

平成 21 年 5 月 27 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19592338  
 研究課題名（和文）VEGF に対する分子標的薬とプロテアソーム阻害剤を用いた口腔癌の新規治療法の開発  
 研究課題名（英文）Development of new therapy using molecular target drug for VEGF and proteasome inhibitor against oral cancer  
 研究代表者  
 玉谷 哲也 (TAMATANI TETSUYA)  
 徳島大学・医学部・歯学部附属病院・講師  
 研究者番号：30274236

## 研究成果の概要：

本研究は当教室において樹立した口腔扁平上皮癌細胞(BHY、B88、HNt細胞)を用いた。口腔癌細胞の増殖過程におけるVEGFの役割を明らかにし、プロテアソーム阻害剤bortezomibとVEGFに対する分子標的治療法を開発することを目的とした。VEGFファミリーの中で、血管新生を促進するVEGF-Aとリンパ管新生因子であるVEGF-CとIL-8 mRNAの発現を定量した。VEGF-A、VEGF-C、IL-8 mRNAの発現はすべての癌細胞に認められ、bortezomibはその発現を抑制した。さらに、放射線照射で誘導された発現も抑制する傾向にあった。ELISA法を用いたVEGF-AとIL-8蛋白の発現も同様の結果を示した。B88細胞をヌードマウスの背部皮下(1×10<sup>6</sup>個細胞)に移植し、bortezomib(0.1 mg/kg)の静脈内投与による経時的な腫瘍体積を測定した結果、bortezomib投与によって腫瘍体積と腫瘍内血管密度は有意に抑制された。さらに、放射線照射によってVEGF-AとIL-8蛋白の発現は誘導されたが、bortezomib投与は腫瘍内においてそれらの蛋白発現を有意に抑制し、腫瘍増殖も抑制した。すなわち、口腔癌細胞に対して、bortezomibはVEGF-A、IL-8蛋白の発現抑制を介し、腫瘍増殖を抑制する可能性が示唆できた。さらに、口腔癌に対するVEGFの阻害剤はbortezomibとの併用することによって、相乗的な腫瘍増殖抑制効果が期待できた。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系歯学

キーワード：分子標的薬、口腔癌、VEGF、プロテアソーム阻害剤

## 1. 研究開始当初の背景

口腔癌の進展・浸潤・転移に関わる分子メカニズムを明らかにすると同時に、そのメカニズムに基づいた治療効果を発揮する分子標的薬の開発が必要であると考えられる。一方、放射線照射或いは抗癌剤処理時に口腔癌細胞では、生存シグナルであるAkt及びNF- $\kappa$ Bのシグナルが活性化され、抗アポトーシス遺伝子群、増殖関連遺伝子群、浸潤・転移関連遺伝子群、血管新生因子遺伝子群が誘導される。つまり、NF- $\kappa$ Bの活性化は癌治療の抵抗因子として作用すると考えられる。NF- $\kappa$ Bの転写活性の誘導は抗アポトーシス蛋白であるTNF receptor-associated factor (TRAF)-1、-2, cellular inhibitor of apoptosis protein (cIAP)-1、-2, FLICE inhibitory protein (cFLIP) 等の発現及びInterleukin (IL)-1 $\alpha$ 、-6、-8, Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Matrix Metalloproteinase (MMP)-9, urokinase-type plasminogen activator (uPA)などの腫瘍の血管新生、増殖、浸潤に寄与する多くのサイトカインやプロテアーゼの産生を誘導する。また、Aktの活性化によりNF- $\kappa$ B, p21, MDM-2, BADなどが誘導され、生存シグナルとしての機能を果たしている。すでに我々は1) 口腔扁平上皮癌細胞において正常細胞に比較し、NF- $\kappa$ B活性が著明に上昇していること (Cancer Lett, 171: 165-171, 2001)、2) NF- $\kappa$ B活性を抑制する変異型I $\kappa$ B $\alpha$  cDNAを口腔癌細胞に導入することにより、上記のサイトカインの産生を抑制し、抗癌剤、放射線に対する感受性の増強を誘導することを明らかにした (Int. J. Cancer, 108: 912-921, 2004)。一方、慢性骨髄性白血病のBcr-Ablに対するAblキナーゼの阻害剤であるイマチニブ、乳癌のc-ErbB2/HER2に対するハーセプチン、肺癌のEGF受容体の阻害剤であるイレッサが

特定の癌の分子標的薬として優れた効果を発揮している。口腔癌においても抗癌剤・放射線療法は癌細胞にアポトーシスを誘導する反面、生存シグナルであるNF- $\kappa$ Bを活性化すること、癌細胞においては高いNF- $\kappa$ B活性を有することから、NF- $\kappa$ Bを口腔癌治療の分子標的の一つであると考え、NF- $\kappa$ B阻害剤の一つであるプロテアソーム阻害剤を用いた治療法を確立することは非常に意義深いものであると考えられる。プロテアソーム阻害剤である

bortezomib (PS-341, Velcade<sup>®</sup>)は2003年、アメリカFDAにより多発性骨髄腫に認可され、特筆すべき優れた治療成績が報告される一方で、他の固形癌においても現在臨床試験が進行中の分子標的薬である。Bortezomibは *in vitro*及び*in vivo*において口腔癌細胞のNF- $\kappa$ Bの抑制を介し、細胞及び腫瘍増殖抑制効果を認めた。また、bortezomibは放射線によって誘導されるcIAP-1、-2の発現も抑制した(第97回全米癌学会、第65回日本癌学会で発表)。また、アメリカでは頭頸部癌患者を対象に放射線とbortezomibとの併用療法により、線量、薬剤の投与量、副作用が検討され、一部であるが劇的な治療効果も報告され(Int J Radiation Oncology Biol, Phys, 63: 1400-12, 2005)、今後、日本においてもbortezomibが口腔癌領域で認可される可能性は十分に考えられる。また、原発巣が比較的早期の段階にリンパ節転移を起こすことと悪性度の高い癌では腫瘍内血管密度が豊富であることが口腔癌の特徴であり、腫瘍の増殖と遠隔転移に関して重要な役割を担っているVEGFはこれらの現象を誘導する最も重要な因子の一つである。さらに、VEGFの発現増強と口腔癌の5年生存率の低下と予後の悪化との関連性も報告されている(Int J Oral Maxillo fac Surg, 34: 559-65, 2005)。VEGFには5

つのVEGF-A, -B, -C, -D, -Eが存在し、口腔癌細胞においてもVEGFは発現の上昇が認められ、血管新生作用、リンパ管新生作用を促進していることから、口腔癌の治療の標的としても有効であると考えられている。VEGFを標的としたVEGF阻害薬或いは抗VEGF抗体

(Bevacizumab)では主に転移性結腸、直腸癌で臨床応用されている(J. Clin Oncol, 23:3515, 2005)。一方、大腸癌細胞において *in vivo*の実験系でVEGFを抑制することにより、代償経路が活性化し、NF- $\kappa$ B経路を介したIL-8の発現誘導により腫瘍血管新生反応を温存できることから、VEGFを抑制する戦略ではNF- $\kappa$ B経路の抑制を介しIL-8を同時に標的にした方がより効果的であると報告されている(Nature Med, 11. 992-97, 2005)。BortezomibはNF- $\kappa$ B経路を介しIL-8の産生を強く抑制することより、抗VEGF抗体と併用することは相乗的な効果が期待できる。

## 2. 研究の目的

本研究の目的はbortezomibと抗VEGF抗体を用いた口腔癌の治療法開発のための基礎的研究を行うことである。

(1) 口腔癌細胞のVEGF蛋白とVEGF-A, -B, -C, -D, -E mRNAの発現及びbortezomib処理時のVEGFの発現につき検索を行う。

(2) 口腔癌細胞をヌードマウス背部皮下、咬筋内或いは舌に移植し、VEGF抗体とbortezomib、放射線との併用治療を行い、腫瘍増殖能、腫瘍内血管密度、リンパ管密度、リンパ節転移の有無、血清中のVEGF、IL-6、IL-8蛋白の測定を行い、治療効果の判定を行う。以上より、bortezomibと抗VEGF抗体を用いた口腔癌の治療法開発のための基礎的研究を行う。

## 3. 研究の方法

当教室において樹立した口腔扁平上皮癌細胞であるBHY、B88、HNt細胞とSCC9細胞を用いて *in vitro*の研究を行う。

(1) 口腔癌細胞のVEGF-A, B, C, D, Eの発

現様式とbortezomibによる抑制効果の検討。

(2) 口腔癌細胞は正常口腔上皮細胞に比較し、NF- $\kappa$ B活性が亢進していることはすでに明らかにしている。また、口腔癌細胞をbortezomibで処理時、NF- $\kappa$ B活性は濃度依存的に抑制され、アポトーシスを誘導することにより細胞増殖及び腫瘍増殖抑制効果を示すことを明らかにしている(第97回全米癌学会(abstract#4426)、第65回日本癌学会(abstract#1143))。BHY、B88、HNtとSCC9細胞のVEGF蛋白の発現をELISA法(VEGF ELISA Kit、R&D systems)にて検索し、VEGF-A, -B, -C, -D, -E mRNAの発現をreal-time RT-PCR法を用いて定量する。RNAの抽出はTRIzolを用いて、real-time PCR法のprimerはVEGF-A, -B, -C, -D, -E (Applied Biosystems)を用いて行い、GAPDHの発現を用いて標準化し比較検討する。口腔癌細胞をbortezomib (0, 5, 10 nM)で処理後、6, 12, 24時間後にRNAを回収、cDNA合成を行い、VEGF-A, -B, -C, -D, -E mRNAの発現を定量する。また、bortezomib (0, 5, 10 nM)処理72時間後に培養上清を回収し、VEGF蛋白とIL-8の定量を行い、bortezomibがVEGFとIL-8の発現に及ぼす効果について検討する。

(2) ヌードマウスでの腫瘍増殖能に及ぼすbortezomibと放射線と併用効果とVEGFの発現。

担癌ヌードマウスの腫瘍径が3から4mmになった時点からbortezomib (0.15 mg/kg, 0.3 mg/kg, 2回/週, iv)投与或るいは放射線照射(1.5 Gy/日, 2回/週)を3週間行い、移植後6週間後までに腫瘍体積の測定、リンパ節転移の有無、生存期間、腫瘍内血管密度、リンパ管密度の比較検討を行い、bortezomibとVEGF-A, Cの抑制効果についてsynergeticな効果が発現されるか検討する。Bortezomibの効果判定のため、腫瘍内、血清中のIL-8と

IL-6 蛋白の発現を ELISA 法で測定する。Bortezomib はすでに Millennium Pharmaceuticals, Inc より入手している。

(3)担癌ヌードマウスにおける抗 VEGF 抗体と bortezomib と放射線照射の併用効果。

造腫瘍性口腔扁平上皮癌細胞株を5週令 BALB/c雌ヌードマウスの背部皮下 ( $5 \times 10^6$  個細胞) 或いは  $1 \times 10^5$  個細胞を咬筋内或いは舌に移植し、一週間後からI群(未投与)、II群(抗VEGF抗体 5 mg/kg、1回/週、iv)、III群(bortezomib 0.3 mg/kg、2回/週、iv)、IV群(抗VEGF抗体 5 mg/kg、1回/週、bortezomib 0.3 mg/kg、2回/週、iv)、V群(放射線照射 1.5 Gy/日、3回/週)、VI群(抗VEGF抗体 5 mg/kg、1回/週、iv、放射線照射 1.5 Gy/日、3回/週)、VII群(bortezomib 0.3 mg/kg、2回/週、iv、放射線照射 1.5 Gy/日、3回/週)、VIII群(抗 VEGF 抗体 5 mg/kg、1回/週、bortezomib 0.3 mg/kg、2回/週、iv、放射線照射 1.5 Gy/日)を4週間行う。経時的な腫瘍体積の測定し、VEGF抗体とbortezomibと放射線治療にsynergeticな治療効果が期待できるか検討する。

#### 4. 研究成果

(1)Bortezomib は *in vitro* と *in vivo* において口腔癌細胞の腫瘍増殖を濃度依存的に抑制した。

(2)VEGF ファミリーの中で、血管新生を促進する VEGF-A とリンパ管新生因子である VEGF-C と IL-8 mRNA の発現を real-time RT-PCR 法を用いて定量した。VEGF-A、VEGF-C、IL-8 mRNA の発現はすべての癌細胞(BHY、B88、Hnt)において認められた。Bortezomib で処理すると、それらの遺伝子の発現は有意に抑制された。さらに、放射線照射で誘導された VEGF-A、VEGF-C、及びIL-8の発現も抑制する傾向にあった。

(3)造腫瘍性がある B88 細胞を5週令 BALB/c 雌ヌードマウスの背部皮下 ( $1 \times 10^6$  個細胞)に移植

し、bortezomib(0.1 mg/kg)の静脈内投与による経時的な腫瘍体積を測定した結果、bortezomib 投与によって腫瘍体積と腫瘍内血管密度は有意に抑制された(図1)。さらに、放射線照射によって VEGF-A と IL-8、IL-6 蛋白の腫瘍内の発現は増強したが、bortezomib 投与はそれらの発現を有意に抑制し、血管新生と腫瘍増殖も抑制した(図2)。

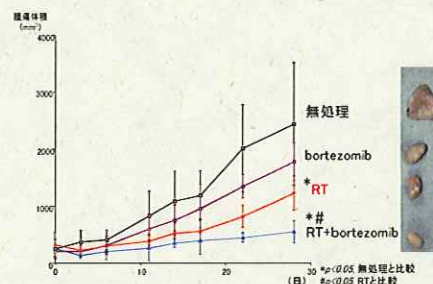


図1. 担癌ヌードマウスに対する放射線とbortezomibの併用効果

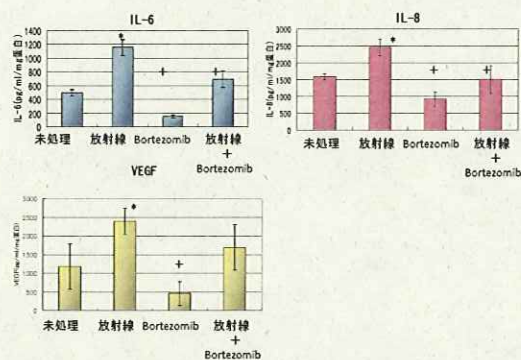


図2. 腫瘍内のIL-6、IL-8、VEGF蛋白発現に及ぼす放射線、bortezomibの影響

すなわち、口腔癌細胞に対して、bortezomib は VEGF-A、IL-8 蛋白の発現抑制を介し、腫瘍増殖を抑制する可能性が示唆された。

(4)口腔癌に対する VEGF 阻害剤、bortezomib、放射線療法を併用することによって、相乗的な腫瘍増殖抑制効果が期待できた。

#### 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3件)

① Tetsuya Tamatani, Masayuki Azuma,

Katsumi Motegi, Natsumi Takamaru, Daisuke Uchida, Youji Miyamoto, Proteasome inhibitor enhances radiosensitization in human oral squamous carcinoma cells via suppressing the radiation-induced expression of antiapoptotic proteins and cytokines. Am Assoc Cancer Res Annu Meet Proc. 49, 98, 2008. (査読有)

- ② Katsumi Motegi, Tetsuya Tamatani, Natsumi Takamaru, Masayuki Azuma, Cepharanthin enhanced irradiation sensitivity through the inhibition of NF- $\kappa$ B induced anti-apoptotic agents in human oral cancer cells. Am Assoc Cancer Res Annu Meet Proc, 47, 1214, 2007. (査読有)
- ③ Tetsuya Tamatani, Masayuki Azuma, Katsumi Motegi, Natsumi Takamaru, Yuichiro Kawashima, Takashi Bando. Cepharanthin-enhanced radiosensitivity through the inhibition of radiation-induced nuclear factor- $\kappa$ B activity in human oral squamous cell carcinoma cells. International Journal of Oncology, 31, 761-768, 2007. (査読有)

[学会発表] (計7件)

- ① 高丸菜都美、東 雅之、玉谷哲也、茂木勝美、佐々井明子、尾上富太郎、大江 剛、内田大亮、永井宏和、宮本洋二. プロテアソーム阻害剤による口腔癌細胞の放射線治療効果増強のメカニズム. 第27回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会, 2009. 1. 30
- ② 尾上富太郎、内田大亮、栗林伸行、大江剛、玉谷哲也、宮本洋二. 口腔扁平上皮

癌の転移における metabotropic glutamate receptor 5 の役割. 第67回日本癌学会学術総会, 2008. 10. 29

- ③ 高丸菜都美、東 雅之、玉谷哲也、茂木勝美、内田大亮、大江 剛、吉田敏彦、宮本洋二. 口腔癌細胞に対するプロテアソーム阻害剤 bortezomib の抗腫瘍効果. 第66回日本癌学会学術総会, 2007. 10. 5
- ④ 板東高志、原田耕志、玉谷哲也、内田大亮、茂木勝美、大江 剛、東 雅之、宮本洋二. Establishment of BDNF-TrkB paracrine system by two clonal cells derived from a human oral squamous cell carcinoma. 第66回日本癌学会学術総会, 2007. 10. 3
- ⑤ 内田大亮、尾上富太郎、富塚佳史、栗林伸行、多田 雅、大江 剛、玉谷哲也、原田耕志、板東高志、東 雅之、宮本洋二. CXCR4 特異的アンタゴニストである AMD3100 は口腔扁平上皮癌のリンパ節転移と遠隔転移を抑制する. 第66回日本癌学会学術総会, 2007. 10. 3
- ⑥ 玉谷哲也、高丸菜都美、茂木勝美、東 雅之、宮本洋二. プロテアソーム阻害剤 bortezomib の口腔扁平上皮癌に対する抗腫瘍効果機構の解析. 第52回(社)日本口腔外科学会総会, 2007. 9. 29.
- ⑦ 高丸菜都美、東 雅之、玉谷哲也、茂木勝美、宮本洋二. 口腔癌細胞に対するプロテアソーム阻害剤 bortezomib の抗腫瘍効果第31回(社)日本頭頸部癌学会, 2007. 6. 14.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

玉谷 哲也 (TAMATANI TETSUYA)

徳島大学・医学部・歯学部附属病院・講師  
研究者番号: 30274236

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

該当なし