平上皮癌細胞株における IGF-1R, IGF-1，AKT，mTOR，S6K，AMPKタンパクの発現およびリン酸化について Western blot 法を用いた比較検討を行う。

(2) 動物実験モデルの作製

1) 5週齢 BalbC*nu/nu*系ヌードマウスの背部皮下に各種口腔癌細胞株を50万/ml で打ち込みをおこない動物モデルを作製する。
2) これらの動物実験モデルに対して癌細胞を打ち込んだ後，IGF-1R 阻害効果を持つとされるメトホルミン塩酸塩を1mg/kgの濃度で１日１回の腹腔内投与を連日おこない，その腫瘍体積，重量を測定することにより腫瘍増殖抑制効果を検証する。対照群には生理食塩水を投与する。

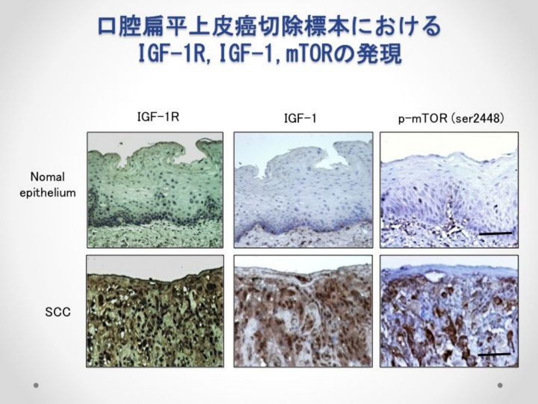
(3) in vitro においてメトホルミン塩酸塩が口腔癌細胞に与える影響

各種口腔癌細胞におけるメトホルミン塩酸塩の細胞増殖，遊走，アポトーシス，血管新生に与える影響

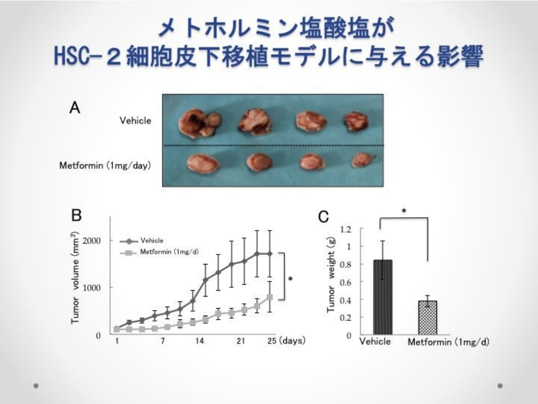
1) シグナルに及ぼす影響：各種細胞を 10% ウシ胎児血清(FBS)添加DMEM培地でIGF-1刺激をおこない，メトホルミン塩酸塩を添加 15, 30, 60, 120 分後に細胞を可溶化させ，pAKT，mTOR，S6Kのリン酸化に与える影響をウエスタンブロット法で確認する。
2) 細胞増殖能に与える影響：各種細胞を10%FBS添加DMEM培地で培養し，IGF-1で刺激をおこない，メトホルミンを添加24時間,48時間後の細胞数を血球計算板を用いて細胞数を測定し，さらにMTTアッセイをおこない細胞増殖に与える影響を測定する。
3) 細胞遊走能に与える影響：各種細胞をピペットチップで細胞を一部剥離させ，IGF-1R阻害剤を添加後24時間48時間後に細胞を固定後，顕鏡下にて画像を撮影し，遊走細胞面積を測定する (Lumina Vision)。
4) アポトーシスに与える影響：各種細胞を播種しIGF-1刺激とメトホルミン塩酸塩を添加し，TUNELアッセイを用いてアポトーシスを起こした細胞を測定する。またCasupase3等のアポトーシス関連因子をウエスタンブロット法を用いて明らかにする。さらにPI染色をおこなった細胞をフローサイトメトリーをおこないsub-G1期の細胞数を測定する。
5) 血管新生に与える影響：IGF-R阻害剤の口腔癌細胞が誘発する血管新生に与える影響を検討するため，血管新生キット（KURABO）を用い，IGF-1,VEGF,各種口腔癌細胞のコンディションメディウムを添加し誘導された血管新生に対するIGF-1R阻害剤の血管新生抑制効果を測定する。

## ４．研究成果

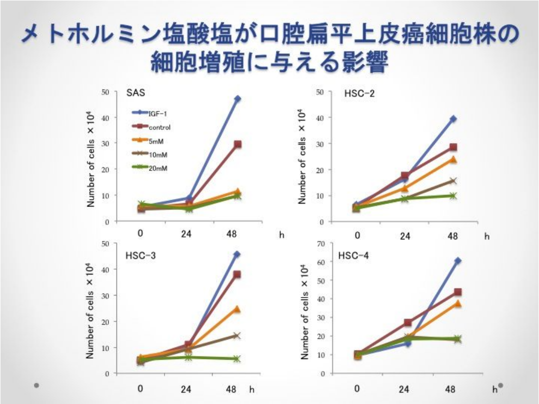
1)口腔癌切除標本において正常上皮と比較して癌細胞に IGF-1，IGF-1R，リン酸化 mTOR の高発現が認められた(下図)。



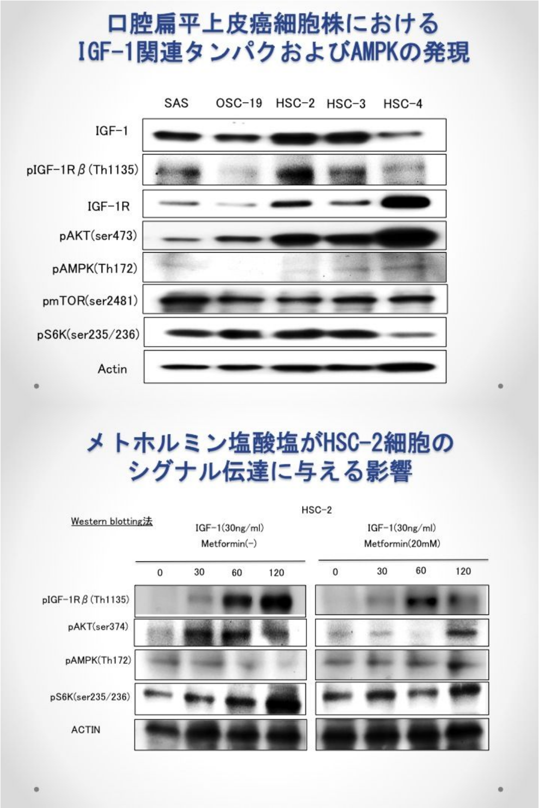

2)マウス背部皮下移植モデルにおいて，1mg/日のメトホルミン塩酸塩投与群では投与後 25 日目，コントロール群と比較して腫瘍体積と腫瘍重量に関して有意に腫瘍増殖を抑制することが明らかにされた(下図)。




3)血球計算板による腫瘍細胞数を測定すると IGF-1 添加により各種口腔癌細胞の細胞増殖が促進され，メトホルミン塩酸塩濃度依存的に抑制された(下図)。

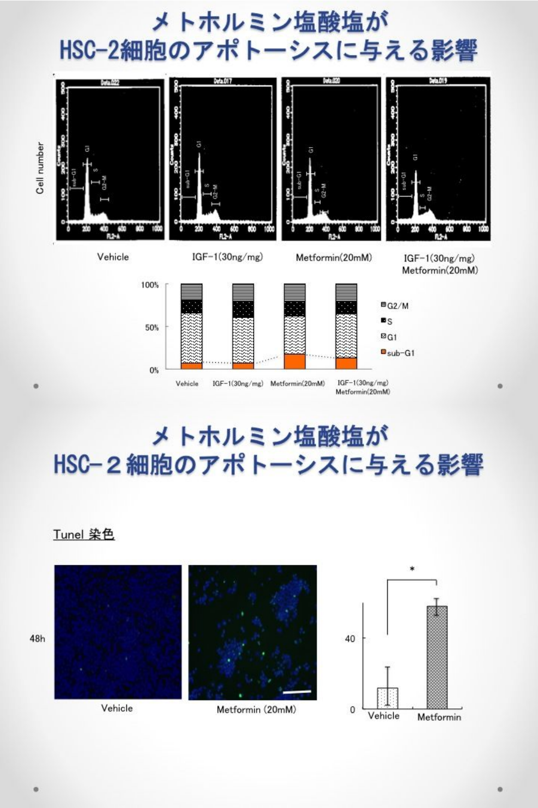



4)シグナル伝達では各種口腔癌細胞における IGF-1R 関連タンパクの高発現が認められ，AMPK のリン酸化の発現は抑制されていた。IGF-1 添加により IGF-1R とその下流の AKT，mTOR，S6K のリン酸化は促進されたが AMPK は IGF-1 添加によりリン酸化が抑制された。このリン酸化の抑制はメトホルミン塩酸塩投与によりリン酸化が回復することが確認された(下図)。




5)フローサイトメトリーによる細胞周期の検討では IGF-1 により S 期の増加、メトホルミン塩酸塩投与により sub-G1 期の細胞分画の増加が確認された。アポトーシスアッセイにおいてメトホルミン塩酸塩投与群では有意な Tunnel 陽性細胞の増加を認め，メトホ

ルミン塩酸塩が腫瘍細胞のアポトーシスへ誘導することが示唆された。しかしながらウェスタンブロット法による Caspase3 の発現を検討したが，メトホルミン塩酸塩による cleaved Caspase3 の発現は増加せず，アポトーシスの機序に関しては異なる機序をさらに検討する必要があると考えられた(下図)。




５．主な発表論文等

〔学会発表〕（計 4 件）

1．栗尾奈愛、2 型糖尿病治療薬メトホルミン塩酸塩の口腔扁平上皮癌に対する抗腫瘍効果の検討、第 67 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会、5/21-22/2013、栃木

2．Naito Kurio、The Role of Insulin-Iike Growth Factor-I And Focal Adhesion Kinase Signaling in Breast Cancer Induced Bone Metastasis、2nd Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and the Japanese Society for Bone and Mineral Research、5/28-6/1.2013、Kobe、Japan

3．栗尾奈愛、第 25 回基礎歯科医学会、2 型糖尿病治療薬メトホルミン塩酸塩の口腔扁平上皮癌に対する腫瘍増殖抑制効果、9/21-9/22.2013、岡山

4．栗尾奈愛、口腔扁平上皮癌に対する２型糖尿病治療薬メトホルミン塩酸塩の腫瘍増殖抑制効果、第 61 回日本口腔科学会中国・四国地方部会、11/16.2013 、岡山

６．研究組織

研究代表者

栗尾　奈愛（KURIO NAITO）

岡山大学大学病院口腔外科（病態系）・医員

研究者番号：80622141

研究分担者

なし