

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460137

研究課題名(和文) 生薬由来がん浸潤阻害分子標的治療薬の開発

研究課題名(英文) Development of molecular targeted drugs for oral cancer cell invasion using herbal end products

研究代表者

山口 洋子 (YAMAGUCHI, Yoko)

日本大学・歯学部・助教

研究者番号：00239922

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：歯周炎罹患歯肉から、コラーゲングル三次元培養するとコラーゲンを極度に分解する歯周炎関連線維芽細胞(PAF)を分離した。この線維芽細胞を口腔がん細胞の浸潤モデルに使用したところその浸潤を顕著に促進したため、「生体外口腔がん浸潤モデル」を確立することができた。このモデルを用いてスクリーニングを行ったところ、延べ60種類の生薬の中から、オウゴン等15種類の生薬に口腔がん浸潤阻害効果が認められた。さらに、口腔がん細胞の浸潤開始時と浸潤期の浸潤モデルをマイクロアレイ解析した結果、浸潤には細胞外マトリックスタンパク関連遺伝子が中心的な役割を果たすことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Previously, we have separated periodontitis-associated fibroblasts (PAF) which aggressively degrade collagen when cultured in three dimension (3D) with gingival epithelial cells. Using these fibroblasts, we have established “in vitro oral cancer invasion model” since PAFs strongly induced oral cancer cell invasion. Screening of 60 kinds of herbal end products using this model revealed that Licorice, and others had inhibitory effect for oral cancer cell invasion. Microarray analyses were performed using 3D gels and compared the gene expression profile between initial invasion period and invasion period. The results suggested that several kinds of extracellular matrix protein gene expression was enhanced during oral cancer cell invasion. Therefore, several herbal end products which regulate extracellular matrix protein expression might be effective for inhibiting oral cancer cell invasion.

研究分野：細胞生物学

キーワード：口腔がん浸潤モデル 三次元培養 生薬

1. 研究開始当初の背景

がんは、1981年からわが国の死因のトップとなっている。これまでのがん治療薬の大部分は、がん原発巣でのがん細胞の増殖抑制による主要の縮小を期待する薬剤であり、がん細胞の浸潤・転移を標的とする薬剤はほとんどなかった。しかし、がんによる死因はその9割が浸潤・転移によるものであり、その制御はがん克服のための最重要課題であった。がん細胞が浸潤するためには、まず基底膜成分を破壊することが必要であることから、基底膜を分解するマトリックス金属プロテアーゼ(MMP)阻害剤が、がんの浸潤・転移を抑制する有力な薬剤の候補となった。しかし、Marimastatを代表例とするMMP阻害剤は、通常必要な細胞外マトリックスのターンオーバーも阻害し、臨床治験では重篤な副作用が報告されたため、実現には至らなかった。

2. 研究の目的

近年、がん細胞の転移・浸潤には、がん細胞そのものの浸潤能よりも、がん組織の微小環境を構成するがん関連線維芽細胞(cancer-associated fibroblasts)の役割が大きいことが示唆されてきた(Östman A et al., Nat Rev Cancer 2004, Lung Cancer 2004)。申請者らは、歯周炎罹患歯肉由来線維芽細胞と歯肉上皮細胞を組み合わせて三次元培養を行ったところ、コラーゲンを極度に分解する歯周炎原因細胞と考えられる歯周炎関連線維芽細胞(periodontitis-associated fibroblasts)が存在することを見出し、世界で初めて「生体外歯周炎モデル」を構築した(Ohshima M et al., J Dent Res, 2010)。また、歯周炎関連線維芽細胞を用いた「生体外歯周炎モデル」において、がん関連線維芽細胞で高発現している遺伝子の多くを発現していることを見出し、両者に共通点があるのではないかと考えた。そこで、この歯周炎関連線維芽細胞を、三次元培養によるがん浸潤モデルに使用したところ、予想通りがん細胞の浸潤を顕著に促進した。

ところで、これまでの細胞増殖を抑制するがん治療薬とは異なり、最近、がん細胞に高発現する特定の分子を標的とした分子標的治療薬が開発され、臨床応用されるようになってきた。しかし、やはり副作用が大きいことから、長年使用され安全性が確立されている生薬の見直しの機運が高まっている。そこで、歯周炎治療薬としての生薬の可能性を探るため、「生体外歯周炎モデル」を用いて生薬のスクリーニングを行ったところ、いくつかの生薬にコラーゲン分解阻害効果があることがわかり、特許申請を行った。申請者は、(1)がん関連線維芽細胞とアグレッシブな歯肉線維芽細胞との共通点、(2)

アグレッシブな歯肉線維芽細胞による口腔癌細胞の浸潤促進、(3)生薬によるコラーゲン分解抑制という事実を考え併せ、生薬ががん細胞の浸潤を阻害するのではないかと仮説を立てた。そこでコラーゲン分解を阻害した生薬で予備実験を行ったところ、ある種の生薬が口腔がん細胞の浸潤を顕著に阻害することを見出した。

生薬には多数の成分が含まれており、それらのうちどれが有効成分なのかを見出すことは困難が伴っていた。しかし近年、キャピラリー・電気泳動飛行型質量分析装置(CE-TOFMS)を用いたメタボローム解析により、生薬や漢方薬成分の網羅的かつ短時間での同定が可能となった(Iinoら, Metabolomics, 2010)。そこで、がん細胞の浸潤を阻害した複数の生薬に関してメタボローム解析を行えば、共通する有効成分が特定でき、さらに、生薬を作用させたがん浸潤モデルとコントロールとでトランスクリプトーム解析を行えば、どの遺伝子が浸潤促進に関与しているのかを列挙できると考えた。また、両者の結果を照合することで、がん細胞の浸潤を促進する原因候補遺伝子と、その働きを抑制する生薬中の成分が特定でき、因果関係が明確化されることが期待できる。最後に原因候補遺伝子産物の働きを、特定された生薬中の成分が抑えるかどうかをタンパクレベルで確認し、がん浸潤阻害分子標的治療薬の候補としたい。

3. 研究の方法

がん関連線維芽細胞と類似していることがわかった歯周炎関連線維芽細胞に関して、理化学研究所 FANTOM5 プロジェクトのデータ解析を行い、通常の歯肉線維芽細胞との相違を検出した。また、がん細胞浸潤モデルを用いて、浸潤開始時と浸潤時の遺伝子発現の相違をマイクロアレイ解析し、浸潤に関与する遺伝子の候補をリストアップした。また、浸潤阻害効果を有する生薬をリストアップした。

(1) 三次元培養法を用いた「がん細胞浸潤モデル」

セルマトリックスに再構成用緩衝液、濃縮培地を加えて冷却しておく。ここにトリプシンで剥離し、ウシ胎児血清に浮遊させた歯周炎関連線維芽細胞を加えて攪拌し、6穴プレートの各ウェルに注入した。37℃でゲル化させた後、この上に各種がん細胞を播種した。次の日、ゲルをウェルの底から浮かせて培養を継続し、5日後にゲルをメッシュ上に載せ、ゲル表面が空気に曝された状態でさらに5日間培養を行い、がん細胞を浸潤させた。培養終了後、ゲルを固定し、パラフィンブロックを作成後、HE 標本作製して顕微鏡で観察

した。

(2) 生薬の準備

連携研究者の鳥居塚が現在所有する、オウゴン、カンゾウ、ケイヒ、サイシン、ジオウ、センキュウ、ブクリョウ、ポウフウ、リュウタン、ウイキョウ、エンゴサク、オウギ、オウレン、オンジ、カッコン、カンキョウ、キョウカツ、ケイガイ、ゲンチアナ末、コウボク、ゴシュユ、ゴミシ、サイコ、サンシシ、サンショウ、サンズコン、サンソウニン、シャクヤク、ショウキョウ、ショウブコン、センコツ、ソウジュツ、シンイの最低 33 種類の生薬を用いた。それぞれの生薬から、熱水またはメタノール抽出を行い、凍結乾燥した成分を生薬のサンプルとして用いた。

(3) 生薬のスクリーニング

歯周炎関連線維芽細胞をコラーゲンゲルに加える前に、熱水またはメタノール抽出した生薬を 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の週末濃度となるよう加えた。上記三次元培養後のゲルから HE 標本作製し、もとの基底膜の位置よりゲル内に浸潤した細胞数を計数し、コントロールとの比較により、各生薬の浸潤阻害効果を数値化した。

(4) 遺伝子発現プロファイルの比較 (トランスクリプトーム解析)

がん細胞の浸潤にかかわる遺伝子を特定するため、浸潤開始時 (空気曝露 1 日目) と浸潤期 (空気曝露 3 日目) で、遺伝子発現プロファイルの比較を行った。ゲルを BioMasher (ニッピ) および Trizol (Invitrogen) を用いて mRNA を抽出し、GeneChip (Affymetrix) を用いて遺伝子発現プロファイルの検索を行い、コントロールと比較し、浸潤促進遺伝子をリストアップした。

4. 研究成果

(1) 歯周炎関連線維芽細胞の特殊性

理研 FANTOM5 プロジェクトの CAGE データ解析により、ある遺伝子に関して、正常歯肉線維芽細胞は他の線維芽細胞とは異なる転写開始点を使っていることが判明し、特殊な細胞集団であることが明らかとなった。加えて歯周炎関連細胞の CAGE データを解析したところ、その転写開始点を使っておらず、またその上流の転写因子も発現していないことが判明した (東京大学呼吸器内科・堀江助教・齋藤助教の協力による)。このことで、歯周炎関連線維芽細胞が性状歯肉線維芽細胞とは明らかに異なる細胞集団であることが確認できた。

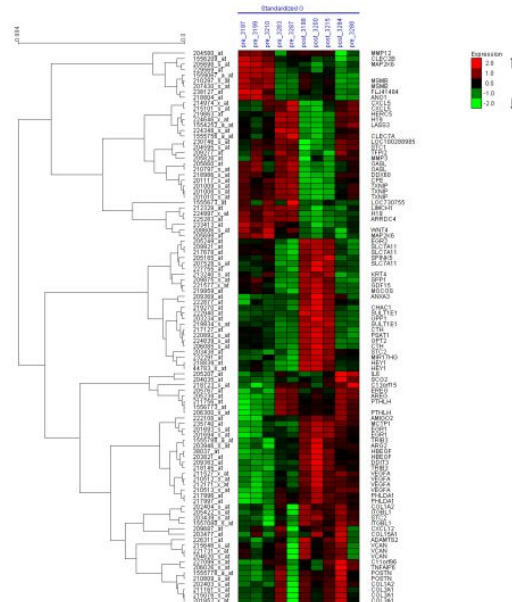
(2) 口腔がん細胞浸潤モデルによる生薬のスクリーニング

用いた生薬のうち、オウゴン、カンゾウ、ケイヒ、センキュウ、ウイキョウ、オウレン、オンジの熱水抽出物、またはオウゴン、カンゾウ、ケイヒ、サイシン、ジオウ、センキュウ、

ポウフウ、リュウタン、オウギ、カッコン、カンキョウ、ケイガイ、ゲンチアナ末、ゴミシ、サイコ、サンシン、サンショウ、サンズコン、サンソウニン、シャクヤク、ソウジュツのメタノール抽出物に口腔がん細胞浸潤阻害効果がみられた。なかでもオンジの阻害効果の高さが際立っていた。

(3) トランスクリプトーム解析

三次元培養がん浸潤モデルを用いて浸潤開始時と浸潤期とで、遺伝子発現プロファイルと比較した heatmap を示す。左側 5 列は浸潤開始期、右側 5 列は浸潤期を示す。



浸潤期に特徴的に高発現していたのは、型コラーゲン $\alpha 1$ 、型コラーゲン $\alpha 2$ 、ペリオスチン、パーシカンなどの細胞外マトリックスがメインで、これらの遺伝子発現を制御することが口腔がん細胞浸潤阻害薬のターゲットとなることが示された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 8 件)

Ohshima M, Yamaguchi Y, Ambe K, Horie M, Saito A, Nagase T, Nakashima K, Ohki H, Kawai T, Abiko Y, Micke P, Kappert K, Fibroblast VEGF-receptor 1 expression as molecular target in periodontitis, J Clin Periodontol, 査読有、43 巻、2016、128-137
doi: 10.1111/jcpe.12495

Horie M, Saito A, Yamaguchi Y, Ohshima M, Nagase T, Three-dimensional Co-culture model for tumor-stromal interaction, J Vis Exp, 査読有、2015、doi: 10.3791/52469

Horie M, Saito A¹, Noguchi S, Yamaguchi Y, Ohshima M, Morishita Y, Suzuki HI, Kohyama T, Nagase T, Differential knockdown of TGF- β ligands in a three-dimensional co-culture tumor-

stromal interaction model of lung cancer, BMC Cancer, 査読有、14 巻、2014、580
doi: 10.1186/1471-2407-14-580

Sawada T, Yamazaki T, Shibayama K, Yamaguchi Y, Ohshima M, Ultrastructural immunolocalization of laminin 332 (laminin 5) at dento-gingival interface in *Macaca fuscata* monkey, Med Mol Morphol, 査読有、48 巻、2015、104-111
doi: 10.1007/s00795-014-0085-9

FANTOM Consortium and the RIKEN PMI and CLST (DGT), Forrest AR, Kawaji H, Rehli M, Baillie JK, de Hoon MJ, Haberle V, Lassmann T, Kulakovskiy IV, Lizio M, Itoh M, Andersson R, Mungall CJ, Meehan TF, Schmeier S, Bertin N, Jørgensen M, Dimont E, Arner E, Schmidl C, Schaefer U, Medvedeva YA, Plessy C, Vitezic M, Severin J, Semple C, Ishizu Y, Young RS, Francescato M, Alam I, Albanese D, Altschuler GM, Arakawa T, Archer JA, Arner P, Babina M, Rennie S, Balwierc PJ, Beckhouse AG, Pradhan-Bhatt S, Blake JA, Blumenthal A, Bodega B, Bonetti A, Briggs J, Brombacher F, Burroughs AM, Califano A, Cannistraci CV, Carbajo D, Chen Y, Chierici M, Ciani Y, Clevers HC, Dalla E, Davis CA, Detmar M, Diehl AD, Dohi T, Drabløs F, Edge AS, Edinger M, Ekwall K, Endoh M, Enomoto H, Fagiolini M, Fairbairn L, Fang H, Farach-Carson MC, Faulkner GJ, Favorov AV, Fisher ME, Frith MC, Fujita R, Fukuda S, Furlanello C, Furino M, Furusawa J, Geijtenbeek TB, Gibson AP, Gingeras T, Goldowitz D, Gough J, Guhl S, Guler R, Gustinich S, Ha TJ, Hamaguchi M, Hara M, Harbers M, Harshbarger J, Hasegawa A, Hasegawa Y, Hashimoto T, Herlyn M, Hitchens KJ, Ho Sui SJ, Hofmann OM, Hoof I, Hori F, Huminiecki L, Iida K, Ikawa T, Jankovic BR, Jia H, Joshi A, Jurman G, Kaczowski B, Kai C, Kaida K, Kaiho A, Kajiyama K, Kanamori-Katayama M, Kasianov AS, Kasukawa T, Katayama S, Kato S, Kawaguchi S, Kawamoto H, Kawamura YI, Kawashima T, Kempfle JS, Kenna TJ, Kere J, Khachigian LM, Kitamura T, Klinken SP, Knox AJ, Kojima M, Kojima S, Kondo N, Koseki H, Koyasu S, Krampitz S, Kubosaki A, Kwon AT, Laros JF, Lee W, Lennartsson A, Li K, Lilje B, Lipovich L, Mackay-Sim A, Manabe R, Mar JC, Marchand B, Mathelier A, Mejhert N, Meynert A, Mizuno Y, de Lima Morais DA, Morikawa H, Morimoto M, Moro K, Motakis E, Motohashi H, Mummery CL, Murata M, Nagao-Sato S, Nakachi Y, Nakahara F, Nakamura T, Nakamura Y,

Nakazato K, van Nimwegen E, Ninomiya N, Nishiyori H, Noma S, Noma S, Noazaki T, Ogishima S, Ohkura N, Ohimiya H, Ohno H, Ohshima M, Okada-Hatakeyama M, Okazaki Y, Orlando V, Ovchinnikov DA, Pain A, Passier R, Patrikakis M, Persson H, Piazza S, Prendergast JG, Rackham OJ, Ramilowski JA, Rashid M, Ravasi T, Rizzo P, Roncador M, Roy S, Rye MB, Saijyo E, Sajantila A, Saka A, Sakaguchi S, Sakai M, Sato H, Savvi S, Saxena A, Schneider C, Schultes EA, Schulze-Tanzil GG, Schwegmann A, Sengstag T, Sheng G, Shimoji H, Shimoni Y, Shin JW, Simon C, Sugiyama D, Sugiyama T, Suzuki M, Suzuki N, Swoboda RK, 't Hoen PA, Tagami M, Takahashi N, Takai J, Tanaka H, Tatsukawa H, Tatum Z, Thompson M, Toyodo H, Toyoda T, Valen E, van de Wetering M, van den Berg LM, Verado R, Vijayan D, Vorontsov IE, Wasserman WW, Watanabe S, Wells CA, Winteringham LN, Wolvetang E, Wood EJ, Yamaguchi Y, Yamamoto M, Yoneda M, Yonekura Y, Yoshida S, Zabierowski SE, Zhang PG, Zhao X, Zucchelli S, Summers KM, Suzuki H, Daub CO, Kawai J, Heutink P, Hide W, Freeman TC, Lenhard B, Bajic VB, Taylor MS, Makeev VJ, Sandelin A, Hume DA, Carninci P, Hayashizaki Y, A promoter-level mammalian expression atlas, Nature, 査読有、507 巻、2014、462-70
doi: 10.1038/nature13182

大島光宏、山口洋子、新しい歯周炎の見方と多因子性疾患発祥の BINGO モデル仮説 (総説) 医薬品相互作用研究、査読有、38 巻、2014、82-88

Sawada T, Yamazaki T, Shibayama K, Kumazawa K, Yamaguchi Y, Ohshima M, Expression and localization of laminin 5, laminin 10, type IV collagen, and amelotin in adult murine gingiva, J Mol Histol, 査読有、45 巻、2014、293-302,
doi: 10.1007/s10735-013-9559-7

大島光宏、山口洋子、歯周炎薬物治療のパラダイムシフト (総説) 日本薬理学会誌、141 巻、査読有、2013、314-320

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 山口洋子、石井輝彦、大木秀郎、堀江真史、大島光宏、Micke Patrick、口腔がん浸潤に關与する遺伝子発現プロファイルの検討、BMB2015、神戸国際会議場 (兵庫県神戸市) 2015.12.03
2. Masafumi Horie, Yoko Yamaguchi, Akira Saito, Takahide Nagase, Masayoshi Itoh, Hideya Kawaji, Timo Lassmann, Piero Carninci, Yoshihide

Hayashizaki, Alistair Forrest, The FANTOM consortium, Marina Lizio, Masahiro Kondo, Tatsuo Suzutani, Patrick Micke, Mitsuhiro Ohshima, CAGE revealed novel biomarker of periodontitis-associated fibroblasts, IMGC 2015、横浜市開港記念会館(神奈川県横浜市) 2015.11.8-11

3. 山口洋子、福村基徳、石井輝彦、大木秀郎、鳥居塚和生、大島光宏、癌浸潤モデルを用いた浸潤阻害剤の検討、第87回日本生化学会大会、京都国際会議場(京都府京都市) 2014.10.17

〔図書〕(計 1 件)

1. 山口洋子、大島光宏、佐久間淳、(株)技術情報協会、「最新 動物細胞培養の手法と細胞死・増殖不良・細胞変異を防止する技術」第1版 菅原隆編、第2章 第6節 培養のシミュレーション・評価技術 {6}細胞培養と培養組織の柔らかさの測定評価例、2014、315-321

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

山口 洋子 (YAMAGUCHI, Yoko)
日本大学・歯学部・助教
研究者番号：00239922

(2)研究分担者

大島 光宏 (OHSHIMA, Mitsuhiro)
奥羽大学・薬学部・教授
研究者番号：30194145

(3)連携研究者

鳥居塚 和生 (TORIZUKA, Kazuo)
昭和大学・薬学部・教授
研究者番号：60135035