

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 28 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861391

研究課題名(和文) 活性酸素生成酵素Noxを標的とした頭頸部扁平上皮癌の治療法の開発

研究課題名(英文) The Research on Nox producing Reactive Oxygen Species in Head and Neck carcinoma

研究代表者

田浦 政彦 (Masahiko, Taura)

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：20648026

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：頭頸部癌と活性酸素生成酵素Nox、甲状腺癌と活性酸素生成酵素Duoxに関する研究を行った。頭頸部癌ではNoxやDuoxによる活性酸素生成能が低下し、貪食細胞による殺細胞力の低下が癌の進行に影響する、という仮説を立てた。頭頸部扁平上皮癌ではNox2が発現しているが、初期癌と進行癌で発現量に差を認めなかった。甲状腺癌では進行癌でDuoxの発現低下を認め、Duoxが癌の進行度に影響していることが示唆された。頭頸部癌では、食細胞による貪食能やアポトーシス関連サイトカインが低下している、という仮説を立てた。貪食能やサイトカインの低下はなく、sTNF-R1型と2型が有意に上昇しているという結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：We Researched on Nox(NADPH oxidase) producing ROS(Reactive Oxygen Species) in Head and Neck carcinoma and Duox producing ROS in Thyroid carcinoma. A hypothesis was built up that Nox expression in Head and Neck carcinoma patients was reduced and could not produce enough ROS to kill the carcinoma cells. In head and neck patients, Nox2 was expressed but the other Nox was not. Nox2 expression in advanced carcinoma was as same amount as in initial cancer. In thyroid cancer patients, Duox2 expression was decreased in advanced cancer. Duox producing ROS may effect the rate of progression in thyroid cancer. Another hypothesis was built up that cytokines connecting with Nox, phagocytosis, apoptosis, and ROS were lower than healthy people. None of the cytokines were reduced in carcinoma patients. sTNF-R type1 and type2 were increased significantly in the Head and neck carcinoma patients. We can use sTNF-R as the novel tumor marker for head and neck cancer.

研究分野：頭頸部癌

キーワード：頭頸部癌 甲状腺癌 食細胞 活性酸素 Nox Duox 貪食 sTNF-R

1. 研究開始当初の背景

(1) 頭頸部癌は粘膜上皮が喫煙、飲酒を主とした発癌要因に繰り返し暴露される事により遺伝子変異の蓄積が起きることで癌化する。正常細胞の癌化に、活性酸素が関与していると言われていた。一般に活性酸素は悪玉のイメージを持たれており、発癌に関与していると考えられている。それは代謝系の副産物である活性酸素が組織や細胞に害を及ぼす事が原因である。一方、生体において反応性の高い活性酸素は様々な生理的な役割を果たしている。例えば、生体防御において重要な好中球は活性酸素生成酵素 Nox を介して活性酸素を殺菌剤として用いている事、また耳石形成には Nox3 による活性酸素生成が必要である事、さらに甲状腺ホルモン合成には Duox により生成された  $H_2O_2$  が必須である事、等が知られている。活性酸素を「制御不能な副産物」として生じる系ではなく、「真の産物」として生成する系が存在する。

活性酸素を生成する酵素系として食細胞 Nox2 がよく知られている。本酵素は、好中球やマクロファージ等に発現がみられ、貪食細胞が外来微生物や腫瘍細胞を飲み込み破壊する際に活性酸素の生成源として機能している。Nox2 による活性酸素生成の低下は、慢性肉芽腫症という諸臓器に肉芽腫形成を伴い難治性感染症を繰り返す疾患の原因となる。Holmdahl らのグループは、*Nat. Genet.*, 33:25-32, 2003. で人のリウマチ性関節炎のラットモデルにおいて、天然に存在する p47<sup>phox</sup> のポリモルフィズムが関節炎の重篤度に大きな影響を与えることを示した。p47<sup>phox</sup> の 153 番目のスレオニン残基がメチオニン残基に置換されているラットモデルでは関節炎が重症化するのだが、食細胞 NADPH オキシダーゼによる  $O_2^-$  生成が有意に低下している事が判明した。当初、関節炎の重症化に対して活性酸素が負の影響を与えると予想されていたのだが、結果は逆であった。

Nox2 による活性酸素生成が低下したラットで関節炎が重症化するのには、関節炎の増悪に関与する T 細胞の活性化が促進されている事が原因であると考えられる。食細胞 NADPH オキシダーゼは抗原提示細胞(マクロファージや B 細胞)に発現しており、免疫シナプスを介して T 細胞の過度の活性化を活性酸素によって抑える事と、アポトーシスを誘導する事がオキシダーゼの役割であると推定される。

慢性肉芽腫症患者では食細胞 Nox2 の活性酸素生成活性が低下するため諸臓器に肉芽腫形成がおきる。リウマチ性関節炎のラットモデルでは p47<sup>phox</sup> に T153M 変異があるため活性酸素生成能が低下して関節炎が増悪する。頭頸部扁平上皮癌患者でも、貪食細胞の活性酸素生成能が低下している事が発癌や治療抵抗性の原因となっていると考えられる。

(2) 貪食細胞が癌細胞の貪食及び殺細胞を行うことが効果的な癌治療を行えるとどうかにおいて非常に重要である。貪食細胞の貪食能低下、殺細胞能低下が治療抵抗性に影響していると考えられる。貪食細胞の機能を保つためには顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、MCP-1 による刺激、LAK 活性、サイトカイン(IL-1、IL-8、IL-12)産生が必要である。貪食細胞に発現する接着因子(CD11b、CD11c)の機能が顆粒球接着能に必要である。刺激因子低下、サイトカイン産生低下、接着因子低下による免疫能低下が癌細胞の増殖に関与していると考えられる。

リンパ球機能低下が癌細胞の治療抵抗性に関与している可能性があり、リンパ球機能を反映するリンパ球幼若試験は悪性腫瘍では低値を示すことがある。リンパ球機能を保つためにはサイトカイン(IL-2、IL-13)産生、NK 細胞による IFN- $\gamma$  産生が必要である。活性酸素が組織、細胞、DNA に損傷を与える事により発癌に関与している、という報告は多い。しかし、「真の産物」として生成された活性酸素が炎症性疾患や癌細胞の制御に

必要であるという報告は少ない。リウマチ性関節炎のラットモデルで食細胞の活性酸素生成能が低下すると関節炎が増悪するという事や慢性肉芽腫症患者で肉芽形成がみられる事から考えられるように、炎症や肉芽腫の増悪の抑制に制御された活性酸素が必要であるという事は明らかである。癌細胞の制御に関しても食細胞の活性酸素生成能が重要であると考えられる。発癌や癌細胞の治療抵抗性に関して、細胞内の活性酸素が有用であると着目した点が本研究の独創的な点である。

本研究では頭頸部扁平上皮癌患者の食細胞における活性酸素生成酵素 Nox により生成された活性酸素を介したアポトーシス誘導、癌細胞の活性酸素消去能を解析する事により、Nox が扁平上皮癌制御に関して重要な役割を果たしている事が明らかになると予想される。また甲状腺に発現する活性酸素生成酵素 Duox により生成された活性酸素が甲状腺癌に対して与える影響についても検討を行う。

## 2. 研究の目的

(1) 頭頸部扁平上皮癌患者における活性酸素生成酵素 Nox (NADPH オキシダーゼ) 及び甲状腺癌患者における Duox の活性化能や、癌細胞のアポトーシス誘導に関する活性酸素の関与を分子生物学的に解析して、頭頸部癌治療への臨床応用を展開するための基盤を確立する事。

(2) 頭頸部癌患者における好中球貪食能、好中球殺菌能、顆粒球コロニー刺激因子、サイトカイン産生能、食細胞の接着因子の機能、NK 細胞活性化能、腫瘍壊死因子、腫瘍壊死因子受容体 TNF-R を測定することで癌化に影響する因子を調べる。

## 3. 研究の方法

(1) 頭頸部扁平上皮癌症例の摘出組織、甲状腺癌症例の摘出組織、唾液腺癌の摘出組織、慢性中耳炎症例の中耳粘膜を用いて免疫組織染色を行い、NOX、DUOX、NOX 関連蛋白質の発現を調べる。

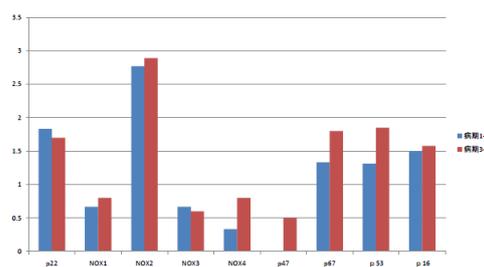
(2) 頭頸部癌患者における好中球貪食能、好中球殺菌能、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF)、サイトカイン (IL-1、IL-8、IL-12) 産生能、食細胞の接着因子 (CD11b、CD11c) の機能、NK 細胞活性化能、腫瘍壊死因子 TNF $\alpha$ 、腫瘍壊死因子受容体 TNF-R1 型と 2 型を測定

して健常者と比較する。

## 4. 研究成果

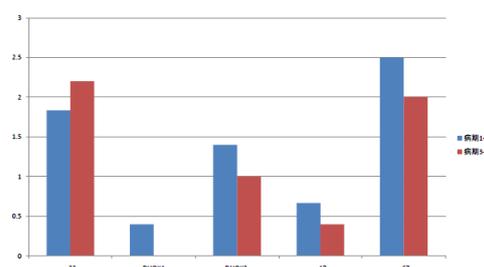
(1) 頭頸部扁平上皮癌症例における NOX 及び NOX 関連蛋白質の発現。頭頸部扁平上皮癌症例を初期癌(病期 I・II)と進行癌(病期 III・IV)に分けて、p22<sup>phox</sup>、NOX1、NOX2、NOX3、NOX4、p47<sup>phox</sup>、p67<sup>phox</sup> の発現量を免疫組織染色法を用いて比較したが有意な差を認めなかった。

### 扁平上皮癌



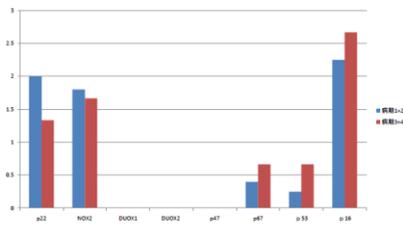
(2) 甲状腺癌症例における DUOX の発現。甲状腺癌症例を初期癌(病期 I・II)と進行癌(病期 III・IV)に分けて、DUOX1、DUOX2 の発現量を免疫染色法を用いて比較すると、進行癌で DUOX の発現量が低下する傾向を認めた。

### 甲状腺癌



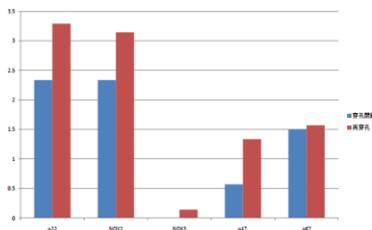
(3) 唾液腺癌症例における DUOX の発現。甲状腺癌症例を初期癌(病期 I・II)と進行癌(病期 III・IV)に分けて、DUOX1、DUOX2 の発現量を免疫染色法を用いて比較したが、唾液腺癌では DUOX の発現を確認できなかった。

### 唾液腺癌



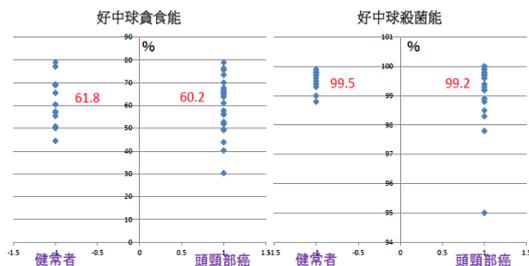
(4) 慢性中耳炎の中耳粘膜を用いた NOX 及び NOX 関連蛋白質の発現。中耳粘膜を採取して、手術により鼓膜穿孔閉鎖可能であった症例と鼓膜再穿孔を来した難治例の NOX2、NOX3 の発現量を比較した。難治例で NOX2 の発現量が多く、NOX2 による活性酸素生成が中耳炎の難治性に影響している可能性が高いと考えられた。

### 慢性中耳炎 穿孔閉鎖

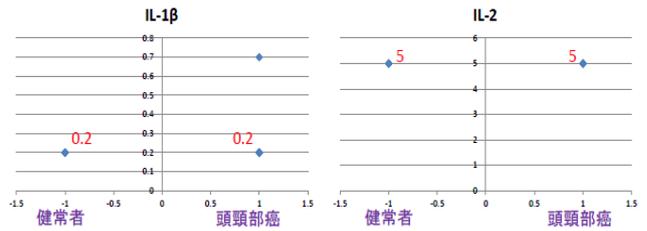


(5) 頭頸部癌患者における好中球貪食能・殺菌能、IL-1 $\beta$ 、IL-2、IL-8、IL-12、CD11b、CD11c、NK 活性、M-CSF、GM-CSF の測定、健常者との比較。M-CSF は頭頸部癌症例で上昇していたが、M-CSF 以外は健常者と比較して差がなかった。

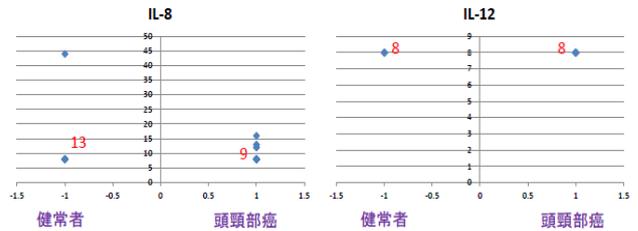
### 好中球貪食能・殺菌能



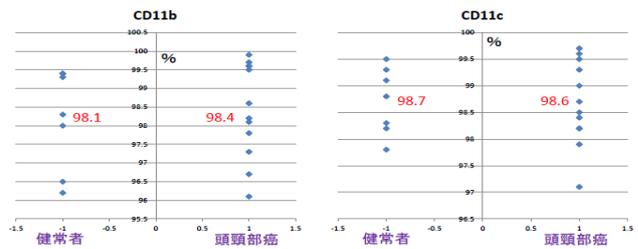
### IL-1 $\beta$ 、IL-2



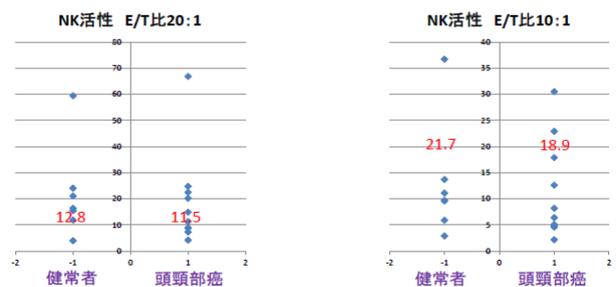
### IL-8、IL-12



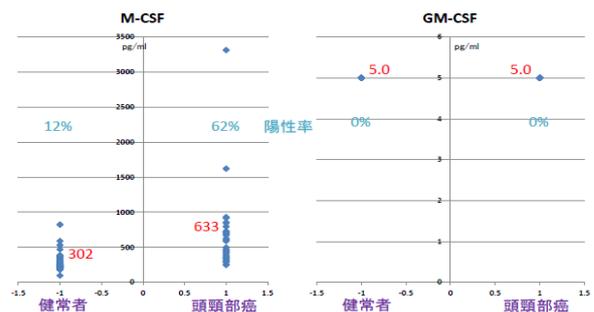
### CD11



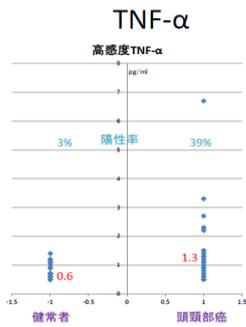
### NK 活性



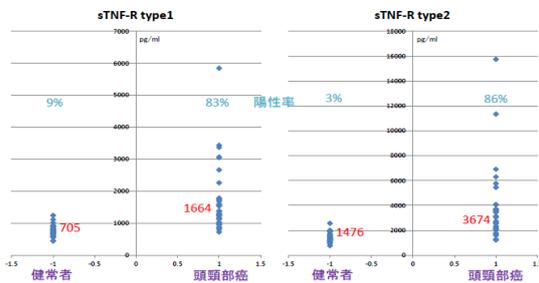
### M-CSF、GM-CSF



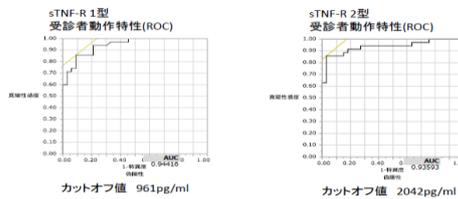
(6) 頭頸部癌患者における TNF- $\alpha$ 、sTNF-R1型、sTNF-R2型の測定、健常者との比較。TNF- $\alpha$ 、sTNF-R1型、sTNF-R2型は頭頸部癌症例で有意な上昇を認めた。sTNF-R1型、sTNF-R2型のカットオフ値を計算すると 961pg/ml、2042pg/mlであった。頭頸部癌症例におけるsTNF-R1型、sTNF-R2型の陽性率は83%、86%であり、感度の高い腫瘍マーカーとして使用できる可能性が考えられた。



### sTNF-R 1型、2型



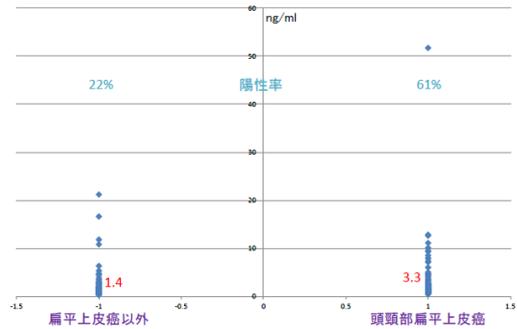
### カットオフ値



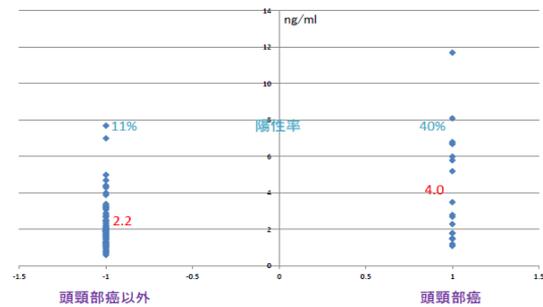
(7) 頭頸部癌症例における SCC 抗原、シフラの測定、甲状腺癌症例における Tg(サイログロブリン)及び抗 Tg 抗体の測定。SCC 抗原、シフラ、Tg、抗 Tg 抗体の陽性率は 61%、40%、55%、40%であった。既存の腫瘍マーカーと比較して、

sTNF-R1型及び2型が感度の高い頭頸部癌の腫瘍マーカーとして有効である可能性が高いと考えられた。

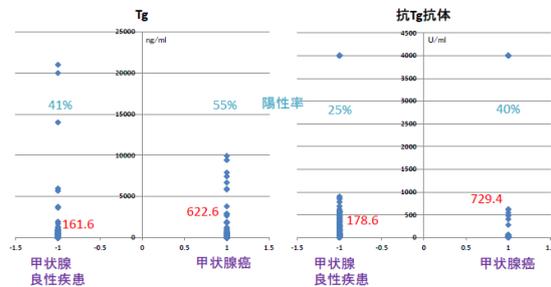
### SCC抗原



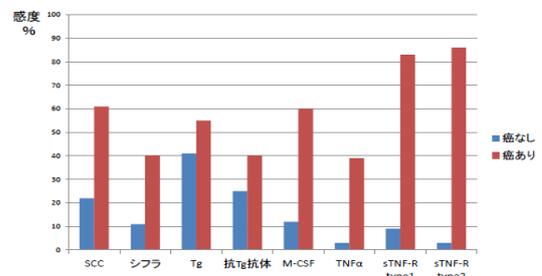
### シフラ



### Tg(サイログロブリン)、抗Tg抗体



### 頭頸部癌腫瘍マーカー



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 件)

〔学会発表〕(計 3件)

・田浦政彦、高岩一貴、友延恵理、小池健輔、加藤明子、久保和彦、小宗静男、中川尚志「慢性中耳炎と活性酸素生成酵素 Nox に関する研究」第 32 回九州連合地方部会 H29/7/16 九州大学医学部百年講堂(福岡市)

・田浦政彦、小池健輔、友延恵理「頭頸部癌の新規腫瘍マーカーに関する研究」第 41 回日本頭頸部癌学会 H29/6/8 ウェスティン都ホテル京都(京都市)

・田浦政彦、小池健輔、友延恵理「唾液腺腫瘍 73 例の検討」第 118 回日本耳鼻咽喉科学会 H29/5/19 広島国際会議場(広島市)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 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 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

田浦 政彦 (TAURA, Masahiko)

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号: 20648026

(2) 研究分担者

中川 尚志 (NAKAGAWA, Takasshi)

九州大学・医学研究院耳鼻咽喉科・教授

研究者番号: 70274470

(3) 連携研究者

( )

研究者番号:

(4) 研究協力者

( )