

機関番号：16101  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2009～2010  
 課題番号：21792006  
 研究課題名（和文） survivinとNF- $\kappa$ Bを分子標的とする口腔癌の複合的治療法の開発  
 研究課題名（英文） Development of combined therapy of oral cancer of which molecular target survivin and NF- $\kappa$ B  
 研究代表者  
 高丸 菜都美（TAKAMARU NATSUMI）  
 徳島大学・病院・助教  
 研究者番号：40513031

## 研究成果の概要（和文）：

【結果】口腔扁平上皮癌患者におけるsurvivinの発現率は88%であった。survivinの局在は核と細胞質陽性型、核陰性・細胞質陽性型、核と細胞質陰性型の3群に分類できた。癌の分化度とsurvivinの発現との間には関連がなかったが、山本-小浜による浸潤様式分類とsurvivinの核での発現との間に相関関係を認めた。

【結論】口腔扁平上皮癌においてsurvivinの発現は増強し、その発現の程度は浸潤様式と関連性があることが示唆された。

## 研究成果の概要（英文）：

【Result】Rate of survivin expression in oral squamous cell carcinoma patients was 88%. localization of survivin is a positive-type nucleus and cytoplasm, cytoplasm negative nucleus-positive type and negative-type nucleus and the cytoplasm, was classified into three groups. Between the degree of differentiation and the expression of survivin in cancer was not associated, but showed a correlation between nuclear survivin expression in invasion style, Yamamoto-Kohama classification.

【Conclusion】Expression of survivin in oral squamous cell carcinoma and enhance its level of expression was suggested to be related to invasion style.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：口腔外科

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：survivin, NF- $\kappa$ B, 分子標的薬

## 1. 研究開始当初の背景

転写因子である NF- $\kappa$ B は炎症、発癌、細胞の生存、アポトーシス等広範な生命現象において重要な役割を果たしている。NF- $\kappa$ B が活性化すると、血管新生が亢進することによって、腫瘍増殖は促進する。口腔癌細胞では、NF- $\kappa$ B が恒常的に活性化しており (Cancer Lett, 171: 165-171, 2001)、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することを申請者らは報告した (Int J Cancer, 108: 912-921, 2004)。申請者は プロテアソーム阻害剤である bortezomib を用いて NF- $\kappa$ B を抑制すると、血管新生の抑制と 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 (図 1、図 2) (Am Assoc Cancer Res Annu Meet Proc. 49: 98, 2008.)。また、口腔癌細胞では、cellular inhibitor of apoptosis protein (cIAP) 1、cIAP2、Fas associated death-like interleukin 1 converting enzyme inhibitory protein (FLIP)、X chromosome-linked inhibitor of apoptosis (XIAP)、survivin 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。しかし、bortezomib の問題点は、口腔癌細胞のこれらの IAP の発現増強を抑制しないことである。そこで、bortezomib の抗腫瘍効果を増強するために、申請者は IAP に着目した。

## 2. 研究の目的

IAP の 1 つである survivin 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 survivin 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報告されている (Cancer Res, 65:

4881-4887, 2005)。また、survivin が高発現している癌患者では、5 年生存率が低下する事も知られている。

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 (図 3)、survivin の発現を抑制すると、アポトーシスが強く誘導される。好都合なことに、survivin は分化した正常細胞にはほとんど発現せず、癌細胞特異的に発現していることから、survivin 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 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。そこで、新たな口腔癌の治療法を確立するために、NF- $\kappa$ B と survivin を分子標的とした複合的な治療法を開発する発想に至ったものである。

## 3. 研究の方法

### (1) 口腔癌細胞の survivin の発現の解析

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) および正常ヒト粘膜上皮細胞を用いる。癌細胞と正常上皮細胞の survivin 蛋白と mRNA の発現をそれぞれ Western blot 法と real-time RT-PCR 法を用いて解析する。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<sup>®</sup> 7000 sequence detection system (Applied Biosystems) を使用して解析する。得られたデータ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。Western blot 法による survivin 蛋白の発現は tubulin 蛋白を用いて比較検討する。

### (2) ヒト口腔癌組織における survivin 蛋白の

## 発現と局在の検討

生検あるいは手術により採取した癌組織の survivin 蛋白の発現は、抗ヒト survivin 抗体 (Cell signaling technology) 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。また、口腔癌患者の血清中の survivin 抗体を ELISA 法で定量する。それぞれの蛋白の発現率、抗体量と癌の分化度、浸潤度、5年生存率、累積生存率、抗癌剤との感受性等の指標とそれぞれ相関があるか解析する。

### 4. 研究成果

当科において治療をおこなった口腔扁平上皮癌患者 57 例の初診時生検材料および手術材料を用い、抗 survivin 抗体で免疫組織化学染色を行なった。

口腔扁平上皮癌患者における survivin の発現率は 88% であった。survivin の局在は核と細胞質陽性型、核陰性・細胞質陽性型、核と細胞質陰性型の 3 群に分類できた。癌の分化度と survivin の発現との間には関連がなかったが、山本-小浜による浸潤様式分類と survivin の核での発現との間に相関関係を認めた。

口腔扁平上皮癌において survivin の発現は増強し、その発現の程度は浸潤様式と関連性があることが示唆された。

口腔癌治療の問題点として、化学・放射線療法の強い副作用や外科的療法後の機能障害、審美障害などから患者の QOL 低下が挙げられる。QOL の向上のためには、より副作用が少なく、臓器や組織を温存できる治療法の開発が必要である。そこで、申請者は分子標的薬の口腔癌治療への応用が可能であるか検討している。分子標的薬は癌特異的な分子を標的とするため、抗癌剤と比較して副作用が少なく、強い抗腫瘍効果が得られることが期待される。一方、申請者らは bortezomib を用いて NF- $\kappa$ B を抑制すると、血管新生の抑制を介し、腫瘍増殖を抑制することを明らかにした (Int J Cancer, 108: 912-921, 2004、

Am Assoc Cancer Res Annu Meet Proc. 49: 98, 2008.)。つまり、NF- $\kappa$ B が口腔癌治療の分子標的の一つになりえることを示した。さらに、本研究では、bortezomib がアポトーシスに影響を及ぼさないという欠点を補うために survivin を分子標的とする併用療法を検討している。従って、survivin 阻害剤を bortezomib と併用すると、異なった細胞内のシグナルを阻止することで強い抗腫瘍効果が得られることが予想される。一方、bortezomib は多発性骨髄腫の治療薬として認可されており、また、survivin の分子標的薬は肺癌に対して臨床試験が行われているが、口腔癌に対するこのような分子標的治療の報告は未だない。以上のことより、標的分子として NF- $\kappa$ B と survivin に着目した本研究は当該分野において非常に独創的な発想と考えられる。したがって、それらの分子を標的とした治療法を検討することは口腔癌の新規治療法を開発する上での基礎的研究に役立ち、口腔癌患者の QOL の向上に寄与するものと考えられる。

### 5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 2 件)

1. 高丸菜都美, 口腔扁平上皮癌の核および細胞質における survivin の発現に関する検討, 第 65 回 NPO 法人日本口腔科学学会学術集会, 2010 年 4 月 22 日, 東京
2. 高丸菜都美, 口腔扁平上皮癌における survivin の発現と浸潤度および転移との関連性の検討, 2009 年 10 月 9 日, 第 54 回日本口腔外科学会総会・学術大会, 札幌

6. 研究組織

(1)研究代表者

高丸 菜都美

(TAKAMARU NATSUMI)

徳島大学・病院・助教

研究者番号：

40513031