

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K17258

研究課題名(和文) 口腔扁平上皮癌に対するNF- $\kappa$ Bを分子標的とした新規併用癌化学療法の開発

研究課題名(英文) Development of combination chemotherapy using NF-kappaB as molecular target for oral squamous cell carcinoma

研究代表者

可児 耕一 (KANI, Kouichi)

徳島大学・病院・助教

研究者番号：60709583

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：口腔扁平上皮癌細胞株B88細胞に対して、抗癌剤ドセタキセルとビタミンE誘導体である $\alpha$ -トコトリエノールを併用したところ、著明な抗腫瘍効果が認められた。本研究においては、転写因子NF- $\kappa$ Bに着目し、抗腫瘍効果の検討を行った。ドセタキセルによりNF- $\kappa$ Bの活性化が認められたが、 $\alpha$ -トコトリエノールを併用することにより、NF- $\kappa$ Bの活性化は抑制された。NF- $\kappa$ Bの活性化の抑制による、NF- $\kappa$ Bによって制御されるアポトーシス抑制タンパクの発現抑制、およびアポトーシス関連タンパクの発現上昇を介してアポトーシスを誘導していると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、NF- $\kappa$ Bを選択的に阻害することにより、口腔癌細胞に対する直接的な抗腫瘍効果とドセタキセルの抗腫瘍効果の増強という2つの効果が期待できると考えた。 $\alpha$ -トコトリエノールはNF- $\kappa$ B選択的阻害薬として口腔扁平上皮癌細胞の増殖を抑制し、さらにドセタキセルの抗腫瘍効果を増強させた。本結果より、ドセタキセルと $\alpha$ -トコトリエノール併用化学療法は進行口腔癌の有効な新規治療法となり得る可能性が示された。さらに本研究結果より得られた成果は、口腔癌患者に対する癌薬物療法による治療成績の向上に寄与すると考えられ、患者への貢献は大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：When the anticancer drug docetaxel and the vitamin E derivative  $\alpha$ -tocotrienol were used in combination with the oral squamous cell line B88 cells, a remarkable antitumor effect was observed. In this study, we focused on the transcription factor NF- $\kappa$ B and examined its antitumor effect. Activation of NF- $\kappa$ B was observed by docetaxel, but activation of NF- $\kappa$ B was suppressed by the combined use of  $\alpha$ -tocotrienol. It was considered that the combined use induces apoptosis by suppressing the expression of the apoptosis-suppressing protein controlled by NF- $\kappa$ B and increasing the expression of the apoptosis-related protein.

研究分野：口腔外科学

キーワード：臨床腫瘍学

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

口腔癌に対する治療法は、手術療法、放射線療法、薬物療法が単独または併用されて行われている。口腔癌治療の主体は手術療法と放射線療法であるが、薬物療法は進行例や再発・転移例に対して用いられている。しかしながら、進行口腔癌の大多数の症例において十分な効果が得られていないのが現状である。

近年、網羅的ゲノム解析の著しい進展により、癌の発生、進展、浸潤、転移に關与する特定分子を標的とした分子標的治療薬が次々に開発され、口腔癌においても上皮成長因子受容体 (EGFR) 阻害薬が適応となっている。これまでに研究代表者は、口腔癌細胞や唾液腺癌細胞では正常口腔粘膜細胞や正常唾液腺細胞に比較して転写因子 NF- $\kappa$ B の活性化が増強していることを明らかにし (Cancer Lett 171: 165-172, 2001)、さらに口腔癌細胞における NF- $\kappa$ B の活性化は癌細胞の増殖促進に關与していることを報告した (Int J Cancer 108: 912-921, 2004)。このことは、NF- $\kappa$ B が口腔癌の治療標的分子になり得ることを示唆している。

タキサン系抗癌剤のドセタキセルは、口腔癌治療においてその有用性が明らかにされている。ドセタキセルの作用機序は、細胞内微小管に作用し細胞分裂を阻害することにより抗腫瘍効果を示す。しかしながら一方で、ドセタキセルは癌細胞の生存シグナルである NF- $\kappa$ B を活性化し、その結果として抗腫瘍効果が減弱される負の側面を有すると考えられている。したがって、NF- $\kappa$ B 活性化の制御は、口腔癌細胞の増殖能を抑制し、さらにドセタキセルの抗腫瘍効果を増強させるという2つの効果が期待できる。

ビタミン E 構成成分の一つである  $\alpha$ -トコトリエノールは、天然資源に由来する NF- $\kappa$ B 活性抑制物質で、これまでに様々な癌細胞株において NF- $\kappa$ B の活性化を抑制することが報告されている (J Biol Chem 282: 809-820, 2007)。 $\alpha$ -トコトリエノールは脂溶性ビタミンに分類されるが、過剰摂取による為害性の報告はなく、非常に安全性の高い物質と考えられている (Curr Pharm Biotechnol 13: 156-164, 2012)。 $\alpha$ -トコトリエノールは NF- $\kappa$ B 選択的阻害薬として、口腔癌細胞の増殖を抑制し、さらにドセタキセルの抗腫瘍効果を増強させる可能性が示唆され、進行口腔癌の有効な新規治療法となり得るのではないかと着想するに至った。

### 2. 研究の目的

本研究は、 $\alpha$ -トコトリエノールが転写因子 NF- $\kappa$ B の選択的阻害薬として口腔癌細胞の増殖能を抑制し、さらにドセタキセルの抗腫瘍効果を増強させる分子機構を解明し、進行口腔癌に対し奏効率が高く有害事象が少ない新規治療法を確立することである。

これまでの先行研究により口腔癌細胞では転写因子 NF- $\kappa$ B の活性化が増強していることが明らかになっている。また、口腔癌において高い治療効果を有する薬剤であるドセタキセルは、癌細胞の生存シグナルである NF- $\kappa$ B を活性化し、抗腫瘍効果が減弱されると考えられている。研究代表者は NF- $\kappa$ B を選択的に阻害することにより、口腔癌細胞に対する直接的な抗腫瘍効果とドセタキセルの抗腫瘍効果の増強という2つの効果が期待できると考えた。この発想は研究代表者の独創的発想である。脂溶性ビタミンである  $\alpha$ -トコトリエノールは、抗酸化作用や抗腫瘍作用などの生理活性を有するとされ、さらに近年 NF- $\kappa$ B 活性抑制因子であることが明らかとなった (J Biol Chem 282: 809-820, 2007)。過剰摂取による為害性の報告はなく、非常に安全性の高い物質である。研究代表者は、 $\alpha$ -トコトリエノールとドセタキセルの併用療法は、口腔癌薬物療法における治療成績の向上に寄与すると考えている。すなわち抗腫瘍効果の増強により、これまでは制御不能であった腫瘍に対しても臨床効果が期待できるようになると考えら

れる。また、低濃度のドセタキセルでも十分な抗腫瘍効果が得られることができれば、高濃度のドセタキセルを使用することによって生じる様々な有害事象を軽減もしくは回避することも可能となる。本研究結果より得られる成果は、口腔癌患者に対する癌薬物療法による治療成績の向上に寄与することから、患者への貢献は大きいと考えられる。

### 3. 研究の方法

*In vivo* において、ドセタキセルと  $\beta$ -トコトリエノールを併用することにより、ヒト口腔癌移植ヌードマウスに対する抗腫瘍効果を増強するか否かの検討を行う。

#### (1) 対象

ヒト口腔癌移植ヌードマウス：100 mm ディッシュ上にてセミコンフルエントまで培養したヒト口腔扁平上皮癌細胞 B88 をそれぞれ回収する。細胞回収後に 8 週齢、雄の BALB/c ヌードマウスの背面に  $5 \times 10^6$  cells/body の細胞濃度にて移植する。移植後約 1 週間、腫瘍体積が 80 ~ 100 mm<sup>3</sup> に到達した時点を実験開始日とする。

#### (2) 使用薬剤

各薬剤とも 1 週間に 3 回（月曜日、水曜日および金曜日）、下記 Group に従い薬剤の腹腔内投与を実施する。

Group1：ドセタキセル

Group2： $\beta$ -トコトリエノール

Group3：ドセタキセル、 $\beta$ -トコトリエノール併用

Group4：生理食塩水（コントロール）

#### (3) 評価方法

有害事象の評価：1 週間に 3 回（月曜日、水曜日および金曜日）に、体重および食事量について評価を行う。薬剤投与開始後、28 日目まで観察を行う。

②腫瘍体積の評価：計算式（腫瘍短径）<sup>2</sup> × （腫瘍長径） ÷ 2 を用いて、腫瘍の体積を計測し、経時的な変化の観察を行う。1 週間に 3 回（月曜日、水曜日および金曜日、いずれも 21 時頃）につき計測を実施する。薬剤投与開始後、28 日目まで観察を行う。

CT を用いた評価：動物用マイクロ CT（Aloka Latheta LCT-2000、日立）を用い、腫瘍をより客観的な方法にて観察を行う。2 週間に 1 回につき、撮影を実施する。

病理組織切片による評価：薬剤投与開始後 28 日目に実験動物のチオペンタールの腹腔内投与による屠殺を行う。屠殺後に腫瘍サンプルを回収し、ホルマリン固定後に脱水操作、パラフィン包埋を行った後、病理組織切片の作製を行う。ヘマトキシリン・エオジン染色による病理組織の評価および NF- $\kappa$ B p65 抗体（Cell Signaling Technology）を用いた免疫染色を行い、NF- $\kappa$ B p65 発現の局在部位の評価を行う。また口腔扁平上皮癌の増殖や浸潤に関連する抗体（VEGF や COX-2 等）に関しても免疫染色を行う。

血液検査による評価：動物実験の屠殺時に、血液サンプルの回収を行う。肝機能、腎機能さらに腫瘍関連マーカーの評価を行う。

腫瘍における転写因子 NF- $\kappa$ B の発現、アポトーシス関連遺伝子産物の発現、アポトーシス抑制遺伝子産物の発現の評価：屠殺動物より得られた腫瘍サンプルよりタンパク質の回収を行う。Western blotting および EMSA 法を用いて、担癌ヌードマウス腫瘍細胞における NF- $\kappa$ B の発現、アポトーシス関連遺伝子産物（Caspase-8、-9、-3、Apaf-1 および cytochrome c）の発現、アポトーシス抑制遺伝子産物（Survivin、c-IAP1、c-IAP2、XIAP および Bcl-2）の発現の評価を行う。

#### (4)検討事項

各項目につき、コントロール群、ドセタキセル単独群、 $\gamma$ -トコトリエノール単独群およびドセタキセル、 $\gamma$ -トコトリエノール併用群間において Mann-Whitney U test による統計学的検討を行う。

#### 4. 研究成果

##### (1)口腔扁平上皮癌移植ヌードマウス腫瘍の増殖に及ぼす影響

ドセタキセル 10mg/kg、 $\gamma$ -トコトリエノール 30mg/kg においては、コントロールと比べて有意な腫瘍の増殖抑制は認められなかった。単独では腫瘍の増殖抑制が認められない濃度のドセタキセルと  $\gamma$ -トコトリエノールを併用したところ、著明な腫瘍の増殖抑制が認められた(図1)。

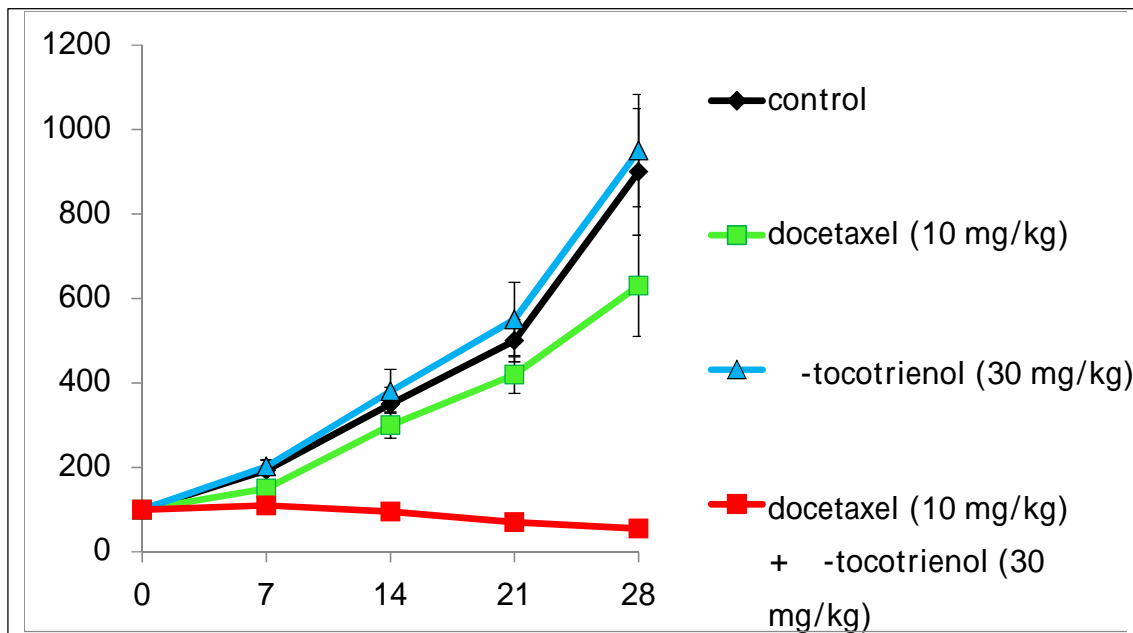


図1 マウス移植腫瘍の増殖に対するドセタキセル、 $\gamma$ -トコトリエノール併用療法の影響

##### (2)マウス移植腫瘍の NF- $\kappa$ B p65 発現

マウスを屠殺後、腫瘍を摘出し、腫瘍組織より蛋白の抽出を行った。NF- $\kappa$ B p65 の発現に及ぼす影響につき、Western blotting を用いて検索を行った。

その結果、ドセタキセル 10mg/kg および  $\gamma$ -トコトリエノール 30mg/kg においては、核内 NF- $\kappa$ B p65 タンパクの発現にほとんど変化は認められなかった。一方、ドセタキセルと  $\gamma$ -トコトリエノールの併用群においては、NF- $\kappa$ B p65 タンパクの著しい発現低下が認められた。

##### (3)TUNEL 法を用いたアポトーシス細胞の検出

アポトーシス細胞の検出のため、TUNEL 法を用いて組織切片を染色した。

その結果、コントロール群においてはアポトーシス細胞の出現はほとんど認められなかった。一方、ドセタキセル群および  $\gamma$ -トコトリエノール群においては、わずかにアポトーシス細胞の出現が認められ、さらにドセタキセルと  $\gamma$ -トコトリエノールの併用群においては、著明なアポトーシス細胞の誘導が観察された。

##### (4)組織切片の免疫組織学的染色による評価

ドセタキセルと  $\gamma$ -トコトリエノール併用によって NF- $\kappa$ B 活性化を抑制し、アポトーシスに至る経路において、途中どのような因子が影響を受けているか、研究代表者はアポトーシス抑制因子である Survivin および XIAP に着目し、これらの発現につき、免疫組織学的染色により検索を行った。

その結果、Survivin の発現に関しては、コントロール群、ドセタキセル群および  $\gamma$ -トコトリエノール群において、高発現が認められた。一方、ドセタキセル、 $\gamma$ -トコトリエノールの併用群においては、Survivin 発現の抑制が認められた。

次に XIAP の発現に関しては、コントロール群、 $\gamma$ -トコトリエノール群においては高発現が認められた。一方、ドセタキセル群においては、軽度の発現抑制が認められ、さらにドセタキセル、 $\gamma$ -トコトリエノールの併用群においては、XIAP の発現抑制が認められた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 可児耕一、桃田幸弘、青田桂子、東 雅之	4. 巻 2
2. 論文標題 口腔扁平上皮癌に対するNF- Bを分子標的とした新規併用癌化学療法の開発	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BIO Clinica	6. 最初と最後の頁 74-79
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 可児耕一、桃田幸弘、高野栄之、青田桂子、東 雅之
2. 発表標題 ocetaxel、 -tocotrienol時間差投与による口腔扁平上皮癌細胞株に対する抗腫瘍効果の検討
3. 学会等名 第20回 中国四国口腔癌研究会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 可児耕一、桃田幸弘、高野栄之、青田桂子、東 雅之
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌細胞株に対する docetaxelおよび -tocotrienolの時間差投与による抗腫瘍効果の検討
3. 学会等名 第63回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 可児耕一、桃田幸弘、高野栄之、青田桂子、山ノ井朋子、松本文博、東 雅之
2. 発表標題 口腔癌移植ヌードマウス腫瘍に対するdocetaxel・ -tocotrienol併用療法による抗腫瘍効果の検討
3. 学会等名 第13回中国四国口腔癌研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 可児耕一、桃田幸弘、高野栄之、青田桂子、山ノ井朋子、東 雅之
2. 発表標題 docetaxel・ -tocotrienol併用療法による口腔癌移植ヌードマウス腫瘍への抗腫瘍効果の検討
3. 学会等名 第54回日本口腔組織培養学会 学術大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 可児 耕一・桃田 幸弘・青田 桂子・東 雅之	4. 発行年 2018年
2. 出版社 北隆館	5. 総ページ数 100
3. 書名 アグリバイオ	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------