

機関番号：14501  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2009～2010  
 課題番号：21791616  
 研究課題名（和文） COX2制限増殖型アデノウイルスベクターを用いた頭頸部癌に対する  
 遺伝子治療  
 研究課題名（英文） COX promoter-based replication-selective adenoviral vector  
 for head and neck cancer  
 研究代表者  
 中川 貴博 (TAKAHIRO NAKAGAWA)  
 神戸大学・大学院医学研究科・助教  
 研究者番号：60379386

## 研究成果の概要（和文）：

COX-2 阻害薬であるエトドラクの濃度に比例して、COX-2 を強発現している頭頸部癌（扁平上皮癌）において、有意に細胞増殖の抑制がみられた。エトドラクが頭頸部扁平上皮がんの治療や抑制に効果があると期待される。HPV の E6、E7 遺伝子をターゲットとした siRNA を作成し、HPV 陽性頭頸部癌に対する抗腫瘍効果を *in vitro* と *in vivo* とともに確認することができた。

## 研究成果の概要（英文）：

Significant growth inhibition effect of COX-2 on head and neck squamous cell carcinoma was observed in proportion to the concentration of COX-2. Significant growth inhibition effect of sjRNA against E6 and/or E7 gene of HPV on HPV-associated head and neck squamous cell carcinoma was observed not only *in vitro* but also *in vivo*.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：耳鼻咽喉科学

科研費の分科・細目：耳鼻咽喉科学

キーワード：COX-2 制限増殖型 アデノウイルスベクター 扁平上皮癌 腫瘍溶解性

## 1. 研究開始当初の背景

近年、腫瘍の増殖や転移の分子機構が解明されるに従い、これらに関わる遺伝子をターゲットとした抗体や阻害剤などの分子標的薬が意欲的に開発されている。頭頸部癌においても例外ではなく、既にEGFRに対する抗体薬が欧米において標準治療の選択肢の一つとして認められつつある。しかし、EGFRやVEGFなどは正常な細胞においても発現しているため、今までの化学療法薬とは

異なった新たな副作用が次第と明らかとなり、腫瘍に特異的に作用する手法の登場が望まれている。

一方、これまで我々は頭頸部扁平上皮癌の腫瘍細胞において特異的に高発現しているCOX2をプロモータとした制限増殖型のアデノウイルスベクターによるoncolytic virus therapyによる治療法の開発を行ってきた。このアデノウイルスベクターにEGFRやVEGFに対するsiRNAを組み込むこと

により、正常組織に有害な副作用を与えることなく、標的腫瘍細胞のEGFRやVEGFの発現を押さえ込むことを狙った新たな治療法の開発を目的に本研究を計画した。

## 2. 研究の目的

1) プロスタグランジン産生に関与する COX-2 の発現は癌の増殖・浸潤能と深くかかわることが知られており、頭頸部扁平上皮癌においても高率に発現していることが報告されている。この COX-2 が腫瘍特異的に発現していることを利用し、制限増殖型アデノウイルスベクターによる遺伝子治療の可能性を検討した。

2) 頭頸部癌の腫瘍細胞特異的に発現している COX-2 は腫瘍の増殖に関与していると考えられている。COX-2 の発現が細胞の増殖に関わっている pathway をブロックすることにより、COX-2 阻害薬であるエトドラク of 抗腫瘍効果を、頭頸部扁平上皮癌下部を用いて *in vitro* での効果を検討した。

3) 近年、HPV ウイルスが中咽頭癌の発癌や増殖に深く関与していることが知られ、治療法選択や予後予測のバイオマーカーとして期待されている。HPV では E6 遺伝子の産物ががん抑制遺伝子 P53 蛋白と E7 遺伝子の産物が Rb 蛋白と結合して、これらの蛋白を変性させ癌抑制遺伝子の働きを阻害し、がんの増殖やアポトーシスの抑制につながっていることが解っている。そこでこれらの E6 や E7 遺伝子を微小 RNA による遺伝子干渉を用いて抑制することによる治療法の可能性を検討した。

## 3. 研究の方法

1) COX-2 が高発現している頭頸部扁平上皮癌株 H891 を培養し、24 時間後に異なる濃度のエトドラクを投与し、2 日目、4 日目、6 日目の細胞数を cell counting Kit-8 を用いて測定した。また抗腫瘍効果のメカニズムを調べるために、TGF $\beta$ 1、IL-6、IL-8 の培養上清濃度も測定した。

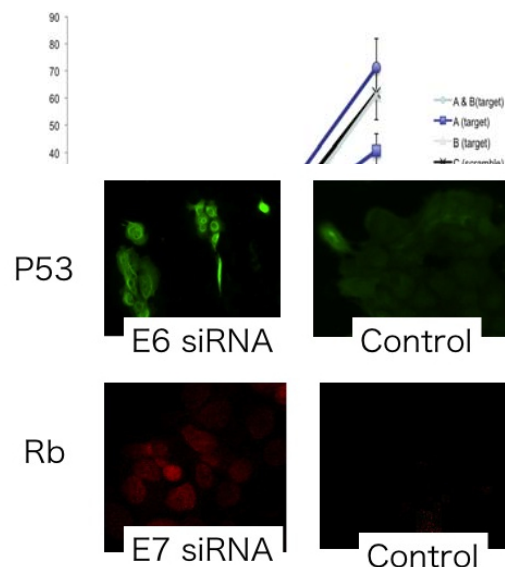
2) 制限増殖型アデノウイルスベクターを用いた実験に対して「遺伝子組換え生物等の第二種使用等をする間に執る拡散防止措置の確認」について、文部科学大臣に承認を得ることができ、アデノウイルスベクターに組み込むための siRNA の配列を決定するために、EGFR と VEGF に対して遺伝子発現の抑制効果が確認されている既知の EGFR と VEGF の siRNA 配列を数種類ずつ候補として選び出し、発現ベクターに組み込んだ。現在、培養細胞を用いて、その発現と効果を確認しているところである。

3) HPV の E6、E7 遺伝子をターゲットとした siRNA を作成し、HPV 陽性頭頸部癌に対する抗腫瘍効果を *in vitro* と *in vivo* で検討した。

## 4. 研究成果

1) COX-2 阻害薬であるエトドラクの濃度に比例して、COX-2 を強発現している頭頸部癌（扁平上皮癌）において、有意に細胞増殖の抑制がみられた。また TGF $\beta$ 1、IL-6、IL-8 ともに産生が抑制されていた。エトドラクが頭頸部扁平上皮がんの治療や抑制に効果があると期待される。

2) HPV の E6、E7 遺伝子をターゲットとした siRNA の、HPV 陽性頭頸部癌に対する抗腫瘍効果を *in vitro* と *in vivo* とともに確認することができた。



## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及には下線)  
[雑誌論文] (計 25 件)

### 英文

1: Sasaki R, Yasuda K, Abe E, Uchida N, Kawashima M, Uno T, Fujiwara M, Shioyama Y, Kagami Y, Shibamoto Y, Nakata K, Takada Y, Kawabe T, Uehara K, Nibu K, Yamada S.

Multi-institutional Analysis of Solitary Extramedullary Plasmacytoma of the Head and Neck Treated With Curative Radiotherapy. Int J Radiat Oncol Biol Phys.

2011 Jan 27. [Epub ahead of print]

2: Shibata T, Yamashita D, Hasegawa S, Saito M, Otsuki N, Hashikawa K, Tahara S, Nibu K. Oral candidiasis mimicking tongue cancer. *Auris Nasus Larynx*. 2011 38(3):418-20. Epub 2011 Jan 12.

3: Tahara M, Minami H, Hasegawa Y, Tomita K, Watanabe A, Nibu K, Fujii M, Onozawa Y, Kurono Y, Sagae D, Seriu T, Tsukuda M. Weekly paclitaxel in patients with recurrent or metastatic head and neck cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. [Epub ahead of print]

4: Nibu K, Ebihara Y, Ebihara M, Kawabata K, Onitsuka T, Fujii T, Saikawa M. Quality of life after neck dissection: a multicenter longitudinal study by the Japanese Clinical Study Group on Standardization of Treatment for Lymph Node Metastasis of Head and Neck Cancer. *Int J Clin Oncol*. 2010 15(1):33-8.

5: Katoh C, Saitoh M, Tsuneyuki M, Tanimoto H, Hashikawa K, Tahara S, Otsuki N, Nibu K. Blowing ratio as an evaluation tool for velopharyngeal function after oral and oropharyngeal cancer resection. *Head Neck*. 2010 32(8):1012-8.

6: Komaba H, Goto S, Fujii H, Hamada Y, Kobayashi A, Shibuya K, Tominaga Y, Otsuki N, Nibu K, Nakagawa K, Tsugawa N, Okano T, Kitazawa R, Fukagawa M, Kita T. Depressed expression of Klotho and FGF receptor 1 in hyperplastic parathyroid glands from uremic patients. *Kidney Int*. 2010 77(3):232-8.

#### 邦文

1. 常行美貴, 米澤宏一郎, 齋藤幹, 大月直樹, 丹生健一【耳鼻咽喉科・頭頸部外科の看護技術2011】 癌治療に対する看護 口腔・中咽頭癌 *JOHNS* 27巻3号 407-411 2011

2. 丹生健一 頭蓋底病変の取り扱い *日本耳鼻咽喉科学会会報* 114巻1号 40-43 2011

3. 丹生健一 わが国における頭頸部癌診療をどのように構築すべきか 頭頸部がん専門医制度に期待するもの *日本耳鼻咽喉科学会会報* 114巻1号 7-14 2011

4. 常行美貴, 前田達慶, 米澤宏一郎, 森本浩一, 谷本均, 齋藤幹, 大月直樹, 丹生健一 頭頸部癌患者における同時併用化学放射線療法後の口内炎と嚥下障害についての検討 *耳鼻と臨床* 56巻Suppl.2 S240-S245(2010.11)

5. 齋藤幹, 丹生健一【ここまで変わった頸部郭清術】 特殊領域の頸部リンパ節郭清 適応と手技 咽頭後リンパ節 *JOHNS* 27巻2号 205-208 2011

6. 森本浩一, 大月直樹, 土井清司, 齋藤幹, 丹生健一 眼瞼脂腺癌リンパ節転移に対する

治療法についての検討 耳鼻咽喉科・頭頸部外科 82巻12号 885-887 2010

7. 丹生健一 新しく立ち上がった頭頸部がん専門医制度をめぐって 頭頸部がん専門医制度の設立まで 頭頸部外科 20巻1号 9-12 2010

8. 丹生健一 頭頸部癌患者の機能評価 耳鼻咽喉科臨床 103巻6号 507-513 2010

9. 大月直樹, 齋藤幹, 丹生健一 Salvage Surgery(食道癌、喉頭・下咽頭癌) 下咽頭癌化学放射線治療後の救済手術 重複癌に対する手術を中心に 日本気管食道科学会会報 61巻2号 112-114 2010

10. 丹生健一, 鬼塚哲郎, 川端一嘉, 藤井隆, 浅井昌大, 林隆一, 宮崎眞和, 松浦一登, 吉積隆, 西畷渡, 菅澤正, 土井勝之, 岸本誠司, 朝蔭孝宏, 藤井正人, 甲能直幸, 古川まどか, 長谷川泰久, 北村守正, 門田伸也, 中谷宏章, 富田吉信, 中島格, 尾尻博也, 齊川雅久 頭頸部がんの頸部リンパ節転移に対する標準的手術法の確立に関する研究 頸部郭清術の後遺症調査 頭頸部癌 36巻1号 82-88 2010

11. 中川貴博, 丹生健一 耳鼻咽喉科診療におけるヒヤリ・ハット【診断過程におけるヒヤリ・ハット 頸部腫瘍 ENTONI 109号 Page20-25 2009

12. 丹生健一, 大月直樹, 齋藤幹, 長谷川信吾, 土井清司 耳鼻咽喉・頭頸部領域における最新の医療手技 頭頸部領域 日本耳鼻咽喉科学会会報 112巻11号 735-736, np1-np2, 737-738 2009

13. 手島直則, 谷本均, 齋藤幹, 大月直樹, 佐々木良平, 清田尚臣, 奥野晋哉, 丹生健一 中咽頭癌同時併用化学放射線療法における経皮内視鏡的胃瘻造設術の有用性 頭頸部癌 35巻3号 287-292 2009

14. 朝蔭孝宏, 岸本誠司, 齊川雅久, 林隆一, 川端一嘉, 林崎勝武, 土井勝之, 吉積隆, 丹生健一, 白根誠, 中谷弘章, 菅澤正, 浅井昌大, 長谷川泰久, 富田吉信, 鬼塚哲郎, 古川まどか, 甲能直幸, 門田伸也, 西畷渡, 西條茂, 松浦一登, 北村守正, 藤井隆, 中島格 頸部リンパ節手術 口腔癌N0症例について 舌癌T2N0症例の頸部リンパ節の取り扱いについて 耳鼻と臨床 55巻 Suppl.1 S45-S54 2009

15. 長谷川信吾, 丹生健一 【頭頸部腫瘍診療における論点 耳鼻口腔咽頭編】 聴器癌に対する治療法の選択は? 手術治療の立場から JOHNS 25巻10号 1467-1471 2009

16. 大月直樹, 齋藤幹, 中川貴博, 丹生健一 早期声門癌における放射線治療による制御不能例の検討 喉頭 21巻1号 16-20 2009

17. 佐々木良平, 吉田賢史, 鈴木陽子, 西村英輝, 岡本欣晃, 太田陽介, 出水祐介, 副島俊典, 齋藤幹, 大月直樹, 丹生健一, 杉村和朗 【放射線治療の治療効果向上と副作用軽減を目指して】 新しい放射線増感剤の基礎と臨床 放射線抵抗性の規定因子 NF-Kappa Bの関与とその克服 癌の臨床 55巻4号 239-244 2009

18. 大月直樹, 齋藤幹, 丹生健一 頭頸部癌治療における化学放射線療法の役割 喉頭癌

に対する化学放射線療法の役割 頭頸部外科

19巻1号 5-11 2009

〔学会発表〕(計2件)

①第110回日本耳鼻咽喉科学会学術講演会

シンポジウム(2)

頭頸部癌治療の新展開

-非外科的アプローチを中心に-

頭頸部癌に対する分指標的治療

丹生健一

②第33回日本頭頸部癌学会学術講演会

藤田 岳 大月直樹 丹生健一 COX-2 阻

害薬エトドラクの頭頸部扁平上皮癌細胞に

対する抗腫瘍効果

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/jibi/1.htm>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中川貴博 (TAKAHIRO NAKAGAWA)

神戸大学・医学研究科・助教

研究者番号：60379386

### (2) 研究協力者

丹生健一 (KEN-ICHI NIBU)

神戸大学・医学研究科・教授

研究者番号：20251283