

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592534

研究課題名(和文) 頭頸部癌治療における高濃度酸素療法の可能性とロックス1発現に関する検討

研究課題名(英文) LOX-1 gene expression in head and neck carcinoma and high-concentrated Oxygen therapy

研究代表者

真栄田 裕行(MAEDA, HIROYUKI)

琉球大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：40264501

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円、(間接経費) 1,290,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の最終目的は頭頸部癌に有効な新規治療法を確立することである。現段階では cDNA クローニングおよびシーケンス、発現ベクターの作製、抗ロックス1抗体およびロックス1のリコンビナントタンパクの作製は完了した。以上を用いて頭頸部癌組織におけるロックス1の発現を免疫組織学的手法により解析した。その結果頭頸部扁平上皮癌においてロックス1は頭頸部の各臓器で一定量発現しており、臓器特異的に発現の差異は認められなかった。その一方、再発頭頸部癌組織においてはロックス1の発現は明らかに増加していることが判明した。平成26年度以降も引き続き高濃度酸素環境下における癌の生物学的特質の変化について検討する。

研究成果の概要(英文)：We tried to clarify relationships between expression of LOX-1 and HNSCC. We enumerated some methods concretely. Complementary DNA cloning of human LOX-1 gene, establishment of some expression vectors and production of anti-LOX-1 antibody have already finished. Therefore, preparation of LOX-1 recombinant protein and immunohistopathological analysis using anti-LOX-1 antibody was performed. Moreover, we are going to make carcinogenic model rat using transgenic rat included cancer gene and investigate about change of biological characteristics of HNSCC under high concentration oxygen. As a result, so far, we have seen as follows. The expression of LOX-1 was observed at some tissues in HNSCC. In other words, significant difference was not found in the tissue-specificity. On the other hands, the expression of LOX-1 increased in recurrent HNSCC. We will continue to analyze relationship between the expression of LOX-1 and attitude of cancer cell or tissues.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：ロックス1 頭頸部癌 高濃度酸素療法 発癌モデルラット

1. 研究開始当初の背景

頭頸部癌はヒト癌部位別割合では六番目に発生数の多い癌である。早期発見が難しいため進行癌で見つかる場合が多く、他の部位の癌に比しても予後が悪いことから世界的に重要な健康課題の一つとされている。またその多くが扁平上皮癌であり、主に鼻・副鼻腔、口腔、咽喉頭に発生する。これまでの疫学調査から頭頸部癌の発癌因子として、喫煙や飲酒などの生活習慣に基づく発癌性物質への長期曝露やパピローマウイルス感染の関与が指摘されている。しかし診断や治療に直結する臨床的指標や分子標的治療の対象は十分に明らかにされていない。この頭頸部癌発生のメカニズムを解明することが頭頸部癌の治療成績や予後の改善に寄与すると考えられる。

一方悪性新生物を遺伝子レベルで解析した場合、正常の細胞では発現が少ない遺伝子が過剰に発現する場合がある。本研究の標的である *Lysyl Oxidase type-1* (以下 LOX-1) もこの一つであり、口腔癌および中咽頭癌で特に高頻度に発現し、またリンパ節転移や予後の予測因子になり得る可能性があることが初めて報告された。この事実をもって頭頸部癌の悪性度や転移レベルなどの臨床的指標として利用可能であることを示唆する報告も散見される。しかし実際には LOX-1 の発癌あるいは癌抑制に対する分子レベルでのメカニズムはいまだ不明な点が多く、臨床応用の面からもその解明は十分であるとは言えない。ところでこの LOX-1 は 417 アミノ酸残基から成り立ち、コラーゲンやエラスチンなど線維性タンパクペプチド鎖中のリシン残基の ϵ アミノ基をアルデヒド基に酸化的脱アミノ反応で変換するアミン酸化酵素である。一方リシンは生体内必須アミノ酸の一つであり、その ϵ アミノ基は反応で生じたアルデヒド基の非酵素的縮合反応により、コラーゲンやエラスチン分子内に架橋構造を生成する。この架橋構造の変化によって線維性タンパク質の安定性や、構造体としてのタンパク質の機能を発揮することができる。一方線維性タンパク質は癌の増殖や転移床への腫瘍細胞の付着能と密接な関与があると考えられている。よって LOX-1 の活性の変化は線維性タンパク質の形成に影響を与え、結果として癌の臨床的性質の変化を惹起させ

るものと想像できる。さらに LOX-1 は生体の低酸素環境下や組織内酸素飽和度の低下により誘導されると考えられている。また悪性腫瘍においては一般に生体が低酸素環境下におかれており、腫瘍組織内酸素飽和度が著しく低下していることがわかっている。これらの事実から生体あるいは細胞内酸素濃度の変化と LOX-1 の発現レベルさらには癌細胞の増殖や抑制とは密接な関連性を有することが想像できる。

2. 研究の目的

本研究は LOX-1 の発癌あるいは癌抑制に対する分子レベルでのメカニズムを解明することにより LOX-1 の臨床応用を目指して遂行されるが、最終的には頭頸部癌に有効な新規治療方法を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

平成 23 年度：

まず生化学的手法を用いて、LOX-1 の癌細胞に及ぼす影響の分子生化学的機序を解明する。具体的にはヒト LOX-1 の cDNA クローニングを行い、種々の方法で結合タンパク質の探索をすると共に、抗 LOX-1 抗体を作製して LOX-1 の細胞内発現や局在を確認する。そのために以下の実験が予定された。(1) ヒト LOX-1 の cDNA クローニング、(2) 各種発現ベクターの構築、(3) LOX-1 に対する抗体の作製、(4) 酵母ツーハイブリッド法による基質タンパク質の同定、(5) LOX-1 とその結合タンパク質に関する細胞生物学的解析などが具体的実験内容である。また細胞生物学的解析の際に使用する方法として細胞増殖アッセイ、フォーカスアッセイ、コロニーフォーメーションアッセイ、ヌードマウスへの移植実験、ボイデンチャンバー法などが計画された。また LOX-1 遺伝子を導入された細胞株を用いて、細胞周期の各段階における LOX-1 の発現をウエスタン解析法およびフローサイトメーターで検討する。さらに癌遺伝子(活性型 Src など)と LOX-1 とを共発現させた場合におけるフォーカスアッセイおよび足場依存性細胞増殖能を比較検討する計画が予定された。

平成 24 年度：

23 年度の実験で得られた結果を基にした、in vivo における解析を中心とした実験が予定

された。すなわち頭頸部癌細胞株および組織あるいは遺伝子改変ラットにおける LOX-1 の発現解析である。具体的には作製した抗 LOX-1 抗体を用いて頭頸部癌細胞株や生検材料、手術検体などの癌組織における LOX-1 の発現および細胞内局在および安定性を解析することが計画された。また頭頸部以外の癌組織における LOX-1 の発現を比較検討する。方法はウエスタン解析法によるティッシュアッセイ、免疫蛍光染色法、パルスチェイスアッセイ法を用いる。さらに LOX-1 の遺伝子改変ラットを作製し、個体発生における影響を調べるが、その中でも特に発癌の異常に着目する。その他にもこの遺伝子操作ラットを使用した個体レベルの解析により、既存の発生異常または癌と類似の病理および臨床症状を呈する疾患が存在するかを検索する。また舌癌モデルラットの作製を予定した。癌遺伝子である Harvey 株マウス肉腫ウイルス (Ha-ras) 遺伝子を組み込んだ遺伝子改変ラットに対し、化学発癌物質を作用させて舌癌のモデルラットを作製する。具体的には強力な発癌物質である 4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO) を前述のラットに一定期間経口的に投与することで舌癌を発生させる方法が実践可能である。

平成 25 年度：

悪性腫瘍においては一般に生体が低酸素環境下におかれており、腫瘍組織内酸素飽和度が著しく低下していることがわかっている。そこで悪性腫瘍患者を逆に高酸素濃度環境下に置くことで癌の治癒機転に好ましい変化が生ずるかを明確にする。すなわち平成 25 年度は前年までの基礎実験結果を基に、頭頸部癌患者における高濃度酸素療法の効果に関する臨床的検討を行う。具体的には高気圧チャンバーを使用した高酸素濃度環境下において、担癌患者における癌組織内の LOX-1 発現の変化を検討する。LOX-1 の発現が酸素濃度依存性であった場合、その発現と癌細胞の癌生物学的特質変化と合わせて、LOX-1 の臨床における役割を規定する。作製されたラットを用いて高濃度酸素環境下における悪性腫瘍（舌癌）の増殖速度の変化や抑制効果の有無について検討する。同じく舌癌モデルラットを用いて抗腫瘍薬の悪性腫瘍に対する抑制効果に及ぼす高濃度酸素環境の影響

について検討する。具体的には舌癌モデルラットにシスプラチン、ドセタキセル、5-Fluorouracil を経静脈的に全身投与し、期待される抗腫瘍効果が高濃度酸素環境下におかれた状況の中でどのような抑制効果をもたらすのかを検討する。さらには高濃度酸素環境下における癌細胞と担癌個体レベルにおける癌生物学的特質の変化についての関連性を分子生物学的に検討する。たとえば低濃度酸素条件下で発現が多くなるとされている HIF1 α や LOX-1 などのタンパク質発現との関連性を明らかにする。以上の実験が計画された。

4. 研究成果

平成 23 年度：

(1) ヒト LOX-1 の cDNA クローニング

ヒト LOX-1 の cDNA を PCR を使用し、ヒトの cDNA ライブラリーから増幅し、シーケンスによって確認した。

増幅のためのプライマー設計

5' -AAGATGCGCTTCGCCTGGACCGTG-3'

5' -TATCTAATACGGTGAAATTGTGCA-3'

全遺伝子配列

```
ATGCGCTTCGCCTGGACCGTGCTCCTGCTCGGGCCTTTG
CAGCTCTGCGCGCTAGTGCCTGCGCCCTCCCGCCGCC
GGCCAACAGCAGCCCCGCGCGAGCCGCGGGCTCCG
GGCGCCTGGCGCCAGCAGATCCAATGGGAGAACAACGGG
CAGGTGTTTCAGCTTGTGAGCCTGGGCTCACAGTACCAG
CCTCAGCGCCCGGGACCCGGGCGCCCGCTCCCTGGT
GCAGCCAACGCCTCCGCCAGCAGCCCGCACTCCGATC
CTGCTGATCCGCGACAACCGCACCGCCGCGCGCAACG
CGGACGGCCGGCTCATCTGGAGTACCCTGGCCGCCCC
AGGCCACCGCCCGTCACTGGTTCCAAGTGGCTACTCG
ACATCTAGAGCCCGGAAGTGGCGCTCGCGCGGGAG
AACCAGACAGCGCCGGGAGAAGTTCCTGCGCTCAGTAAC
CTGCGGCCCGCCAGCCGCTGGACGGCATGGTGGCGCAC
GACCCCTTACAACCCCTACAAGTACTCTGACGACAACCCT
TATTACAATACTACTACGATACTTATGAAAGGCCAGACCT
GGGGCAGGTACCGCCCGGATACGGCACTGGCTACTTC
CAGTACGGTCTCCAGACCTGGTGGCCGACCCCTACTAC
ATCCAGCGTCCACGTACGTGCAGAAGATGTCCATGTAC
AACCTGAGATGCGCGGGGAGGAAAAGTGTCTGGCCAGT
ACAGCATAACAGGGCAGATGTCAGAGATTATGATCACAGG
GTGCTGCTCAGATTTCCCCAAAGAGTGAAAAACCAAGGG
ACATCAGATTTCTTACCAGCCGACCAAGATATTCCTGG
GAATGGCACAGTTGTTCATCAACATTACCACAGTATGGAT
GAGTTTAGCCACTATGACCTGCTTGTATGCCAACCCAG
AGGAGAGTGGCTGAAGGCCACAAAGCAAGTTTCTGTCTT
GAAGACACATCCTGTGACTATGGCTACCACAGGCGATTT
GCATGTAAGTGCACACACAGGGATTGAGTCTGGCTGT
TATGATACCTATGGTGCAGACATAGACTGCCAGTGGATT
```

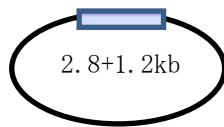
GATATTACAGATGTA AACCTGGAAACTATATCCTAAAG
 GTCAGTGTA AACCCAGCTACCTGGTTCCTGAATCTGAC
 TATACCAACAATGTTGTGCGCTGTGACATTCGCTACACA
 GGACATCATGCGTATGCCTCAGGCTGCACAATTTCCCG
 TATTAG

Gene: CCDS 4129.1

Total Length: 1254bp

Standard Vector: pBMH

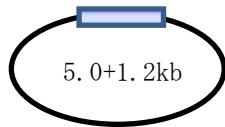
増幅された LOX-1 の cDNA を基本ベクターである pBMH ベクターにクローニング後、シーケンスによって確認した。



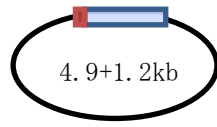
pBMH-LOX-1

(2) 各種発現ベクターの構築

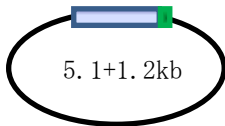
LOX-1 の cDNA を pBMH-LOX-1 から哺乳類発現ベクター系 (pcDNA3)、大腸菌発現ベクター系 (pGEX-6p、pET30)、酵母発現ベクター系 (pBTM116) レトロウイルス発現系 (pMX-puro) にサブクローニングし、各種の実験に対応したコンストラクトを作製した。



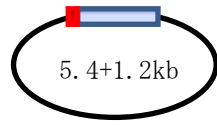
pBTM116-LOX-1
酵母発現 Vector



pGEX 6p-1-LOX-1
GST タグ付きの
大腸菌発現 Vector



pCR-FLAG
FLAG タグ付きの
哺乳類細胞発現
Vector



pcDNA3-LOX-1
HA タグ付きの
哺乳類細胞発現
Vector

(3) LOX-1 に対する抗体の作製

大腸菌発現ベクター系により作製されたリコンビナント LOX-1 をウサギに免疫して抗血清(ポリクローナル抗体)を作製し、さらにアフィニティカラムで精製した。さらに実験

に最適な抗体の濃度調整を行った。

結果:最適な抗原抗体反応時間は 12 時間、露光時間は 10 秒、抗体濃度は 20000 倍の濃度で使用可能であることが判明した。

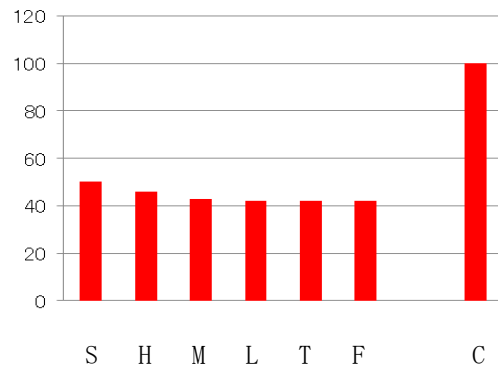
平成 24 年度 :

平成 23 年度中に H-Ras 遺伝子を組み込んだトランスジェニックラットが完成したために、これを用いた in vivo 実験を並行して行うこととした。すなわちトランスジェニックラットに 4NQO という発癌物質を暴露させて舌癌を発生させた。この発癌モデルラットを高気圧チャンバーで飼育、高濃度酸素に暴露させることで、舌癌の癌生物学的特質の変化が生ずるかどうか検討中であった。ところが酸素濃度や暴露時間など種々の条件設定のための予備実験を施行中、発癌モデルラットが死亡し、一時実験が中断した。現在も引き続き発癌モデルラットを用いた癌生物学的特質の変化を検討するために条件を設定中である。

平成 25 年度 :

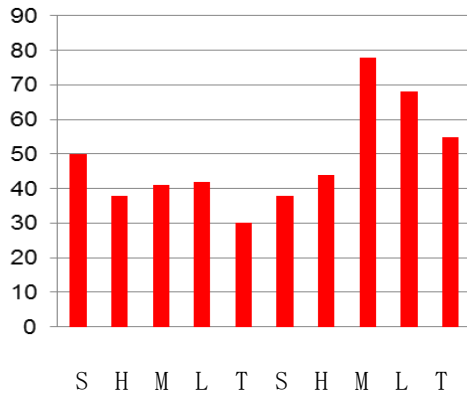
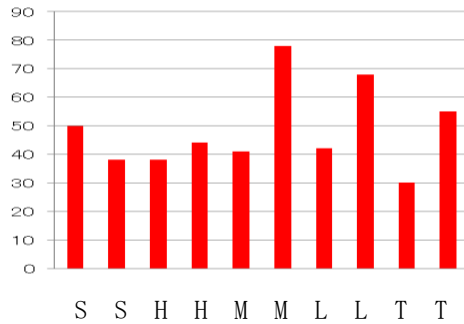
抗 LOX-1 抗体を用いてパラフィン固定されたヒト頭頸部癌の免疫組織染色を施行し、実際の頭頸部癌組織における LOX-1 タンパク質の発現について検討した。

LOX-1 の臓器別発現



S: Sinus H: Hypopharynx M: Mesopharynx
 L: Larynx T: Tongue F: Mouth Floor
 C: Control

LOX-1 の臓器別発現(未治療と再発)



S: Sinus H: Hypopharynx M: Mesopharynx
L: Larynx T: Tongue

現段階で判明している結果として、

(1)頭頸部扁平上皮癌において LOX-1 は頭頸部の各臓器で一定量発現しており、臓器特異的に発現の差異は認められなかった。

(2)再発頭頸部癌組織においては LOX-1 の発現は明らかに増加していることが判明した。特に中咽頭癌における発現が上昇していた。

平成 26 年度以降も遂行中の実験を継続し、また予定されている新規の実験、特に発癌モデルラットを利用した in vivo の実験および解析にも着手する。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 20 件)

- ① 山下懐, 長谷川昌宏, 新垣香太, 上原貴行, 安慶名信也, 真栄田裕行, 鈴木幹男: 下顎部に発生したデルモイド型乳児線維腫症の 1 例. 頭頸部外科 23(2): 205~209, 2013 査読有
- ② 真栄田裕行: 外傷—気道・頸部外傷. 耳喉頭頸 85(5): 154-159, 2013. 査

読有

- ③ 喜友名朝則, 真栄田裕行, 喜瀬乗基, 比嘉麻乃, 金城秀俊, 上原貴行, 安慶名信也, 鈴木幹男: 当科における喉頭肉芽腫症例の検討. 日気食会報 64(3): 182-188, 2013. 査読有
- ④ 真栄田裕行, 鈴木幹男: 耳下腺腫瘍手術時における顔面神経の取り扱い. Facial N Res Jpn 33: 42-44, 2013. 査読有
- ⑤ 長谷川昌宏, 真栄田裕行, 鈴木幹男: 篩骨蜂巢—その不思議なもの— Onodi 蜂巢 JOHNS 29(8): 1253-1257, 2013 査読有
- ⑥ Hasegawa M, Deng Z, Maeda H, Yamashita Y, Matayoshi S, Kiyuna A, Agena S, Uehara T, Suzuki M: Human papillomavirus load and physical status in sinonasal inverted papilloma and squamous cell carcinoma. Rhinology 50: 87-94, 2012. 査読有
- ⑦ Deng Z, Hasegawa M, Kiyuna A, Matayoshi S, Uehara T, Agena S, Yamashita Y, Ogawa K, Maeda H, Suzuki M: Viral load, physical status, and E6/E7 mRNA expression of human papillomavirus in head and neck squamous cell carcinoma. Head Neck 13: 2012. 査読有
- ⑧ Deng Z, Hasegawa M, Yamashita Y, Matayoshi S, Kiyuna A, Agena S, Uehara T, Maeda H, Suzuki M: Prognostic value of human papillomavirus and squamous cell carcinoma antigen in head and neck squamous cell carcinoma. Cancer Sci 103: 2127-34, 2012. 査読有
- ⑨ Suzuki M, Deng Z, Hasegawa M, Uehara T, Kiyuna A, Maeda H: Squamous cell carcinoma antigen

production in nasal inverted papilloma. Am J Rhinol Allergy 26: 365-370, 2012. 査読有

- ⑩ 渡嘉敷光紘, 喜友名朝則, 比嘉麻乃, 真栄田裕行, 鈴木幹男: 喉頭腫瘍におけるヒト乳頭腫ウイルス感染について. 喉頭 24: 103-108, 2012. 査読有
- ⑪ Deng Z, Hasegawa M, Matayoshi S, Kiyuna A, Yamashita Y, Maeda H, Suzuki M: Prevalence and clinical features of human papillomavirus in head and neck squamous cell carcinoma in Okinawa, southern Japan. Eur Arch Otorhinolaryngol 268: 1625-1631, 2011. 査読有
- ⑫ 真栄田裕行, 一色信彦, 田辺正博, 松島康二, 溝口兼司, 山本一道, 折館伸彦, 福田諭, 喜友名朝則, 比嘉麻乃, 鈴木幹男: 声帯麻痺に対する最近の手術的治療—特に Titanium Plate を使用した音声再建について—. 日気食会報 62(4): 377-383, 2011. 査読有

[学会発表] (計6件)

- ① 真栄田裕行: 喉頭疾患とヒト乳頭腫ウイルス—喉頭疾患と HPV 感染. 2014/03/07, 那覇, 第26回日本喉頭科学会シンポジウム
- ② 真栄田裕行, 喜瀬乗基, 安慶名信也, 喜友名朝則, 鄧澤義, 鈴木幹男: HPV が検出された鰓性癌の一考察. 2014/01/30, 高松, 日本頭頸部外科学会・学術講演会
- ③ 真栄田裕行, 安慶名信也, 山下懐, 金城秀俊, 長谷川昌宏, 鈴木幹男: 甲状腺未分化癌の進展様式に関する検討. 2013/06/14, 東京, 第37回日本頭頸部癌学会・学術講演会
- ④ 真栄田裕行, 長谷川昌宏, 山下懐, 安慶名信也, 喜友名朝則, 鈴木幹男: 耳

下腺良性腫瘍切除後の皮膚切開創部に関する一考察. 2013/05/16, 札幌, 第114回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会

- ⑤ 真栄田裕行, 鈴木幹男: 耳下腺腫瘍手術時における顔面神経の取り扱い. 2013/04/26, 那覇, 第36回日本顔面神経研究会シンポジウム
- ⑥ 真栄田裕行, 金城秀俊, 喜瀬乗基, 鈴木幹男: 木村氏病と IgG4 関連疾患に関する一考察. 2013/02/08, 倉敷, 第31回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会

6. 研究組織

(1) 研究代表者

真栄田 裕行 (MAEDA, Hiroyuki)
琉球大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 40264501