

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：27102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462792

研究課題名(和文) 新規NF- κ B阻害剤による口腔癌の顎骨浸潤抑制の分子基盤と臨床応用への展開研究課題名(英文) Investigation of the molecular basis of the inhibitory effect of novel NF- κ B inhibitor on bone invasion by OSCC for clinical trial

研究代表者

松尾 拓 (Matsuo, Kou)

九州歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：70238971

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：歯肉に発症した口腔扁平上皮癌(OSCC)はしばしば上顎骨や下顎骨に浸潤し、予後不良となることが多い。そこで新規NF- κ Bの阻害剤がOSCCによる顎骨浸潤を抑制する効果について検討した。NF- κ Bの阻害剤は*in vitro*と*in vivo*においてOSCC細胞の増殖を抑制し、アポトーシスを促進した。NF- κ Bの阻害剤はOSCCによるマトリックスメタロプロテアーゼの産生を抑制した。さらにNF- κ Bの阻害剤は動物モデルにおいてRANKLの発現を抑制することで破骨細胞形成を抑制した。従って、NF- κ Bの活性の阻害は、骨侵襲性のOSCCを治療するための有望な治療アプローチになりうる。

研究成果の概要(英文)：Gingival oral squamous cell carcinoma (OSCC) frequently invade the maxilla or the mandibular bone and are associated with poor prognosis. Thus, we investigated whether the novel NF κ B inhibitors suppress bone invasion by OSCC. NF- κ B inhibitors suppress proliferation and stimulate apoptosis of OSCC cells *in vitro* and *in vivo*. NF- κ B inhibitors also inhibit matrix metalloproteinase (MMPs) production in OSCC. Furthermore, NF- κ B inhibitors have been shown to suppress osteoclastogenesis by reducing RANKL expression in animal models. Thus, inhibition of NF- κ B activity may constitute a promising therapeutic approach to treat bone-invasive OSCC.

研究分野：口腔病理学

キーワード：口腔扁平上皮癌 NF- κ B I κ Bキナーゼ IMD-056

1. 研究開始当初の背景

日本における口腔扁平上皮癌の発症率は全悪性腫瘍の1~2%程度であるが、世界では6番目に発症率の高い癌であり、年間約30万人が新たに口腔扁平上皮癌と診断され、約7千人が口腔扁平上皮癌で死亡している。

口腔扁平上皮癌の好発部位は舌と歯肉であるが、歯肉癌が顎骨に浸潤すると、顎骨の切除を伴うことが多い。通常、抗がん剤や放射線などの術前治療後に外科的に癌を切除するが、術前治療は口内炎を誘発し、摂食障害による体力低下や精神的苦痛を伴うこともある。また広範囲にわたる外科的切除患者にとって大きな負担となることから、患者の肉体的および精神的苦痛や負担を軽減することが重要である。

口腔扁平上皮癌による顎骨浸潤は癌細胞自身が骨を破壊するのではなく、骨破壊の最前線には多数の破骨細胞が存在しており、口腔扁平癌細胞による破骨細胞の分化誘導機構を解明することが治療を考える上で重要である。これまでに癌細胞が産生する副甲状腺関連ペプチド(PTHrP)やインターロイキン(IL)-6がストローマ細胞に作用して、破骨細胞誘導因子RANKLの発現を誘導することで破骨細胞分化を促進することが報告されている。

正常組織と比較して癌組織では、①恒常的にNF- κ Bが活性化されていること、②NF- κ Bの活性化が口腔扁平上皮癌の悪性度と相関すること、③癌細胞が産生する多くの炎症性サイトカイン産生にNF- κ Bが関与すること、④NF- κ Bが癌細胞の浸潤に関わるマトリックスメタロプロテアーゼ(MMPs)の発現誘導に関わること、⑤破骨細胞誘導因子RANKLが受容体RANKと結合するとNF- κ Bが活性化され、NF- κ Bの選択的阻害剤が破骨細胞形成を抑制することから、NF- κ Bは口腔扁平上皮癌による顎骨浸潤の分子標的になると思われる。

分子の三次元構造とコンピューターによるシミュレーションに基づいた論理的分子設計手法を用いて開発された新規NF- κ B活性化阻害剤

IMD-0560は、関節リウマチ患者由来の滑膜細胞のIL-6、IL-8などの炎症性サイトカインの産生を抑制し、マウスコラーゲン関節炎モデルにおいても有為な改善効果があることが報告されている。既に経口投与が可能なプロドラッグも開発されており、関節リウマチや骨粗鬆症の治験では、フェーズIを終了し、臨床応用が期待されている。

2. 研究の目的

口腔扁平上皮癌が歯肉に発症すると、顎骨に浸潤することが多い。顎骨浸潤の治療として、抗がん剤や放射線治療の後に外科的に切除することが一般的である。しかし、術前治療は口内炎を誘発し、摂食障害や精神的苦痛を伴うこともある。また、広範囲にわたる外科的切除は患者にとって負担が大きい。我々はこれまでに口腔扁平上皮癌による顎骨浸潤機構について細胞レベルおよび分子レベルで解明し、転写因子NF- κ Bが口腔扁平上皮癌による顎骨浸潤の分指標的になる可能性を報告してきた。

そこで本研究では、既に関節リウマチの臨床治験フェーズIを終了した新規NF- κ B活性化阻害剤、IMD-0560を用いて、顎骨浸潤の抑制効果とその作用機序を明らかにして、患者の負担軽減を目的に臨床応用の適応拡大を目指す。

3. 研究の方法

(1) **IMD-0560によるNF- κ Bの抑制効果**: ヒト口腔扁平上皮癌細胞株HSC-2細胞およびCa₉₋₂₂細胞、またはマウス扁平上皮癌細胞株SCCVII細胞にIMD-0560で存在下、または非存在下で炎症性サイトカインTNF α で刺激し、NF- κ Bの活性化をメインサブユニットp65の核移行を抗p65抗体を用いた免疫染色、またはp65のリン酸化と核移行およびI κ B α の分解をWestern Blot法で検討する。

(2) **IMD-0560による口腔扁平上皮細胞の機能評価**: 同様にHSC-2細胞およびCa₉₋₂₂細胞、またはSCCVII細胞にIMD-0560で存在下、また

は非存在下で TNF α で刺激し、以下の実験をおこなう。

- ① 細胞増殖とアポトーシスの測定
- ② トランスウェルを用いた細胞の遊走能の測定
- ③ マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP)-2,9 の発現と酵素活性の測定
- ④ 破骨細胞形成の抑制効果

(3) マウス扁平上皮癌細胞株顎骨浸潤モデルを用いた IMD-0560 の抑制効果の評価: マウス扁平上皮癌細胞株 SCCVII 細胞を C3H/HesN マウス右咬筋部から移植する。腫瘍接種1週間後より、IMD-0560 (0, 1, 3, 5 mg/kg) を下顎角部から骨と腫瘍の境界から週3日3週間に渡って投与する。顎骨浸潤の評価は以下の2つの方法を用いる。

- ① μ CT 撮影: μ CT 撮影を行い、骨破壊の状況を3次元的に評価する。
- ② 病理組織学的解析: μ CT 撮影で骨の破壊が認められた部位を横断面で組織切片を作製する。
 - (i) H&E 染色: 顎骨浸潤の全体像を把握する。
 - (ii) 酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ (TRAP) 染色: 破骨細胞のマーカーである TRAP 染色を行い、破骨細胞数を定量する。
 - (iii) 免疫染色: 癌細胞の増殖を評価する Ki67 染色、RANKL、OPG の発現をそれぞれの抗体を用いて免疫染色をおこなう。
 - (iv) TUNEL 染色: 癌細胞のアポトーシスを評価する。
 - (v) 正常組織への影響: IMD-0560 投与付近の正常細胞への影響を舌の基底細胞の増殖を指標に Ki-67 染色で検討する。

(4) IMD-0560 による顎骨浸潤の治療を見据えたプロトコルの確立: SCCVII 細胞を C3H/HesN マウス右咬筋部から移植する。腫瘍が増大し、顎骨浸潤が軟 X 線写真で十分に認められる3週間後から上記に示す様に、IMD-0560 を週3日3週間に渡って投与する。

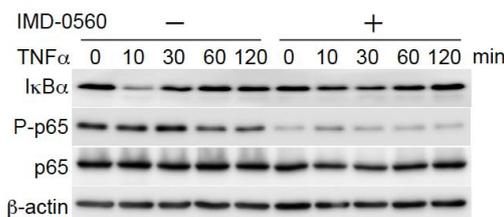
(5) IMD-0560 による顎骨浸潤の治療効果の評価: 上記(3)に示す2つの評価方法で検討する。

(6) IMD-0560 の適応拡大と臨床試験の準備: 得られた結果をもとに既に適応となっている疾患の他に口腔癌の治療への適応拡大と臨床試験のプロトコルを決定する。

4. 研究成果

(1) IMD-0650 は TNF α 刺激による NF- κ B, p65 サブユニットのリン酸化と I κ B α の分解を抑制する。

SCCVII 細胞および HSC-2 細胞および Ca₉₋₂₂ 細胞を様々な濃度の IMD-0560 で前処理した後に TNF α で刺激したところ、IMD-0560 は濃度依存的に S536 のリン酸化と I κ B α の分解を抑制した。IMD-0560 は TNF α 刺激による p65 の核移行、I κ B α の分解および p65 のリン酸化を抑制した。さらに、IMD-0560 は TNF α 刺激による NF- κ B の転写活性を抑制した。以上の結果より、IMD-0650 は TNF α 刺激による NF- κ B, p65 サブユニットのリン酸化と I κ B α の分解を抑制した(図1)。

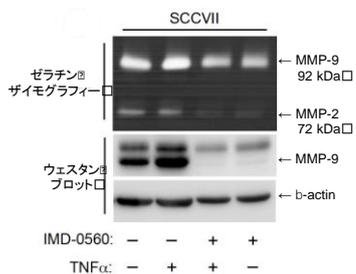


(図1) IMD-0560はTNF α 刺激によるNF- κ Bの活性化を抑制する。マウス扁平上皮癌細胞株SCCVII細胞をIMD-0560 (1 mM) で前処理した後に TNF α (10 ng/ml) で処理して経時的にタンパク質を調製し、NF- κ Bの活性化を抗I κ B α 抗体および抗リン酸化p65抗体を用いたWestern Blot法で検討した。

(2) IMD-0560によるOSCCの浸潤の抑制効果

次にフィルター面にゼラチンをコートしたトランスウェルを用いて、SCCVII 細胞、HSC-2 細胞および Ca₉₋₂₂ 細胞を上層に播種し、下層に TNF α を添加すると、Ca₉₋₂₂ 細胞以外の SCCVII 細胞、および HSC-2 細胞は 24 時間後にゼラチンを浸潤し、下層へと遊走した。上層に IMD-0560 をそれぞれ 1 μ M、10 μ M 添加すると TNF α 刺激による SCCVII 細胞および HSC-2 細胞の遊走は抑制された。TNF α で刺激すると

SCCVII 細胞および HSC-2 細胞の MMP-9 の活性が上昇したが、MMP-2 はほとんど変化しなかった。IMD-0560 で処理すると MMP-9 の活性が抑制され、同時に MMP-9 タンパク質および mRNA の発現量も低下した。以上の結果より、TNF α は SCCVII 細胞および HSC-2 細胞の MMP-9 の mRNA を誘導し、IMD-0560 は TNF α 刺激によって誘導された MMP-9 の mRNA の発現を抑制した (図2)。

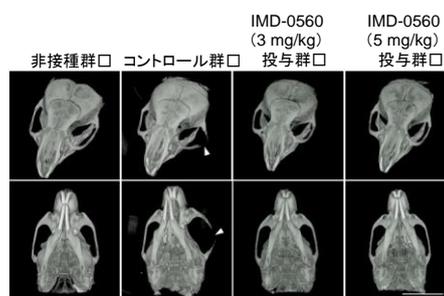


(図2) IMD-0560はTNF α 刺激によるMMP-9の活性化と発現を抑制するマウス扁平上皮癌細胞株SCCVII細胞をIMD-0560(1 mM)で前処理した後にTNF α (10 ng/ml)で処理して経時的に培養上清とタンパク質を調製し、MMP-9の活性化をゼラチンゼイモグラフィーでMMP-9の発現を抗MMP-9抗体を用いたWestern Blot法で検討した

(3) IMD-0560 投与による OSCC の顎骨浸潤への効果

IMD-0560 の顎骨浸潤の抑制効果を検討するために、SCCVII 細胞左下顎角部より接種し、1週間後からIMD-0560(3, 5 mg/kg)を週3回、3週間投与した。3週間後の体重は SCCVII 接種群(コントロール群)で若干減少したが、IMD-0560 投与群(3, 5 mg/kg)では、SCCVII 非接種群(非接種群)と殆ど変わらなかった。腫瘍体積はIMD-0560 投与群では、IMD-0560 の濃度依存的に縮小した。

マイクロ CT 撮影像から頬骨弓の破壊の程度を数値化したところ、コントロール群では頬骨弓および下顎骨の破壊が認められた。IMD-0560 群ではコントロール群と比較すると頬骨弓および下顎骨の破壊は抑制された。IMD-0560(5 mg/kg)投与群ではIMD-0560(3 mg/kg)投与群と比較して腫瘍体積はより縮小していたが、両者とも頬骨弓の破壊は抑制され、その抑制効果はほぼ同等であった(図3)。



(図3) IMD-0560はSCCVII細胞による顎骨浸潤を抑制する。SCCVII細胞をC3H/HesNマウス左下顎角部より接種し、1週間後からIMD-0560(3, 5 mg/kg)を週3回3週間投与した。3週間後にmCT撮影像から頬骨弓の破壊の程度を評価した。

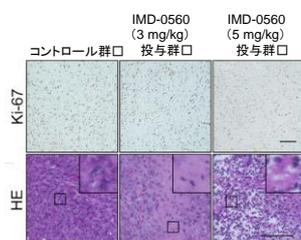
(4) IMD-0560 の投与は顎骨浸潤の治療に有用である。

次に、IMD-0560 の治療効果を検討する目的で SCCVII 細胞接種し、腫瘍が肉眼で確認できる2週間後からIMD-0560(3, 5 mg/kg)を週3回、2週間投与した。2週間後の体重はSCCVII接種群(コントロール群)で若干減少したが、IMD-0560 投与群(3, 5 mg/kg)では、SCCVII 非接種群(非接種群)と殆ど変わらなかった。コントロール群では頬骨弓および下顎骨の破壊が認められた。IMD-0560(3 mg/kg)群では頬骨弓の明らかな骨折が認められるものがあったが、コントロール群と比較すると頬骨弓および下顎骨の破壊は抑制された。IMD-0560(5 mg/kg)投与群ではIMD-0560(3 mg/kg)投与群と比較して頬骨弓および下顎骨の破壊はより効果的に抑制された。

組織学的には、コントロール群およびIMD-0560(3 mg/kg)投与群では、骨表面に沿って多数の破骨細胞が認められたが、IMD-0560(5 mg/kg)投与群では下顎骨表面常に破骨細胞が殆ど存在しなかった。さらにコントロール群では、腫瘍と骨境界部にRANKL陽性のSCCVII細胞および骨芽細胞が存在した。IMD-0560(3 mg/kg)投与群ではRANKL陽性のSCCVII細胞および骨芽細胞が減少し、IMD-0560(5 mg/kg)投与群ではRANKL陽性細胞は検出できなかった。

コントロール群およびIMD-0560(3 mg/kg)投与群ではKi-67陽性のSCCVII細胞数は殆ど変わらなかったがIMD-0560(5 mg/kg)投与群で

はKi-67 陽性の SCCVII 細胞数が著明に減少した。腫瘍組織の腫瘍細胞は無傷であったが、IMD-0560 (3 mg/kg) 投与群では壊死細胞の集落が認められ、IMD-0560 (5 mg/kg) 投与群では腫瘍組織は壊死組織や顆粒組織に置き換わっていた(図4)。



(図4) IMD-0560はSCCVII細胞の増殖を抑制し、細胞死を誘導する。SCCVII細胞をC3H/HeNマウス左下顎角部より接種し、2週間後からIMD-0560 (3, 5 mg/kg)を週3回2週間投与した。2週間後に組織切片を作製し、SCCVII細胞の増殖を抗Ki-67抗体による免疫染色、細胞死をH&E染色で評価した。

(5) IMD-0560 の適応拡大と臨床治験の準備

得られた結果をもとに口腔癌の治療への適応拡大を目指した臨床研究を進めようとしたが、臨床医の理解が得られなかった。

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 2 件)

1. Jimi E, Kokabu S, Matsubara T, Nakatomi C, Matsuo K, Watanabe S. NF- κ B acts as a multifunctional modulator in bone invasion by oral squamous cell carcinoma. *Oral Sci Int.* 2016 13(1), 1-6.

2. Tada Y, Kokabu S, Sugiyama G, Nakatomi C, Aoki K, Fukushima H, Osawa K, Sugamori Y, Ohya K, Okamoto M, Fujikawa T, Itai A, Matsuo K, Watanabe S, Jimi E. The novel I κ B kinase β inhibitor IMD-0560 prevents bone invasion by oral squamous cell carcinoma. *Oncotarget* 2014 5(23): 12317-12330.

[学会発表] (計 3 件)

1. 多田 幸代、杉山悟郎、渡邊誠之、自見英治郎：新規 NF- κ B 選択的阻害剤による口腔扁平上皮癌顎骨浸潤抑制の分子メカニズム解析。第 74 回九州歯科学会、福岡 (5 月 31 日 -6 月 1 日)、2014

2. 多田 幸代、杉山悟郎、福島秀文、古株彰一郎、自見英治郎：新規 NF- κ B 選択的阻害剤は口腔癌による顎骨浸潤を抑制する。第 56

回歯科基礎医学会学術大会・総会、福岡 (9 月 25-27 日)、2014.

3. 松尾 拓、河野憲司、矢田直美：口腔扁平上皮癌における aquaporin-3 発現とその生物学的態度との関連に関する免疫組織化学的検討。第 103 回日本病理学会総会 広島(4 月 24-25 日)、2015

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松尾 拓 (MATSUO Kou)

九州歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：70238971

(2) 研究分担者

自見 英治郎 (JIMI Eijiro)

九州歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：40276598

板井 昭子 (ITAI Akiko)

医薬分子設計研究所・社長

研究者番号：60012647

藤川 智行 (FUJIKAWA Tomoyuki)

医薬分子設計研究所・創薬事業戦略室長

研究者番号：30451074

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者