

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20225

研究課題名(和文) 頭頸部癌におけるCOX-2発現解析と抗癌剤耐性メカニズムの解明

研究課題名(英文) Analysis of COX-2 expression and elucidation of anticancer drug resistance mechanism in head and neck cancers

研究代表者

渡部 佳弘 (WATANABE, YOSHIHIRO)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・共同研究員

研究者番号：30445374

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：咽頭癌細胞株に対してCOX2阻害剤とEP2阻害剤によりCDH1発現が増加した。免疫蛍光染色ではE-cadherinの膜発現も増強した。migration assayでは咽頭癌細胞抑制効果を示した。これらの薬剤は癌の転移抑制効果が期待される。咽頭癌経口的切除組織のCOX2とE-cadherinの免疫染色も行った。その結果と臨床データから、多変量解析を行い、COX2発現亢進とE-cadherin発現低下は頸部リンパ節転移の独立規定因子であることを示した。咽頭平上皮癌の頸部リンパ節転移は、COX2発現亢進とE-cadherinの発現低下が深く関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Expression of CDH1 was increased by the COX 2 inhibitor and the EP 2 inhibitor on the pharyngeal cancer cell line. Immunofluorescent staining also enhanced membrane expression of E-cadherin. The migration assay showed pharyngeal cancer cell inhibitory effect. These agents are expected to have metastasis inhibitory effects on cancer. Immunohistochemical staining of COX 2 and E-cadherin in oral excised tissues of laryngeal carcinoma was also performed. Multivariate analysis was carried out based on the results and clinical data, and it was shown that COX2 expression march and E-cadherin expression decrease are independent regulators of cervical lymph node metastasis. It was suggested that cervical lymph node metastasis of pharyngeal epithelial carcinoma is deeply involved in COX2 expression upregulation and E-cadherin expression decrease.

研究分野：頭頸部癌

キーワード：咽頭癌 頭頸部癌 TOVS ELPS COX2

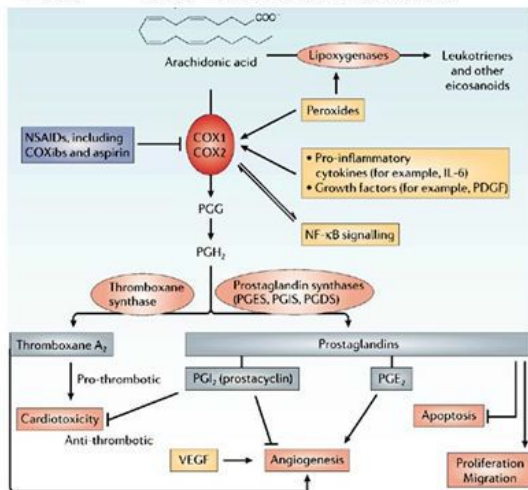
1. 研究開始当初の背景

1) COX-2の選択的阻害による抗腫瘍効果

脂肪酸酸化酵素cyclooxygenase (COX)はアラキドン酸を基質とした生理活性物

Prostaglandin (PGs)の合成を介して様々な細胞機能を制御している。COX-2は炎症性刺激やサイトカイン、増殖因子などにより誘導されるが、癌細胞においても発現の亢進が認められている。COX-2が癌の発生と進行に寄与する作用は、細胞増殖能亢進・浸潤能亢進・血管新生誘導・アポトーシス抑制など多彩である(図1)。

【図1】 COX-2と細胞機能との関係



Ulrich. Nat Rev Cancer 2006

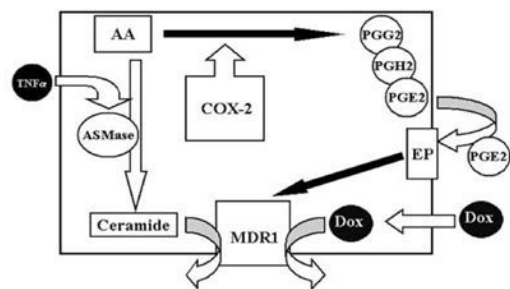
その選択的阻害によるchemoprevention効果も消化器癌を中心に報告されているが、長期投与における安全性やPGs受容体レベルでのさらなる選択性が課題である(Cathcart, Biochim Biophys Acta 2012)。最近我々は、COX-2との関係が未解明であった細胞接着能および運動能への影響について頭頸部癌細胞を用いて検討し、選択的COX-2阻害剤により転写抑制因子snail, SIP1, Twistの発現抑制を介して癌細胞における細胞接着因子E-cadherinの発現が回復増強され、上皮間葉転換(EMT)が抑制されること、COX-2が癌転移と密接に関わることを報告した(Fujii, J Exp Clin Cancer Res 2014)。

2) COX-2によるMDR-1 (multidrug resistance

protein1) 発現調節と化学療法耐性

COX-2は上述のように細胞の悪性化に様々な形で寄与するが、近年になりCOX-2発現が薬剤耐性に関わっていることが注目されてきている。大腸癌細胞株において、COX-2発現が多剤耐性に関連するMDR-1の発現を上昇させること(Sui, Carcinogenesis 2011)、また子宮体癌細胞株においてCOX-2発現とMDR-1発現に相関があり、paclitaxel投与によりCOX-2発現が誘導されること、paclitaxelとCOX-2阻害薬の併用により細胞内のpaclitaxel濃度が減少することを報告している(Hasegawa, Oncol Rep 2013)。また臨床レベルでは非浸潤性乳管癌に対するaromatase阻害薬の耐性にCOX-2が関与していることが報告され(Generali, Br J Cancer 2014)、aromatase阻害薬にCOX-2阻害薬を併用するPhase II studyが行われている(Bundred, Clin Cancer Res 2010 & Lustberg, Clin Breast Cancer 2011)。COX-2はMDR-1以外にも薬剤耐性に関わる蛋白を制御することによって薬剤耐性に関わっていると考えられ(Sorokin, Curr Pharm Des 2004)、抗癌剤の抗腫瘍効果を高めるためのターゲットとして注目されている(図2)。

【図2】 COX-2とMDR-1



AA: arachinoid acid
ASMase: Acidic sphingomyelinase
Dox: doxorubicin

3) 頭頸部癌における化学療法の現状

頭頸部癌は症状に乏しく、特に下咽頭癌においては初診時より進行癌であることが多い。進行症例の治療には手術・放射線・化学療法を統合的に用いる集学的治療を行うが、依然

として頭頸部癌全体の5年生存率は約50%と治療成績の改善をみていない。近年になり分子標的薬であるcetuximabが頭頸部癌において良好な治療効果を示し、化学放射線治療としてcetuximabを併用することにより生存率の向上がみられ(Bonner, NEJM 2008)、再発・遠隔転移症例についてはcisplatin, 5-FU, cetuximabを用いた3剤併称療法が標準化されるに至った(Vermorken NEJM2008)。さらに2014年ASCOにてdocetaxel, cisplatin, 5FUによるinduction chemotherapyによりPhase IIの段階で予後改善効果があることが報告され(Ghi ASCO 2014)、これまで予後改善への寄与に疑問が持たれていたInduction chemotherapyの価値が見直されてきている。このような流れの中で抗癌剤治療に対するバイオマーカーを用いた効果予測や、薬剤耐性に関わるメカニズムを解明しそれに対する治療を考えていくことは重要であり、その成果が臨床成績の改善へのbreakthroughとなりうる。

2. 研究の目的

COX-2 は癌の発生と進行に多彩な役割を果たしており、近年、薬剤耐性にも関わることが分かってきている。COX-2 は多剤耐性に関わるMDR-1 発現をコントロールし、このMDR-1により細胞内の薬剤排出が行われている。頭頸部癌治療における化学療法は、放射線との併用により良好な臓器温存および生存率を示し、また再発・切除不能例の選択肢には生物学的製剤との併用でも優れた効果を示しているが、頻回の治療に伴う耐性化やその治療に抵抗する腫瘍についてのメカニズムは解明されていない。本研究は頭頸部癌における薬剤耐性についてのCOX-2, MDR-1 の役割を解明し、化学療法抵抗性の頭頸部癌の新規治療の確立を目指すことが目的である。

3. 研究の方法

慶應義塾大学医学部耳鼻咽喉科にて治療を行った下咽頭癌症例におけるCOX-2, CDH-1 の

免疫染色を行った。それら結果と臨床データと比較し、COX-2, CDH-1 発現が化学療法の奏効率、ステージや予後に与える影響を明らかにする様々な咽頭癌細胞株におけるCOX-2, CDH-1 の発現を評価した。薬剤感受性頭頸部癌細胞株の樹立は当初の計画から遅延してしまった。そのため、咽頭癌細胞株に対しCOX2阻害剤と、その下流シグナルのEP2阻害剤を用いてmRNA(CDH-1, Vimentin, Snail, ZEB1, Twist)を抽出し定量的PCRで遺伝子レベルで評価した。また、咽頭癌細胞株BICR6とFaDuに対してin vitro migration assayおよびproliferation assayによる細胞遊走能、増殖能の評価をした。細胞免疫蛍光染色では選択的Cox-2およびEP2阻害でのE-cadherinタンパクの発現増強効果を評価した。

4. 研究成果

- (1) 咽頭癌細胞株 (FaDu, BICR6, Detroit562) のCOX2とCDH1 (E-cadherin) のmRNA発現を評価した。(図3) 咽頭癌細胞株に対するCOX2阻害剤と同様に、EP2阻害剤でもCDH1発現の増強とVimentin発現の減弱が示された。(図4) さらに、E-cadherinの転写抑制因子であるsnailも抑制することを示した。(図5)

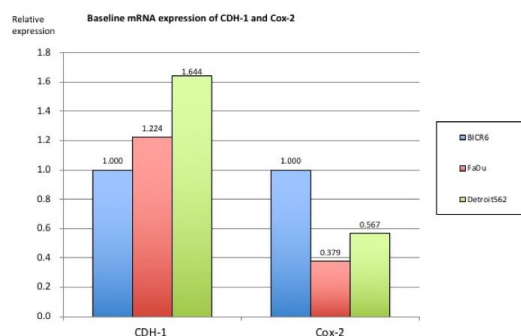


図3

図4

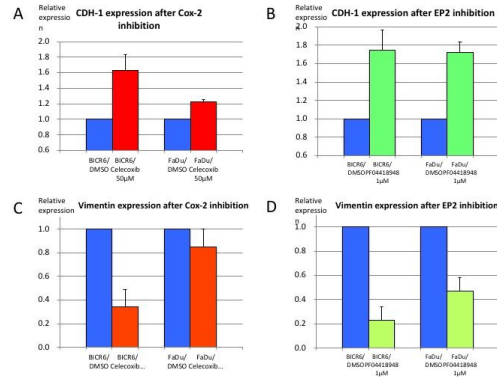
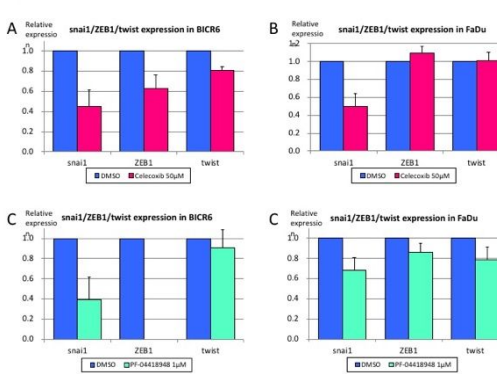


図5



migration assayでは咽頭癌細胞株のBICR6とFaDu共に抑制した。しかし、proliferation assayでは、FaDuは増殖抑制効果を示した。BICR6では運動能を抑制することで、転移を抑制することが示された。(図6) また、COX2阻害剤とEP2阻害剤によってE-cadherinの膜発現も免疫蛍光染色により増強効果を示した。(図7) これらの薬剤による、癌の転移抑制効果が期待される。

図6

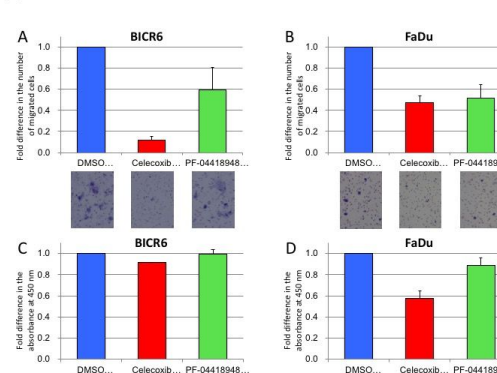
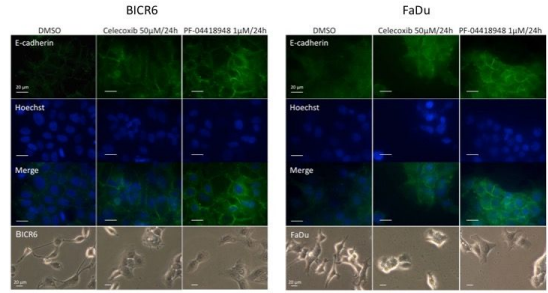
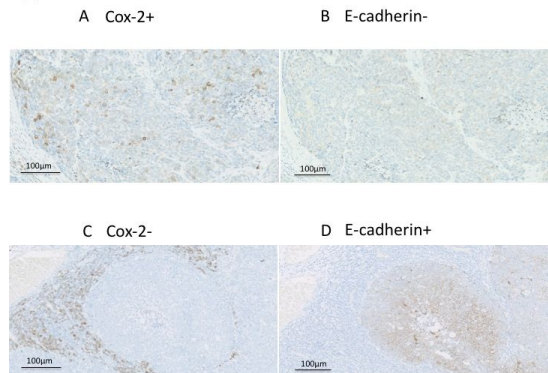


図7



(2) 2007~2013年までに慶應義塾大学耳鼻咽喉科にて咽頭癌に対して経口的切除を行った54症例のCOX2とE-cadherinの免疫染色も行った。(図8) その結果と臨床データから、多変量解析を行い、COX2発現行進 (Odds ratio=53.49, 95% confidence interval = 5.706-501.489, P<0.001) とE-cadherin発現低下 (Odds ratio=0.06, 95% confidence interval = 0.005-0.589, P=0.016) は頸部リンパ節転移の独立規定因子であることが示された。咽頭平上皮癌の頸部リンパ節転移には、癌細胞の上皮間葉移行を反映するCOX2発現亢進とE-cadherinの発現低下が深く関与していることが示唆された。

図8



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)

〔学会発表〕(計4件)

- (1) Yoshihiro Watanabe, Yorihisa Imanishi, Hiroyuki Ozawa, Kaori Kameyama, Koji Sakamoto, Ryoichi Fujii, Seiji Shigetomi, Noboru Habu, Kuninori

Otsuka, Yoichiro Sato, Mariko Sekimizu, Fumihito Ito, Yuichi Ikari, Shin Saito, and Kaoru Ogawa : Anti-cancer effects of selective Cox-2 and EP2 inhibition through suppression of EMT and the clinical implications of overexpression of Cox-2 and downregulation of E-cadherin in pharyngeal squamous cell carcinoma. American Association for Cancer Research annual meeting , 2017

- (2) 渡部佳弘 今西順久 小澤宏之 藤井良一 羽生昇 佐藤陽一郎 関水真理子 伊藤文展 猪狩雄一 齋藤真 坂本耕二 富田俊樹 小川郁 咽頭扁平上皮癌における Cox2 及び EP2 選択的阻害による EMT 抑制効果と E-cadherin と Cox2 発現の臨床的意義の検討 第 118 回日本耳鼻咽喉科学会 2017

- (3) Yoshihiro Watanabe, Yori-hisa Imanishi, Hiroyuki Ozawa, Kaori Kameyama, Koji Sakamoto, Ryoichi Fujii, Seiji Shigetomi, Noboru Habu, and Kaoru Ogawa : The Cox2 and EP2 inhibition suppress EMT and the expression of Cox2 and E-cadherin involved into pharyngeal carcinoma 第 76 回日本癌学会 2017

- (4) 渡部佳弘 今西順久 小澤宏之 藤井良一 羽生昇 佐藤陽一郎 関水真理子 猪狩雄一 齋藤真 富田俊樹 小川郁 咽頭扁平上皮癌における Cox2-inhibition と E-cadherin 発現制御に関する検討 第 40 回頭頸部癌学会 2016

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡部 佳弘 (WATANABE, Yoshihiro)
慶應義塾大学・医学部 (信濃町)・共同研究員
研究者番号 : 30445374

(2) 連携研究者

今西 順久 (IMANISHI, Yori-hisa)
慶應義塾大学・医学部 (信濃町)・講師 (非常勤)
研究者番号 : 80255538

小澤 宏之 (OZAWA, Hiroyuki)
慶應義塾大学・医学部 (信濃町)・専任講師
研究者番号 : 30327621

(3) 研究協力者

関水 真理子 (SEKIMIZU, Mariko)
猪狩 雄一 (IKARI, Yuichiro)
齋藤 真 (SAITO, Shin)