

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 25 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592556

研究課題名（和文）抗アポトーシス蛋白と NF- κ B を分子標的とした口腔癌の新規治療法の開発研究課題名（英文） Development of new oral cancer treatment as molecular target for antiapoptosis protein and NF- κ B

研究代表者

玉谷 哲也 (TAMATANI TETSUYA)

徳島大学・病院・講師

研究者番号：30274236

研究成果の概要（和文）：本研究では NF- κ B と抗アポトーシス分子の抑制に着目し、複合的分子標的治療法を確立することを目的とした。正常ヒト口腔粘膜上皮と口腔癌細胞の抗アポトーシス分子の発現を比較した結果、正常細胞に比較し、癌細胞ではその発現は増強していた。85 症例の口腔扁平上皮癌を対象に抗アポトーシス分子である XIAP の免疫組織染色を行った結果、86%が陽性であった。一方、正常口腔粘膜には発現を認めなかった。XIAP の発現と腫瘍の大きさ、癌の分化度、浸潤様式、リンパ節転移の有無、3 年生存率と関連性があるか比較検討を行った。その結果、XIAP の発現と癌の分化度とは関連性を認め、症例数が少なかつたため、有意差は認められなかったが、XIAP が発現すると T1 と T2 症例の 3 年生存率が低下する傾向にあった。すなわち、抗アポトーシス分子である XIAP が口腔癌の治療の標的遺伝子になる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）： XIAP is a member of the inhibitor of apoptosis protein family, which is associated with cell survival by blocking caspase-mediated apoptosis. XIAP is expressed in various malignant tumors. The overexpression of XIAP has been reported to be a poorer prognostic factor in various malignancies. present study were to evaluate the expression of XIAP protein in oral squamous cell carcinoma (OSCC) and to elucidate the relationships among the XIAP expression, clinical stages, histological differentiation and classification of invasion mode. human OSCC cell lines were used in this study. Normal gingival epithelial cells served as control. XIAP, cIAPs and survivin expressions of cultured cells were detected by western blot. Tissue specimens were obtained from 85 patients with OSCC after surgery or biopsy. Their expression was detected by an immunohistochemical method. The expression of those proteins was detected in all cancer cells, but not in normal cells. Immunohistochemical analysis of 85 cases of OSCC showed that 73 (86%) cases expressed XIAP. There was no relationship between XIAP expression and clinical stages, or classification of invasion mode. There were significant differences between XIAP expression and histological differentiation. Most of non-staining and weakly staining of cancer was well differentiated. In contrast, intense and extensive staining was frequently found in poorly differentiated cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 2,100,000 | 630,000 | 2,730,000 |
| 2010年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 2011年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

研究分野：医歯薬

科研費の分科・細目：外科系歯学

キーワード：臨床腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

乳癌、大腸癌、前立腺癌、膵臓癌などの様々な悪性腫瘍において、転写因子である NF- κ B は恒常的に活性化している。口腔癌においても、上流の分子のリン酸化亢進によって NF- κ B 活性が著しく上昇していることを報告した(Cancer Lett, 171: 165-171, 2001)。さらに、口腔癌細胞株に変異型 I κ B α cDNA を導入して NF- κ B 活性を抑制すると、腫瘍増殖は抑制されることを報告した (Int J Cancer, 108: 912-921, 2004)。また、プロテアソーム阻害剤 bortezomib を用いて口腔癌細胞の NF- κ B を抑制すると、血管新生因子と腫瘍増殖因子の産生抑制と bortezomib の腫瘍細胞に対する直接の増殖抑制を介し、腫瘍増殖を抑制することを明らかにした (Am Associ Cancer Res Annu Meet Proc. 49: 98, 2008.)。口腔癌細胞では cellular inhibitor of apoptosis protein (cIAP) 1、2、X chromosome-linked inhibitor of apoptosis (XIAP)、livin, apollon などの抗アポトーシス分子(IAP)の発現が増強しており、それらの分子の発現はアポトーシスに抑制的に作用している。IAP の分子である cIAP1、XIAP、survivin は直接カスパーゼ活性を抑制し、強力にアポトーシスを阻害することから、cIAP1 と XIAP の発現を抑制すると、アポト

ーシスが強く誘導される。さらに、cIAP1 と XIAP は癌組織において高発現すると、抗癌剤や放射線の抗腫瘍効果は低下し、逆に cIAP1 と XIAP の発現を抑制すると、抗癌剤や放射線に対する感受性は増強することが知られている(Blood, 109: 3982-3988)。

また、悪性リンパ腫細胞で XIAP を抑制すると bortezomib に対する抵抗性が解除されたこと(Blood, 109: 3982-3988)が報告されている。好都合なことに survivin, cIAP1 あるいは XIAP 遺伝子のノックアウトマウスでは目立った異常を認めず (Mol Cell Bio, 21: 3604-3608, 2001)、癌細胞の cIAP1 と XIAP, survivin を特異的に標的とできることから、cIAP1 と XIAP は癌治療の重要な分子標的になりえると考えられる。すなわち、bortezomib と cIAP1, XIAP, survivin 阻害剤を併用すると、強い抗腫瘍効果が得られことが予測される。

2. 研究の目的

口腔癌細胞では、転写因子 NF- κ B が恒常的に活性化しており、放射線照射や抗癌剤治療によってその活性はさらに上昇していることを明らかにした。さらに、申請者らはプロテアソーム阻害剤である bortezomib を用いて NF- κ B を抑制すると、抗腫瘍効果が得られることを示し、NF- κ B が口腔癌治療の分

子標的の一つになりえることを明らかにした。しかし、bortezomib は腫瘍増殖を完全に抑制することはできなかった。この原因は bortezomib が腫瘍増殖因子と血管新生因子の産生を強く抑制するが、アポトーシスには影響を及ぼさないことに起因していた。そこで、bortezomib の抗腫瘍効果をさらに増強するためには、アポトーシスを誘導させることが重要であると考えている。そこで、申請者らは主要な抗アポトーシス分子である cIAP1 と XIAP, survivin に着目した。口腔癌におけるそれらの分子の発現は亢進しているが、bortezomib はその発現を抑制しなかった。すなわち、申請者は bortezomib の投与とともに口腔癌の cIAP1 と XIAP の発現を抑制すると、抗腫瘍効果が増強すると考えている。したがって、本研究では NF- κ B と抗アポトーシス分子の抑制に着目し、複合的分子標的治療法を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

①抗アポトーシス分子の発現の検討

本研究には当教室において樹立した培養ヒト口腔扁平上皮癌細胞である BHY、B88、HNt 細胞と CAL27 細胞(ATCC より購入)を用いる。培養口腔癌細胞と正常口腔上皮細胞を用いて cIAP1 と XIAP の発現を検討する。

②癌細胞の cIAP1 と XIAP の発現の解析

癌細胞の cIAP1 と XIAP 蛋白と mRNA の発現をそれぞれ western blot 法と RT-PCR 法を用いて解析する。培養癌細胞あるいはヌードマウス背部皮下に移植した癌細胞に bortezomib 投与あるいは放射線照射を行い、癌細胞あるいは癌組織より蛋白と RNA の抽出を行い、western blot 法と定量的 real-time RT-PCR 法を行う。得られたデータは tubulin 蛋白あるいは内因性コントロールである GAPDH mRNA を用いて標準化し、比較検討する。RNA の抽出は TRIzol を用いて行い、total RNA を回収した後、cDNA を合成する。real-time RT-PCR 法は ABI PRISM[®] 7000 sequence detection system (Applied

Biosystems) を使用して解析する。蛋白レベルでの発現は、抗ヒト cIAP1 と XIAP 抗体を用いて western blot 法を用いて解析する。

③ siRNA による培養癌細胞の cIAP1、XIAP の発現抑制と bortezomib あるいは放射線照射との併用効果の解析

癌細胞を bortezomib で処理すると、NF- κ B 活性は濃度依存的に抑制され、腫瘍増殖が抑制されることを明らかにした。癌細胞の cIAP1 と XIAP の発現は siRNA (Clin Cancer Res, 9: 2826-2836, 2008, Breast cancer Res Treat, 96: 267-277, 2005) を用いて抑制し、細胞増殖は MTT assay で評価する。さらに、bortezomib (5 nM) 処理と siRNA による cIAP1 と XIAP の発現抑制を併用し、相乗的に細胞増殖が抑制されるか解析する。さらに、放射線照射 (5 Gy) を組み合わせることで細胞増殖に及ぼす影響を検討する。MTT assay による生細胞数は Microplate reader Model 550 (Bio RAD) を用いて 540 nm の吸光度で測定する。

④ヌードマウスに移植した腫瘍増殖に対する cIAP1、XIAP の抑制と bortezomib との併用効果の検討

癌細胞株をヌードマウス背部皮下に移植し、腫瘍増殖に対する cIAP1 あるいは XIAP の抑制効果と bortezomib との併用効果を検討する。担癌ヌードマウスの腫瘍径が約 5 mm になった時点から bortezomib (0.15 mg/kg、0.3 mg/kg、2回/週、iv) 投与を 3 週間行い、移植後 6 週間後までの腫瘍体積の測定、リンパ節転移の有無、生存期間の比較検討を行う。その結果より、bortezomib と cIAP1 あるいは XIAP の抑制効果について相乗的な効果が確認されるか検討する。

⑤ヒト口腔癌組織における cIAP1 と XIAP 蛋白の発現と局在の検討

生検時あるいは手術により採取した癌組織の cIAP1 と XIAP 蛋白の発現は、抗ヒト cIAP1 と XIAP 抗体 (R and D systems) を用いて免疫組織化学染色法を行い、陽性細胞数を測定する。それぞれの蛋白の発現率と患者の 5 年生存率、累積生存率、転移の頻度、腫瘍の浸潤度、抗癌剤との感受性とそれぞれ相

関があるか解析する。

4. 研究成果

(1) 正常ヒト口腔粘膜上皮と口腔癌細胞の cIAP1 と XIAP、survivin の発現を比較した結果、正常細胞に比較し、癌細胞ではその発現は増強していた。さらに、蛍光抗体法で cIAP1 と XIAP の発現と局在を検討した結果、抗癌剤（シスプラチン、ドセタキセル）、放射線で癌細胞を処理すると、それらの蛋白の発現が増強した。また、XIAP の発現の抑制しても腫瘍増殖には影響はなかった。

(2) 口腔癌細胞を bortezomib で処理すると、NF- κ B 活性は濃度依存的に抑制され、腫瘍増殖が抑制されることを明らかにした。さらに、ヌードマウス背部皮下に移植した口腔癌細胞に bortezomib 投与あるいは放射線照射を行い、腫瘍の経時的な大きさの測定と腫瘍組織から蛋白と RNA の抽出を行い、western blot 法と定量的 real-time RT-PCR 法で cIAP1 と XIAP の発現の発現を検討した。内因性コントロールである GAPDH mRNA を用いて標準化し、比較検討した結果、cIAP1 と XIAP の発現は bortezomib 投与によって軽度抑制され、放射線照射によって増強された。放射線照射によって増強された cIAP1 と XIAP の発現は、bortezomib 投与を併用すると、著明に抑制され、同時に腫瘍も有意に縮小した。

(3) 85症例の口腔扁平上皮癌を対象に抗アポトーシス分子である XIAP の免疫組織染色を行った結果、86%が陽性であった。一方、正常口腔粘膜には発現を認めなかった。XIAP の発現と腫瘍の大きさ、癌の分化度、浸潤様式、リンパ節転移の有無、3年生存率と関連性があるか比較検討を行った。その結果、XIAP の発現と癌の分化度とは関連性を認め、症例数が少なかつたため、有意差は認められなかったが、XIAP が発現すると T1 と T2 症例の 3 年生存率が低下する傾向にあった。すなわち、抗アポトーシス分子である XIAP が口腔癌の治療の標的遺伝子になる可能性が示唆された。一方、cIAP あるいは survivin の発現と口腔癌症例の臨床病理学因子には有意な関連性は認めら

れなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

①玉谷哲也、The expression of survivin in human oral squamous cell carcinoma and its relationship with clinical factors, AACR 102nd annual meeting, Orange county convention Center, 2011.4.2.(Orlando, USA)

②玉谷哲也、口腔扁平上皮癌における survivin の発現に関する検討、第47回口腔組織培養学会学術大会、2010. 11.13、高知城ホール (高知市)

③玉谷哲也、Increased anti-tumor effects of sequential docetaxel followed by 5-FU treatment against human oral cancer cells, 2010.4.20、AACR 101nd annual meeting (Washington D.C.USA)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

該当なし。

[その他]

ホームページ等

該当なし。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

玉谷 哲也 (TAMATANI TETSUYA)

徳島大学・病院・講師

研究者番号：30274236

(2) 研究分担者

宮本洋二 (MIYAMOTO YOUJI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス

研究部・教授

研究者番号：20200214

永井宏和 (NAGAI HIROKAZU)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス

研究部・准教授

研究者番号：50282190

内田大亮 (UCHIDA DAISUKE)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス

研究部・助教

研究者番号：20335798

茂木 勝美 (MOGI KATSUMI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・助教

研究者番号：20335805

(H21, H22 研究分担者→H23 連携研究
者)

(3)連携研究者

該当なし