

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 18 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24593007

研究課題名(和文) 口腔癌の顎骨浸潤抑制に対してmTOR・COX-2による新たな治療法の開発

研究課題名(英文) Research on new treatment against bone resorption by oral squamous cell carcinoma targeting mammalian target of rapamycin and cyclooxygenase-2.

研究代表者

藏口 潤 (KURAGUCHI, JUN)

東京医科大学・医学部・兼任助教

研究者番号：30424576

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：口腔癌の顎骨浸潤におけるcyclooxygenase-2 (COX-2)を介するシグナルによって調節される mammalian target of rapamycin (mTOR)の多彩な作用を解明し、新たな治療法の可能性について検討した。mTOR阻害薬は、RANKLによってmTOR活性化で起こるリン酸化を阻害することで、骨代謝を制御し、また、COX-2阻害剤は、RANKLに間接的に作用して破骨細胞数を減少させる。結果、破骨細胞関連サイトカインの解析が顎骨浸潤能の評価に有用であり、また、増強効果を期待したCOX-2阻害剤とmTOR阻害剤は、顎骨浸潤抑制の新たな治療法になりえると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The roles of mammalian target of rapamycin (mTOR) and cyclooxygenase-2 (COX-2) in bone destruction induced by oral squamous cell carcinoma (OSCC) are not well understood because of the lack of an established animal model of bone resorption by OSCC. An mTOR inhibitor might be effective in controlling bone metabolism by inhibiting the phosphorylation caused by receptor activator for nuclear factor- $\kappa$ B ligand (RANKL)-induced mTOR activation. Also, a COX-2 inhibitor decreases the number of osteoclasts indirectly via the RANKL signaling pathway.

We suggest that osteoclast-related cytokines play important roles in the bone invasion by OSCC cells. Our findings suggest that the new combination treatment utilizing the synergistic effects of an mTOR inhibitor and a COX-2 inhibitor against osteoclastic bone resorption in OSCC invasion.

研究分野：口腔外科

キーワード：口腔癌 顎骨浸潤 mTOR COX-2

## 1. 研究開始当初の背景

口腔癌は局所浸潤能が高く、なかでも歯肉癌は、その解剖学的特徴から早期に顎骨表面に進展する。口腔癌の顎骨浸潤は治療法の選択、手術範囲の決定、そして予後を左右する大きな要因となっている。また、顎骨浸潤による癌性疼痛は患者のQuality of Lifeを著しく低下させる。手術を選択した場合、顎骨の広範囲な切除は咀嚼機能が低下するばかりでなく、顔貌の変形、発音障害もきたし社会復帰を妨げる大きな要因になっている。従って、癌の顎骨浸潤、あるいは浸潤した癌細胞の骨内での増殖を制御することは臨床上極めて重要な課題である。

癌細胞の顎骨への浸潤、増殖は、破骨細胞性骨吸収に引き続いて起こることが知られている。すなわち、癌細胞が直接、骨を破壊し進展するのではなく、癌により誘発された破骨細胞が活発に骨吸収を起こし、骨吸収によって生じた部分に癌細胞が進展していく。これは骨に特異的な病態であり、骨に対する臓器特異的治療である破骨細胞性骨吸収阻害を中心とした新たな治療が癌の骨破壊や骨内での腫瘍増殖を抑制する可能性が示唆される。

骨代謝において重要な mediator である prostaglandin(PG)は constitutive enzyme の cyclooxygenase-1(COX-1)と cytokine や hormone などの刺激により誘導される inducible enzyme の COX-2 が存在する。COX-2 ノックアウトマウスを用いた in vitro および in vivo の実験系で parathyroid hormone (PTH)投与による骨代謝回転が COX-2 を介していることが証明されている。また COX-2 の過剰発現は、アポトーシス抵抗性の獲得、血管新生促進、宿主の免疫力低下に加え、癌の浸潤・転移に関与することが報告されている。特に COX-2 と癌浸潤の関係については、細胞外基質を分解し癌の浸潤・転移に関与することが知られている基質分解酵素 matrix metalloproteinase-2(MMP-2)や MMP-9 の発現

を選択的 COX-2 阻害剤が抑えることで癌の浸潤能を抑制するといわれ、また、COX-2 阻害剤は、破骨細胞数を減少させ、癌細胞のアポトーシスを誘導することで骨転移を抑制するともいわれている。近年、mammalian target of rapamycin(mTOR) は細胞増殖、アポトーシスや血管新生の他に骨破壊の主導的な役割を持つ破骨細胞の分化・成熟に促進的な影響を持つ事が報告されており、癌に誘発される骨破壊・骨浸潤に対する有効な分子標的として期待されている。mTOR シグナルと COX-2 シグナルの相互作用・拮抗作用における骨破壊・骨浸潤について十分検討されていない。そこで、われわれはこれまでの顎骨浸潤マウスモデルを用いた実験アプローチで口腔癌の顎骨浸潤における mTOR・COX-2 を介する RANKL シグナルの機序を解明し、口腔癌の顎骨浸潤・骨破壊を抑制する新たな治療法の可能性について検討する。

## 2. 研究の目的

口腔癌の顎骨浸潤における mTOR・COX-2 を介するシグナルによって調節される RANKL 作用を解明する。そして最終的には、患者の QOL 低下を招く顎骨壊死を誘発する破骨細胞性骨吸収阻害剤 Bisphosphonate(BP)製剤に替わる新たな治療法の確立を目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 2種類のマウス扁平上皮癌の比較

(in vitro)

マウス扁平上皮癌である NR-S1 細胞株と SCC 細胞株を Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM)に 10% fetal bovine serum (FBS)とペニシリン G 100U/ml とストレプトマイシン 100 µg/ml を加えた培地を用いて、37 5%CO<sub>2</sub>の条件下で培養して、COX-2 mRNA および PTHrP mRNA の発現量を比較検討した。

### (2) マウス扁平上皮癌移植の顎骨浸潤モデル

の作製と薬物投与 (in vivo)  
体重 20g 前後の雄性C3H/HeN マウスに、マウス扁平上皮癌細胞を $1 \times 10^7$  cells/ml に調整して最終的に0.1ml をマウスの左側咬筋内に注入移植した。実験動物の取り扱いとは東京医科大学動物実験指針に従った。

・COX-2 阻害剤・mTOR 阻害剤投与

COX-2 阻害剤 (Celecoxib: Pfizer, USA) の原末を 20mg/kg に調整した 0.2ml 懸濁液として実験に使用した。投与開始は腫瘍移植後 4 日目とし、連日 14 日間の経口投与を行った。同様に vehicle 群は生理食塩水を腫瘍移植後 4 日目から連日 10 日間投与した。また、mTOR 阻害剤は、Temsirrolimus 10mg/kg を連日 14 日間腹腔内投与した。実験群は、control (腫瘍移植のみ) 群 (n=10)、vehicle 群 (n=10)、Celecoxib 投与群 (n=10)、Temsirrolimus 群 (n=10)、Celecoxib + Temsirrolimus 投与群 (n=10) とした。

### (3) 抗腫瘍効果

経時的な体重変化と腫瘍体積を算出した。腫瘍体積は(長径) × (短径)<sup>2</sup> × 0.5 で求めた。

### (4) マイクロ CT による 3 次元的形態計測

μCT を用いて顎骨浸潤部を 3D 形態計測し各群の比較検討を行った。

### (5) 病理組織学的顎骨浸潤の評価と破骨細胞数の比較、COX-2, mTOR の発現に関する免疫組織化学的解析

H E 染色および Tartrate Resistant Acid Phosphatases (TRAP) 染色を行った。TRAP 染色は 10% EDTA 水溶液で脱灰した後パラフィン包埋し、TRAP Kit (和光純薬社製) を用いて行った。その後、画像解析システム (Tissue Studio Ver3.5; Definiens社製) を用いて顎骨浸潤部における破骨細胞数を計測した。また、抗マウスCOX-2, mTORモノクローナル抗体

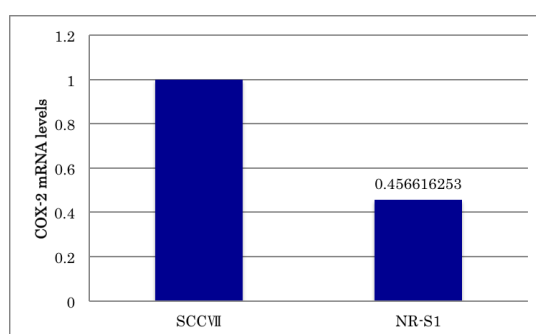
(Santa Cruz社製) とLSAB kit (DAKO社製) を用いて免疫組織化学的染色を行った。

その後、腫瘍細胞より産生する COX-2, PTHrP, mTOR, RANKL, osteoprotegerin, GAPDH の mRNA 量を real-time PCR で解析した。

## 4. 研究成果

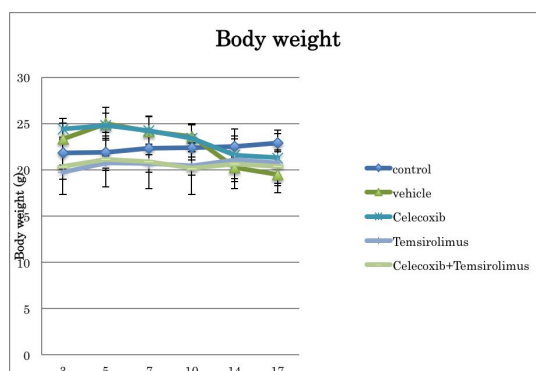
### (1) 2 種類のマウス扁平上皮癌のCOX-2 mRNA の発現量 (in vitro)

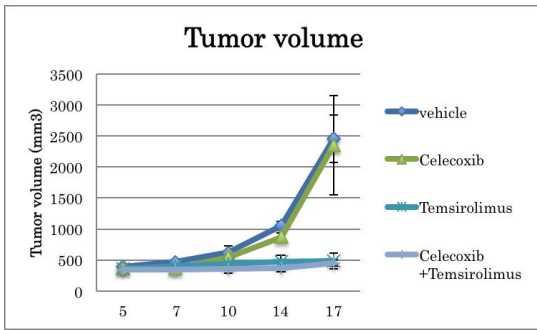
in vitroの結果からCOX-2高発現なSCC 細胞株を in vivoの顎骨浸潤モデル実験に使用した。



### (2) 体重変化と抗腫瘍効果

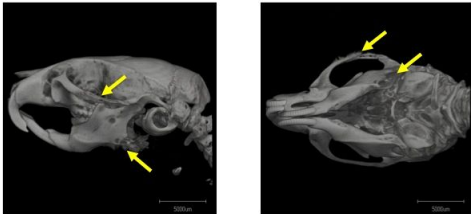
SCC 移植顎骨浸潤群において、Control群と比較して、Celecoxib群、Temsirrolimus群およびCelecoxib+Temsirrolimus群で著明な体重減少は認められなかった。腫瘍体積は、移植17日目の平均でvehicle群 2451.5 mm<sup>3</sup>、Celecoxib投与群 2355.1 mm<sup>3</sup>、Temsirrolimus群 485.6 mm<sup>3</sup>、Celecoxib + Temsirrolimus投与群 450.9 mm<sup>3</sup>であった。Celecoxib投与に関わらずTemsirrolimus投与群において腫瘍増殖の著しい抑制が認められた。





(3) マイクロCTによる3次元形態解析  
control群、vehicle群、Celecoxib投与群において下顎骨や顔面骨に対し著明な骨吸収を認めた。Temeirolimus投与群において顎骨浸潤は著明に抑制されていた。

#### 顎骨浸潤モデルの3D-μCT画像



左側下顎骨や頬骨弓に骨吸収像が認められる(黄矢印)

#### 顎骨浸潤モデルの3D-μCT画像



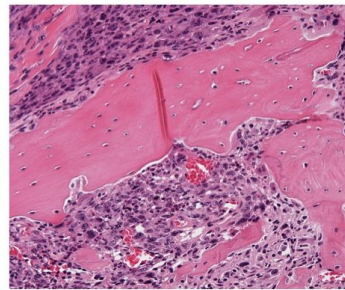
Temeirolimus投与群、Celecoxib+Temeirolimus投与群において顎骨浸潤は抑制されていた

#### (4) 病理組織学的顎骨浸潤と破骨細胞数およびCOX-2, mTOR 発現量の比較

病理組織学的所見では、顎骨浸潤部では腫瘍細胞が索状に増殖し、鋸歯状の骨吸収像を示していた。TRAP 染色では、吸収した顎骨周囲に破骨細胞の集積を認めた。各群における破

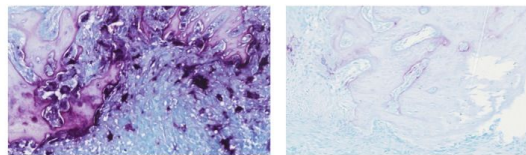
骨細胞数の平均値 (mean ± 1SD; 破骨細胞数 /62500 μm<sup>2</sup>) を比較するとvehicle群 12.125 ± 5.27 cells、Celecoxib投与群 6.167 ± 1.18 cells、Temeirolimus群 4.25 ± 0.75 cells、Celecoxib + Temeirolimus投与群 3.00 ± 0.83 cellsであった。Celecoxib + Temeirolimus投与群で最も破骨細胞数が減少した。Celecoxib (COX-2 inhibitor)投与で破骨細胞数が減少し、さらにTemeirolimus (mTOR inhibitor)投与で破骨細胞数が減少した。免疫染色でCOX-2, mTORの発現は、inhibitor投与で著明に抑制された。

#### H-E染色 (Original magnification ×40)



マウス扁平上皮癌 (SCC VII移植) の顎骨浸潤

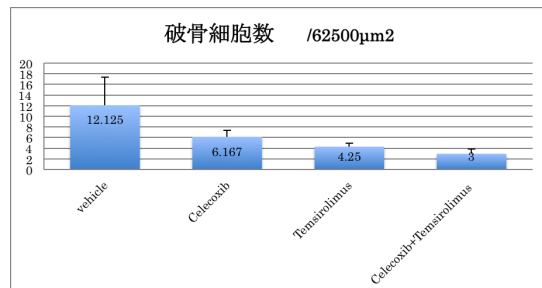
#### TRAP染色 (Original magnification ×200)



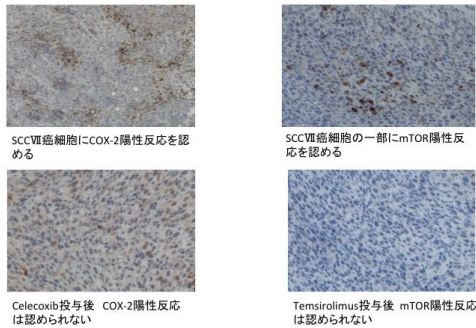
Vehicle群

Celecoxib+Temeirolimus群

Vehicle群において腫瘍の顎骨浸潤部に多数のTRAP陽性の破骨細胞を認めるが、Celecoxib+Temeirolimus投与群では認められない



免疫染色 (Original magnification ×100)



CelecoxibとTemozolomideの投与で破骨細胞数の減少を認めたが、破骨細胞に関連するサイトカインについては、現在、real-time PCRで解析中である。Temozolomide(mTOR inhibitor)投与群においてRANKL量が低下し,OPG量が増加する。さらにCelecoxib(COX-2 inhibitor)の投与で、その効果が増強するようであるが、再現性のある結果を得られていないため、現在、検索中である。以上より、破骨細胞関連サイトカインの発現解析が口腔癌における顎骨浸潤能の評価に有用と思われた。CelecoxibとTemozolomideの投与で、腫瘍増殖が抑制され、破骨細胞数が減少し、顎骨浸潤が制御されたことで、COX-2阻害剤とmTOR阻害剤は新たな口腔癌の顎骨浸潤に対する治療薬になりえる可能性があると考えられた。

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4件)

1. Ikeda T, Kuraguchi J, Kogashiwa Y, Yokoi H, Satomi T, Kohno N: Successful treatment of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ) patients with sitafloxacin: new strategies for the treatment of BRONJ. Bone; 73: 217-22, 2015. (査読有)

2. Hamada H, Matsuo A, Koizumi T, Satomi T, Chikazu D. A simple evaluation method for early detection of bisphosphonate-related osteonecrosis of the mandible using computed tomography. J Craniomaxillofac Surg 42(6): 924-929, 2014. (査読有)
3. Kohno M, Watanabe M, Abukawa H, Hasegawa O, Satomi T, Chikazu D, Cyclo-oxygenase-2 expression is associated with vascular endothelial growth factor C expression and lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. J Oral Maxillofac Surg 71(10):1694-1702, 2013. (査読有)
4. Fujikawa K, Abukawa H, Hasegawa O, Satomi T, Odan N, Matsuo A, Chikazu D. Clinical application of polyglycolic acid sheet after resection of tongue squamous cell carcinoma. J Oral Maxillofac Surg Med Pathol 25(3): 221-225, 2013. (査読有)

[学会発表](計4件)

1. 里見貴史: 「口腔がん」～最新の治療法と東京医科大学病院の取り組み～. 平成26年度渋谷区歯科医師会学術講演会. 2014年9月25日. 渋谷区文化総合センター、東京
2. 池田 哲也, 藏口 潤, 里見 貴史, 近津 大地: 当科におけるビスフォスフォネート関連顎骨壊死に対する対応について. 第58回日本口腔外科学会総会・学術大会, 2013年10月11-13日. 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡, 福岡
3. 里見 貴史: 日常臨床における口腔がん

への対処のしかた ; 埼玉県日本歯科大学  
大学校友会「埼玉富士見クラブ」主催学  
術講演会. 2012年12月2日. 大宮歯科  
医師会会館、埼玉

4. 河野通秀、渡辺正人、長谷川 温、虻川  
東嗣、里見貴史、近津大地: 口腔扁平上  
皮癌における Cyclooxygenase2(COX2)発  
現とリンパ節転移について. 2012年6  
月7-8日, 島根県民会館、松江

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藏口 潤 (KURAGUCHI, JUN)  
東京医科大学・医学部・兼任助教  
研究者番号: 30424576

### (2) 研究分担者

近津 大地 (CHIKAZU, DAICHI)  
東京医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 30343122

渡辺 正人 (WATANABE, MASATO)  
東京医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 40349460

賀来 亨 (KAKU, TOORU)  
日本医療大学・保健医療学部・教授  
研究者番号: 60133253

里見 貴史 (SATOMI, TAKAFUMI)  
東京医科大学・医学部・准教授  
研究者番号: 70276921

池田 哲也 (IKEDA TETSUYA)  
杏林大学・医学部・助教  
研究者番号: 60424107

(3) 連携研究者  
( )

研究者番号: