

令和元年6月20日現在

機関番号：12301
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2016～2018
 課題番号：16K20558
 研究課題名(和文) COX-2,ケモカインシステムを標的にした口腔癌リンパ節後発転移に対する治療戦略

 研究課題名(英文) Treatment strategy for occult cervical lymph node metastasis of oral cancer targeting for COX-2 and chemokine system in oral cancer

 研究代表者
 小川 将(Ogawa, Masaru)

 群馬大学・医学部附属病院・助教

 研究者番号：70622041
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：COX-2は、頸部リンパ節後発転移症例、高悪性型(浸潤様式、INF-C)に有意に高発現を認め、舌癌における後発リンパ節転移予測因子および悪性度の指標となり得る可能性が示唆された。PGESはCOX-2と同様に舌扁平上皮癌細胞に高発現を認め、COX-2発現と有意な相関が認められた。臨床病理学的因子との関連性の検討では、COX-2と同様に頸部リンパ節後発転移の症例で有意に高発現を認め、舌扁平上皮癌の進展(特に頸部リンパ節転移において)へのCOX系代謝の連関が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

COX-2は、頸部リンパ節後発転移症例、高悪性型(浸潤様式、INF-C)に有意に高発現を認め、舌癌における後発リンパ節転移予測因子および悪性度の指標となり得る可能性が示唆された。PGESはCOX-2と同様に舌扁平上皮癌細胞に高発現を認め、COX-2発現と有意な相関が認められた。臨床病理学的因子との関連性の検討では、COX-2と同様に頸部リンパ節後発転移の症例で有意に高発現を認め、舌扁平上皮癌頸部リンパ節転移においてCOX系代謝の連関が示唆された。COX-2 選択的阻害薬がその副作用の面で問題が生じたことから、PGESやEP2R,EP4Rが新たな治療の標的となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Our aim was to examine the expression of COX-2, prostaglandin E synthase (PGES) and its receptors (EP1-4). Expression of COX-2, PGES, and its receptors was evaluated by immunohistochemistry in oral squamous cell carcinoma from 28 patients. COX-2 expression was recognized in the squamous cell carcinoma tissue in all patients. Delayed cervical lymph node metastasis in COX-2(+) group demonstrated a significantly high percentage compared to COX-2(-) group. Among 16 patients with recognized high expression of COX-2, in 12 patients high expression of PGES was recognized. Similarly to COX-2, delayed cervical lymph node metastasis in PGES(+) group demonstrated a significantly high percentage compared to PGES(-) group. A comparison of expression of EP receptor in normal periglottis specimen with that in tongue cancer cells showed that significantly high expression was observed in EP2R and EP4R. In oral squamous cell carcinoma, PGES, EP2R or EP4R can be new therapeutic targets.

研究分野：外科系歯学

キーワード：口腔癌 舌癌 扁平上皮癌 COX-2 PGES

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

口腔癌において、症例の予後に最も影響を与えるのは、頸部リンパ節後発転移の有無である。そのため、口腔癌の治療成績向上のためには、従来の **TNM** 分類、**YK** 分類に加えて、臨床病理学的細胞機能に配慮した予後不良群つまり頸部リンパ節後発転移群の特定を行い、治療方針を立案することが必要である。本研究では、当院で治療した口腔扁平上皮癌症例に対して臨床病理学的検討を行い頸部リンパ節後発転移の予測因子を検討することを目的とする。

2. 研究の目的

COX-2 はアラキドン酸からプロスタグランジン合成への律速段階を調節する酵素である。1995年の **Giovanucci** らの疫学的研究で長期間のアスピリン服用によって大腸癌が **40~50%**減少すると報告されてから、これまで様々な癌腫で **COX-2** の発現誘導が確認されている。**(Giovanucci et al. N Engl J Med. 1995)** 腫瘍組織に誘導された **COX-2** は、アポトーシスを抑制し、血管新生を増強させ、腫瘍細胞に浸潤能を獲得させる。さらにプロスタグランジン **E2** を誘導し、免疫抑制を惹起することで癌の増殖、浸潤、転移に関与していると考えられている。

今回われわれは口腔扁平上皮癌について **COX-2** 代謝に加えその下流酵素および受容体と臨床病理所見および術後局所再発との関連性について検討を行ったのでその概要を報告する。

3. 研究の方法

1) 組織材料 (Patients and Materials)

2009年~2012年の4年間に当科を初診した305例中舌癌 **N0** 症例27例及び下顎歯肉癌 **N0** 症例1例の計28例の切除標本のホルマリン固定切片を用いた。部位は舌：27例、下顎歯肉：1例であった。また、対象として切除標本内で病理組織学的に上皮異形成を認めない部位を正常部位として同様に検討した。

2) 抗体および免疫染色

抗体は **COX-2** ポリクローナル抗体 (**Cayman**)、**mPGES-1** ポリクローナル抗体 (**Cayman**)、さらに受容体の検討として **PGE 2** 受容体 (**EP1, EP2, EP3, EP4** ポリクローナル抗体 (**Cayman**)) を用いた。また、**COX-2** により発現が誘導される **VEGF** の発現についても抗 **VEGF** 抗体を用いて検討した。

3) 染色判定

抗原の発現の判定は癌細胞の染色の有無によって判定した。400倍視野で腫瘍細胞の陽性率を3視野で測定し、陽性率が10%以上の症例を陽性とした。

4) 臨床病理学的因子との関連性

年齢、性別、原発腫瘍の大きさ (**pT**)、頸部リンパ節後発転移の有無、分化度、浸潤様式を臨床病理学的因子として **COX-2** およびその下流酵素、受容体の発現との関連性について検討した。浸潤様式 (**INF**) は胃癌取扱い規約 **8)** に準じて、扁平上皮癌の先進部における最も優勢な浸潤増殖像が、膨張性で周囲組織との間に一線が画されるものを **INF-a**、浸潤性で周囲組織との境界が不明瞭なものを **INF-c**、両者の中間を **INF-b** と3つに分類した。

5) 原発巣完全切除後の局所再発との関連性

対象症例の中で原発巣完全切除後 (臨床的に **10mm** 以上の安全域を有している症例) に局所再発を認めた症例4例 (舌癌：3例、下顎歯肉癌：1例) についても **COX-2** およびその下流酵素、受容体の発現について検討した。

6) 統計学的処理

結果の統計学的処理には **Student's T-test**, **Kruskal-Wallis** 検定により検討を行い、**P < 0.05** を有意と判定した。

4. 研究成果

《結果》

1) 正常部と扁平上皮癌での **COX-2** 発現

正常舌粘膜検体では、**COX-2** の発現はごくわずかであり、5検体中4検体で陰性であった。舌扁平上皮癌組織は全症例で **COX-2** の発現が認められた。癌細胞だけではなく、癌周囲の異型上皮細胞にも **COX-2** の発現が認められた。

2) **COX-2** 発現と臨床病理学的因子との関連性

頸部リンパ節後発転移は **COX-2 (+)** 群では **COX-2 (-)** 群に比較して有意に高率であった。浸潤様式についても浸潤性増殖傾向が高くなるほど **COX-2 (+)** の割合が有意に高率となった。 **VEGF** 発現においても **COX-2 (+)** 群では **COX-2 (-)** 群に比較して高発現の割合が有意に高率であった。分化度に関しては高分化型に比較して低分化型の方が **COX-2 (+)** の割合が高かったが、有意差は認められなかった。

3) 正常部と扁平上皮癌での **m-PGES** 発現

正常舌粘膜検体では **PGES** の発現は認められなかった。 **COX-2** 高発現が認められた症例16例中12例に **PGES** の高発現が認められた。 **COX-2** と同様に癌細胞の細胞質に **PGES** の発現が認められた。

4) **PGES** 発現と臨床病理学的因子との関連性

COX-2 と同様に頸部リンパ節後発転移、**VEGF** 発現は **PGES (+)** 群が **PGES (-)** 群に比較して

有意に高率であった。また、COX-2 (+) 群の 16 例中 12 例が PGES (+) であり、有意差が認められた。浸潤様式に関しては有意差が認められなかった。

5) EP レセプターの発現

正常舌粘膜検体と舌癌細胞とで発現を比較したところ、EP2R と EP4R に有意に高い発現が認められ、EP2R (+) 群および EP4R (+) 群はいずれも EP2R (-) 群、EP4R (-) 群に比較して頸部リンパ節後発転移症例の割合が有意に高かった。

6) 原発巣完全切除後に局所再発を認めた症例における COX-2 および PGES、PGES 受容体の発現

4 症例は、全例で COX-2、PGES の高発現が認められた。PGES 受容体についても、EP1~4 全てで高発現が認められた。

《考察》

近年、COX-2 のヒト大腸における発癌との関連性が明らかになり、次いで胃癌、肺癌、のほかに乳癌、食道癌、子宮頸部癌、膀胱癌、前立腺癌においても、蛋白あるいは遺伝子レベルでの過剰発現および増幅が報告されている。症例数はまだ少ないが、頭頸部癌においても COX-2 の過剰発現が報告されており、今回の検討でも主に舌扁平上皮癌細胞において COX-2 の過剰発現が確認され、癌の成長、発育に關与している可能性が示唆された。

Kune らは、アスピリンの投与を受けている患者の大腸癌の発生頻度が低下することを報告した。また、Waddel らは家族性大腸ポリポーシスの患者に NSAIDs を投与したところポリープの退縮が認められたとしている。さらに、2003 年にはアスピリンが大腸腺腫の発生を抑制することが randomized trial で証明された。これらの知見をもとに COX-2 を阻害することで抗腫瘍効果を発揮することが推測された。そこで、癌予防薬としての COX-2 阻害薬の応用が期待されたが、COX-2 阻害薬である rofecoxib、celecoxib を大腸腺腫の既往のある患者に予防的に投与したところ心筋梗塞や脳梗塞などの心血管障害のリスクが有意に高くなることが報告され抗悪性腫瘍薬としての長期投与は断念された。癌予防効果を保ちつつ心血管系障害の発症リスクを軽減させるにはアラキドン代謝の下流酵素 (PGES) やその受容体 (EP1~4) を選択的に阻害することが理想的と考えられた。

mPGES-1 は 2001 年に非小細胞肺癌で過剰発現が初めて報告された。その後胃癌、大腸癌、乳癌、頭頸部癌でも同様の報告がなされたが報告数はまだ少ない。今回のわれわれの検討でも、COX-2 と同様に扁平上皮癌細胞の細胞質に PGES の発現が認められ、頸部リンパ節後発転移と有意な相関を認めた。これらの結果より PGES が口腔扁平上皮癌の頸部リンパ節後発転移の制御の観点で新たな治療標的になり得る可能性が示唆された。

PGE₂ はアラキドン酸カスケードにより生成された PGH₂ が、microsomal PGE₂ synthesis (mPGES-1, -2)、cytoplasmic PGES (cPGES) などを経て COX-2 依存性に産生される。その生物活性は膜受容体である 4 種類 E P レセプターに結合されることで発揮される。Fig.1 に示すように、結合するレセプターごとに発揮される作用が異なる (Fig.1)。これまでに各癌腫と E P レセプターの関連が検討されているが、その発現は癌腫により様々である。われわれの検討で、各 EP レセプターの発現を正常舌粘膜細胞と舌扁平上皮癌細胞とで比較したところ、EP2R と EP4R は舌扁平上皮癌細胞で有意に高い発現が認められた。さらに、統計解析では、COX-2 および PGES と同様に頸部リンパ節後発転移との関連性が認められた。つまり、舌扁平上皮癌では、特に頸部リンパ節後発転移において EP2R、EP4R を介した作用が關与している可能性が示唆された。

原発巣完全切除後に局所再発を認めた症例は、いずれも浸潤様式が INF-C の高悪性型の病変であった。COX 系代謝との関連を検討したところ、COX-2、PGES、4 種の PGES 受容体の全てが高発現を認め、COX-2 系の代謝が原発巣完全切除後の局所再発に強く關与している可能性が示唆された。今後さらに検討を行い、頸部リンパ節後発転移のみではなく、高悪性型病変の局所制御においても、COX-2 およびその下流酵素、受容体が治療の有用な標的となる可能性が示唆された。

《結語》

口腔扁平上皮癌において、COX-2 と PGES およびその受容体である EP2R、EP4R の発現が認められた。COX-2 選択的阻害薬がその副作用の面で問題が生じたことから、PGES や EP2R、EP4R が新たな治療の標的となる可能性があり、今後は mRNA レベルでの検討を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. Ogawa M, Osumi M, Yamaguchi T, Yokoo S. Improvement of treatment results of extensive radicular cysts with endodontic microsurgery. *Int J Microdent.* 2016 ; 7:76-85. (査読無)
2. 小川 将, 横尾 聡, 高山 優, 牧口 貴哉, 栗原 淳, 清水 崇寛. セツキシマブの初回投与時に IgE 介在型反応によるアナフィラキシーショックを発症した 1 例. *日口外* **64**: 285-290, 2018. (査読有)

3. 小川 将, 横尾 聡, 高山 優, 牧口 貴哉, 栗原 淳, 清水 崇寛. 手術非適応口腔扁平上皮癌頸部リンパ節再発に対する conversion therapy としてセツキシマブ併用放射線療法を施行した 1 例. 頭頸部癌 44: 316-320, 2018. (査読有)

[学会発表](計 12 件)

1. 第 33 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会 [ワークショップ] 2015.1.29
小川 将, 菅原 圭, 清水崇寛, 小坂橋敦, 高山 優, 牧口貴哉, 横尾 聡. 群馬大学口腔外科における LA-OSCC および R/M-OSCC に対する cetuximab 使用の現状と新たな適応.
2. 第 61 回 日本口腔外科学会総会・学術大会 [ミニレクチャー] 2016.11.25
小川 将, 横尾 聡. マイクロスコープを用いた歯根端切除術(広範囲に進展した歯根嚢胞への適用).
3. ICOMS 2017 2017.3.31-4.3
M. ogawa, T. Shimizu, A. Musha, S. Yokoo. IMPROVEMENT OF TREATMENT RESULTS OF EXTENSIVE RADICULAR CYSTS WITH ENDODONTIC MICROSURGERY.
4. 第 41 回 日本頭頸部癌学会 2017.6.8-9
小川 将, 池 嘉子, 清水崇寛, 関 麻衣, 横尾 聡. 上唇に生じた mammary analogue secretory carcinoma の 1 例 [示説]
5. 第 51 回 NPO 法人日本口腔科学会関東地方部会 2017.9.30
小川 将, 清水崇寛, 高山 優, 牧口貴哉, 横尾 聡. 口腔頸部領域に生じた壊死性筋膜炎の診断における LRINEC-OC score の開発と有用性の検討 [口演]
6. 第 62 回 日本口腔外科学会総会・学術大会 2017.10.20
小川 将, 清水崇寛, 高山 優, 栗原 淳, 牧口貴哉, 横尾 聡. 群馬大学口腔外科における LA-OSCC および R/M-OSCC に対する cetuximab の使用の現状 [示説]
7. 第 204 回(公社)日本口腔外科学会 関東支部学術集会 2017.12.16
小川 将, 池 嘉子, 清水崇寛, 関 麻衣, 横尾 聡. 上唇に生じた mammary analogue secretory carcinoma の 1 例 [口演]
8. 第 36 回 日本口腔腫瘍学会総会・学術大会 2018.1.25-26
小川 将, 池 嘉子, 清水崇寛, 関 麻衣, 横尾 聡. 上唇に生じた mammary analogue secretory carcinoma の 1 例 [示説]
9. 第 72 回 日本口腔科学会 学術集会 2018.5.11
小川 将, 山口高広, 大隅麻貴子, 鈴木啓佑, 横尾 聡. 広範囲(3 歯以上)に進展した歯根嚢胞摘出後の骨性治癒に影響を及ぼす因子の検討 [示説]
10. 第 72 回 日本口腔科学会 学術集会 2018.5.11
小川 将, 清水崇寛, 高山 優, 牧口貴哉, 横尾 聡. 口腔頸部領域に生じた壊死性筋膜炎の診断における LRINEC-OC score の開発と有用性の検討 [示説]
11. 第 15 回 顕微鏡歯科学会 学術大会・総会 2018.4.22
小川 将, 横尾 聡. 群馬大学口腔外科におけるマイクロスコープの導入と活用 [シンポジウム]
12. 第 63 回 日本口腔外科学会総会・学術大会 2018.11.4
小川 将, 横尾 聡. 広範囲(3 歯以上)に進展した歯根嚢胞に対する顕微鏡視下歯根

端切除の応用 [シンポジウム]

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。