

論文内容要旨

活性型 VD_3 誘導体エルデカルシトールの
口腔扁平上皮癌に対する抗腫瘍効果に関する研究

主指導教員：岡本 哲治教授

(応用生命科学部門分子口腔医学・顎顔面外科学)

副指導教員：兼松 隆教授

(基礎生命科学部門細胞分子薬理学)

副指導教員：虎谷 茂昭准教授

(応用生命科学部門分子口腔医学・顎顔面外科学)

鷹津 冬良

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

論文内容要旨

論文題目 活性型 VD_3 誘導体エルデカルシトールの口腔扁平上皮癌に対する抗腫瘍効果に関する研究

学位申請者 鷹津 冬良

【背景と目的】

HBp17/FGFBP-1 (heparin binding protein17/fibroblast growth factor binding protein-1) は、外陰部扁平上皮癌細胞株 A431 細胞の培養上清より分離精製された 17kDa の分泌タンパクであり、扁平上皮細胞で特異的に発現され、FGF-1, -2 と可逆的に結合し、FGFs のスイッチ分子として標的細胞での FGFs の安定性・遊離・活性化に深く関与していると考えられている。さらに、HBp17/FGFBP-1 は、口腔扁平上皮癌(OSCC) で高発現され、OSCC の増殖や血管新生に密接に関与していることが報告されている。

活性型ビタミン $\text{D}_3(1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 、以下、活性型 VD_3) は骨代謝において重要な働きをするとともに、心臓病や癌の予防効果も報告されている。また、活性型 VD_3 は、NF- κB シグナル伝達経路を抑制することにより、上皮細胞の増殖を制御していることが知られている。著者の研究室の先行研究で、活性型 VD_3 が NF- κB シグナル伝達経路を介し、OSCC における HBp17/FGFBP-1 の発現を抑制することが明らかにされている。

本研究では、OSCC 細胞に対する活性型 VD_3 類似化合物 ED-71(中外製薬から供与)の、*in vitro* および *in vivo* における抗腫瘍効果を検討することを目的とした。

【材料と方法】

腫瘍細胞として、OSCC 由来細胞株 Ho-1-u-1(UE), Ho-1-n-1(NA)および A431 細胞を用いた。すべての細胞培養は DMEM と Ham-F12 培地を 1:1 の比率で混合した DF 基礎栄養培地に、insulin (10 $\mu\text{g/ml}$), transferrin (5 $\mu\text{g/ml}$), 2-mercaptoethanol (10 μM), 2-aminoethanol (10 μM), sodium selenite (10nM), oleic acid (4.7 $\mu\text{g/ml}$: 500 $\mu\text{g/ml}$ の fatty acid-free bovine serum albumin と結合)の 6 因子を加えた無血清培地 DF6F を用いた。ED-71 の各細胞の増殖に及ぼす影響を検討するため、各細胞を 24 穴プレートに 10⁴/ml/well の細胞密度で播種し、同時に ED-71 (0-40nM)および活性型 VD_3 (0-40nM)を添加し 6 日間培養後、コールターカウンターにて細胞数を測定した。種々の濃度の ED-71 及び活性型 VD_3 で細胞を処理後、経時的に蛋白及び RNA を抽出し、HBp17/FGFBP-1 遺伝子・蛋白の発現を定量 PCR 法 (qPCR) およびウエスタンブロット法 (WB) にて検討し、HBp17/FGFBP-1 発現に及ぼす ED-71 及び VD_3 の濃度依存的及び経時的影響を検討した。さらに、HBp17/FGFBP-1 遺伝子プロモーター配列をルシフェラーゼ遺伝子上流に組み込み、NA 及び A431 細胞に遺伝子導入後、ED-71 によるレポーター活性について検討した。また、UE、NA 及び A431 細胞に ED-71 (0.4nM)を添加し、12 時間後に RNA 及び蛋白を抽出し、HBp17/FGFBP-1、FGF-2、ビタミン D_3 レセプター (VDR) 及び NF- κB 関連分子群 (IkB α , p65, p50) の遺伝子・蛋白発現を qPCR 及び WB にて検討した。さらに、NA 細胞に VDRi を遺伝子導入し VDR 発現を抑制した NA

細胞を用いて、ED-71 の HBp17/FGFBP-1 発現に及ぼす影響を検討した。対照として scramble siRNA 導入細胞を用いた。

ヌードマウス移植腫瘍を用いて、*in vivo* での ED-71 の抗腫瘍効果を検討した。1 X10⁶ の A431 細胞を BALB/c nu/nu、8 週齢の雄性マウスの背部皮下に移植し、対照群 (0.5% Tween80/MQ)、ED-71-1 (0.1μg/kg) 群、ED-71-2 (0.5μg/kg) 群の 3 群 (各群 5 匹) に、移植初日より 4 日毎に *gavage needle* を用いて ED-71 を経口投与した。4 日おきに腫瘍の長径と短径を計測し、腫瘍体積=(短径)²×(長径)×1/2 の計算式で腫瘍体積を算定し、移植 28 日後に腫瘍組織を摘出し種々の検討を行った。

【結果】

活性型 VD₃ 及び ED-71 は、DF6F を用いた無血清培養系で、濃度依存的に NA、UE 及び A431 細胞の増殖を抑制した。ED-71 の IC₅₀ は活性型 VD₃ の約 1/100 であった。UE、NA 及び A431 細胞における HBp17/FGFBP-1 遺伝子の発現は ED-71 濃度依存的に抑制され、経時的には ED-71 処理 12 時間後に最も強く抑制された。レポーターアッセイにおいて、HBp17/FGFBP-1 遺伝子プロモーター配列を遺伝子導入した NA 細胞と A431 細胞では、ED-71 によりレポーター活性が約 50%低下した。また、FGF-2、VDR、p65 及び p50 の発現は、ED-71 により影響を受けなかったが、IκBα の発現は有意に増大した。一方、siVDR 導入細胞では、ED-71 による IκBα 遺伝子の発現誘導及び HBp17/FGFBP-1 遺伝子の発現抑制は認められなかった。

ヌードマウス移植 A431 細胞由来腫瘍の増殖は、ED-71-2 (0.5μg/kg) 群で有意に抑制された。また、同群では HBp17/FGFBP-1 及び FGF-2 遺伝子・蛋白の発現は低下し、さらに、CD31 陽性血管密度及び Ki67 陽性増殖細胞数も有意に低下した。

【結論】

本研究結果より、ED-71 は口腔扁平上皮癌に対し、HBp17/FGFBP-1 の発現抑制を介して *in vitro* 及び *in vivo* において直接腫瘍増殖を抑制するとともに、*in vivo* においては、直接抑制効果に加えて血管新生を抑制することで腫瘍増殖を抑制することが明らかとなり、ED-71 を用いた新たな口腔扁平上皮癌治療の可能性が示唆された。