

平成 22 年 5 月 14 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20791489  
 研究課題名 (和文) COX-2 阻害剤による口腔扁平上皮癌の抗癌剤および放射線感受性増強の機構  
 研究課題名 (英文) The mechanism of the enhanced sensitivity of anticancer drug and radioactive ray by the cox-2 inhibitor in oral squamous cell carcinoma  
 研究代表者  
 谷口 貴洋 (TANIGUCHI TAKAHIRO)  
 東北大学・大学院歯学研究科・大学院非常勤講師  
 研究者番号：40444012

## 研究成果の概要 (和文)：

シクロオキシゲナーゼ(COX)は、炎症組織において発現が誘導されることが知られているが、近年、腫瘍形成においても重要な役割を果たしている可能性が示唆され、COX-2 は多くの悪性腫瘍で高発現が認められている。本研究では、選択的 COX-2 阻害剤の併用により、ヒト口腔扁平上皮癌細胞株に対する抗癌剤および放射線の抗癌作用が増強される傾向が認められた。この結果は、選択的 COX-2 阻害剤が口腔癌の治療効果の向上に寄与する可能性があることを示している。

## 研究成果の概要 (英文)：

It's noted that expression of cyclooxygenase(COX) is induced in the inflammatory tissue, on the other hand, it is suggested that COX plays a significant role in oncogenesis during recent years, and high expression of COX-2 is induced in a number of the malignant neoplasm. In this study, the COX-2 selective inhibitor had tended to enhance the effect of anticancer drug and radiation against the human oral squamous carcinoma cell line. These results indicate that the COX-2 selective inhibitor may contribute to improving effect of oral cancer therapy.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：臨床腫瘍学

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 口腔扁平上皮癌の治療と問題点

現在、当教室にて口腔扁平上皮癌に対しては、手術療法を基本とし、症例に応じて抗癌剤による術前化学療法、放射線療法の併用により治療が行われている。術前化学療法は腫瘍縮小や微小転移の消滅を目的に行われているが、この術前化学療法において二つの大きな問題が挙げられる。

①第一に癌細胞の抗癌剤抵抗性である。実際、当科における治療においても、患者個々で化学療法の効果に差異が生じており、完全な癌の消失をみる症例もあれば、ほとんど変化がみられない症例もある。

②第二の問題は抗癌剤の毒性である。化学療法により重篤な副作用が生じ、手術可能な全身状態に回復するまでの間に癌が再び増殖してしまう症例を経験している。

また、これら二つの問題は相反するもので、より多量の抗癌剤を投与すれば、癌に対する高い効果が期待されると同時に毒性が高まることが予想され、逆に少量の抗癌剤を投与すれば、毒性は低い、併せて癌に対する効果もそれほど期待できない。

他方、放射線治療に関しては耐容線量があるので、癌の再発時に十分な量の放射線照射ができない可能性があること、また、耐容線量以下であっても骨髄抑制や口内炎などの副作用が問題点として挙げられる。

そのような中、癌細胞に特異的な受容体や遺伝子発現等を標的にした抗癌剤として、分子標的治療薬があるが、従来の抗癌剤と同等、あるいはそれ以上の効果を得ながら、比較的副作用が少ないため、期待が高まっている。

### (2) COX-2 の癌細胞における機能

シクロオキシゲナーゼ(cyclooxygenase: COX)は、プロスタグランジン(PG)合成系における限速酵素である。COXには恒常的に発現している COX-1 と増殖因子やサイトカイン刺激で発現が誘導される COX-2 の2つのアイソザイムが現在同定されている。COXを標的分子とした薬剤に非ステロイド系消炎鎮痛薬(non-steroidal anti-inflammatory drugs: NSAIDs)がある。

1991年の大規模な疫学的調査報告によりアスピリンを継続的に内服することで大腸癌死の危険率を40%減少させることが明らかとなり(Thun M.J. et al. N Engl J Med 1991;325:1593-1596.)、NSAIDsの大腸癌発生過程における予防効果が強く示唆された。その後、種々のNSAIDsで大腸癌発生抑制作

用がみられることが明らかになった(Kudo T, et al 1980;71:260-264.)。これらNSAIDsの抗腫瘍効果よりCOXおよびPGが腫瘍形成において重要な役割を果たしている可能性が示唆され、種々の腫瘍におけるCOX発現が検討されてきた。COX-2は頭頸部癌(Chan G, et al. Cancer Res 1999;59:991-994.)、乳癌(Half E, et al. Cancer Res 2002;62:1676-1681.)、肺癌(Hida T, et al. Cancer Res 1998;58:3761-3764.)、胃癌(Ristimaki A, et al. Cancer Res 1997;57:1276-1280.)、膵臓癌(Tucker ON, et al. Cancer Res 1999;59:987-990.)、直腸癌(Masunaga R, et al. Clin Cancer Res 2000;6:4064-4068.)、卵巣癌(Ferrandina G, et al. Ann Oncol 2002;13:1205-1211.)を含めた多くの悪性腫瘍において病理組織学的に高発現が認められることが報告されている。

その後の研究にてCOX-2は癌細胞において以下のような多様な機能を持っていることが示唆されている。

①産生されたPGE<sub>2</sub>により上皮増殖因子レセプター(EGFR)やERK2活性化を誘導することで細胞増殖を促す作用(Buchanan FG, et al. J Biol Chem;2003:35451-35457)

②VEGFやTGF- $\beta$ などの血管新生因子の発現を促す作用(Tsujii M, et al. Cell 1998;93:705-716.)

③細胞外マトリックスを分解するMMP-2の活性化を促したり(Kwak YE, et al. Ann N Y Acad Sci 2007;1095:99-112.)、細胞間接着分子のE-カドヘリンを減少させたり(Zhou Y, et al. Cancer Biol Ther 2007;6(2):269-275.)して癌の浸潤能を高める作用

④抗アポトーシス蛋白であるBcl-2の発現を促す作用(Kem MA, et al. Cancer Res;66(14):7059-7066.)

また、口腔癌においては、COX-2高発現は再発率と正の相関があり(Itoh S, et al. Oral Oncol 2003;39:829-835.)、生存率の低下と負の相関がある(Pannone G, et al. Int J Immunopathol Pharmacol 2007;20(2):317-324.)との報告がある。また、COX-2過剰発現と放射線抵抗性に正の相関関係がある(Terakado N, et al. Oral Oncol 2004;40:383-389.)ことが報告されている。

他方、化学療法および放射線療法後の口腔粘膜にCOX-2の過剰発現がみられ、口内炎の程度との相関があることが示唆された(Sonis S, et al. Oral Oncol 2004;40:170-176.,

Logan R, et al. 2007;43:395-401.)。

しかし、COX-2 過剰発現による、化学療法および放射線療法に対する抵抗性のメカニズムについては未だ不明な点が多い。

## 2. 研究の目的

本研究では、上記の背景から、口腔扁平上皮癌に対する、化学療法、放射線療法および放射線化学療法による COX-2 の発現変化を検索する。さらに、選択的 COX-2 阻害剤を用いて、COX-2 の発現を阻害した際のアポトーシス誘導効果の増強の有無を検索し、選択的 COX-2 阻害剤が分子標的治療薬として癌治療に有用かどうか検討する。

## 3. 研究の方法

ヒト口腔扁平上皮癌細胞株における化学療法、放射線療法および放射線化学療法前後の COX-2 発現の変化を検索する。次いで、選択的 COX-2 阻害剤によるアポトーシス誘導の相乗効果の有無を検討する。具体的には以下の通りである。

(1) ヒト口腔扁平上皮癌細胞株における抗癌剤と放射線照射のそれぞれの単独刺激、および両者の併用刺激による感受性および刺激前後の COX-2 発現の変化

①ヒト口腔扁平上皮癌細胞株(HSC-3)に対して各種抗癌剤(シスプラチン、タキソテル)、放射線照射のそれぞれの単独刺激、および両者の併用刺激を行い、TUNEL 法、AnnexinV 等を用い、フローサイトメトリーにてアポトーシスを検索する。

②上記の刺激前後における COX-2 の発現の変化に関して、ウエスタンブロット法を用いて蛋白を、PCR 法を用いて mRNA を検索する。

(2) ヒト口腔扁平上皮癌細胞株における、選択的 COX-2 阻害剤による抗癌剤と放射線照射のそれぞれ単独刺激、および両者併用による感受性の変化

①ヒト口腔扁平上皮癌細胞株(HSC-3)に対して、選択的 COX-2 阻害剤(NS-398)で刺激することで、COX-2 蛋白および mRNA 発現が抑制されることをウエスタンブロット法および PCR 法により確認する。

②ヒト口腔扁平上皮癌細胞株(HSC-3)を用

いて、選択的 COX-2 阻害剤(NS-398)で刺激後、抗癌剤刺激、放射線照射および両者併用刺激により、COX-2 の発現が抑制されていることをウエスタンブロット法により蛋白を、PCR 法により mRNA を検索することで確認する。

③ヒト口腔扁平上皮癌細胞株(HSC-3)を用いて、選択的 COX-2 阻害剤(NS-398)にて COX-2 の発現を抑制したときの抗癌剤刺激、放射線照射および両者併用刺激によるアポトーシスの増強効果を TUNEL 法、AnnexinV 等を用い、フローサイトメトリーで検索する。

## 4. 研究成果

(1) ヒト口腔扁平上皮癌細胞株における抗癌剤と放射線照射のそれぞれの単独刺激、および両者の併用刺激による感受性および刺激前後の COX-2 発現の変化

①ヒト口腔扁平上皮癌細胞株(HSC-3)に対して各種抗癌剤(シスプラチン、タキソテル)、放射線照射のそれぞれの単独刺激によりアポトーシスが誘導された。

②ヒト口腔扁平上皮癌細胞株(HSC-3)に対して抗癌剤および放射線照射にて COX-2 mRNA および蛋白の発現が上昇する傾向が認められた。

また、抗癌剤と放射線照射の併用刺激でも、単独刺激時と同様に、アポトーシスの誘導と COX-2 mRNA および蛋白の発現が上昇する傾向が認められた。

(2) ヒト口腔扁平上皮癌細胞株における、選択的 COX-2 阻害剤による抗癌剤と放射線照射のそれぞれ単独刺激、および両者併用による感受性の変化

①ヒト口腔扁平上皮癌細胞株(HSC-3)に対して、選択的 COX-2 阻害剤(NS-398)で刺激することで、COX-2 蛋白および mRNA 発現が抑制されることが確認された。

②ヒト口腔扁平上皮癌細胞株(HSC-3)に対して、選択的 COX-2 阻害剤(NS-398)で刺激後、抗癌剤刺激、放射線照射および両者併用刺激を行ったところ、COX-2 mRNA および蛋白の発現が抑制される傾向が認められた。

また、COX-2 の発現を抑制しないときと比較して、アポトーシス誘導効果が増強される傾向が観察された。

(3)以上の結果より、選択的 COX-2 阻害剤は、分子標的治療薬として、以下に示すような点で、口腔癌治療に有用である可能性がある。

①抗癌剤および放射線に抵抗性のある口腔癌症例において、選択的 COX-2 阻害剤により抵抗性が減弱される可能性がある。

②もともと抗癌剤および放射線に抵抗性が弱い口腔癌症例においては、選択的 COX-2 阻害剤により、さらに感受性が増強される可能性がある。

③選択的 COX-2 阻害剤の併用により、抗癌剤および放射線が、より少ない量で高い治療効果が見込める。それに付随して治療に伴う副作用が軽減される可能性がある。

①～③により、具体的には④以下のような効果が期待される。

④術前の抗癌剤および放射線療法では、選択的 COX-2 阻害剤の併用により、全身および所属リンパ節の微小転移への効果の増強が考えられる。また、原発巣においては、癌の縮小効果と併せて、副作用の軽減により、手術までの期間が短縮されることで、癌の再増殖が防止され、手術による癌の完全な切除がより確実になり、再発率が減少することが期待される。

⑤術後の抗癌剤および放射線療法では、選択的 COX-2 阻害剤の併用により、抗癌剤および放射線療法に抵抗性なことが多い原発巣および所属リンパ節に術後に残存した癌細胞における抵抗性の減弱効果が期待される。

⑥手術不能な患者に対しても、選択的 COX-2 阻害剤の併用により、抗癌剤および放射線療法での癌の完全緩解や癌の制御が可能となる可能性がある。

以上のように、選択的 COX-2 阻害剤の併用により、口腔癌治療による患者の負担の軽減および治療成績が向上することが期待され、選択的 COX-2 阻害剤の分子標的治療薬として有用である可能性があることが示唆された。

今後は、*in vitro* において、他の細胞株においても同様な実験を行うことに加え、選択的 COX-2 阻害剤がアポトーシス抑制因子 (Bcl-2, Survivin 等)、アポトーシス促進因子

(Bax 等)およびアポトーシス実行因子である Caspase の活性等に与える影響を検討することで、アポトーシス誘導の増強効果の機構を解明する。

その後、マウスを用いて、*in vivo* での口腔癌に対する抗癌剤治療、放射線治療の選択的 COX-2 阻害剤によるアポトーシス誘導の増強効果を検索し、選択的 COX-2 阻害剤が、分子標的治療薬として有用であるかどうかをさらに検討していく予定である。

## 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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

谷口 貴洋 (TANIGUCHI TAKAHIRO)  
東北大学・大学院歯学研究科・大学院非常勤講師  
研究者番号：40444012