慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	COX-2による頭頸部癌幹細胞形質の制御機構の解明と薬剤耐性克服に向けた研究
Sub Title	Association of COX-2 expression and chemoresistance through cancer stem property in head and neck squamous cell carcinoma
Author	齋藤, 真(Saitō, Shin)
Publisher	
Publication year	2019
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2018.)
JaLC DOI	
Abstract	癌は均一な細胞集団ではなく、一部に治療抵抗性で癌の再発転移に関係するがん幹細胞という細胞が存在すると考えられている。このがん幹細胞に対する治療を行うことができれば、治療成績が向上すると期待されている。一方で、COX-2という生体内で炎症が生じた際に誘導される酵素がある。我々は、咽頭癌の検体でCOX-2の発現が高い症例程、抗癌剤に対する感受性が低いことを確認した。またこのCOX-2を阻害することで癌細胞の幹細胞としての性質が抑えられ、抗癌剤に対する感受性が向上することを確認できた。 COX-2 is one of the two isoforms of cyclooxygenase, an enzyme that catalyzes the conversion of arachidonic acid to prostaglandins. COX-2 is considered to be associated with progression in various cancers, and its expression has been reported to have an impact on poor prognosis in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC). Furthermore, COX-2 expression has been reported to be associated with sensitivity of anticancer drugs. However, the precise mechanism of COX-2 on chemoresistance in HNSCC is not fully elucidated. The aim of the present study was to investigate the impact of COX-2 on cancer stem cell property, and to reveal its effect on chemoresistance. As a result, we found that COX-2 expression is associated with cancer stemness property, and inhibition of COX-2 has the possibility to improve chemosensitivity in HNSCCs. Our results indicate that COX-2 is an attractive target for the treatment of HNSCC.
Notes	研究種目：若手研究(B) 研究期間：2016～2018 課題番号：16K20275 研究分野：頭頸部腫瘍
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_16K20275seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　元 年　 ６ 月　 ３ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2016～2018
課題番号：１６Ｋ２０２７５

研究課題名（和文）COX-2による頭頸部癌幹細胞形質の制御機構の解明と薬剤耐性克服に向けた研究

研究課題名（英文）Association of COX-2 expression and chemoresistance through cancer stem property in head and neck squamous cell carcinoma

研究代表者
齋藤　真（Saito, Shin）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教

研究者番号：８０５９４５２２

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　2,900,000円

研究成果の概要（和文）：癌は均一な細胞集団ではなく、一部に治療抵抗性で癌の再発転移に関係するがん幹細胞という細胞が存在すると考えられている。このがん幹細胞に対する治療を行うことができれば、治療成績が向上すると期待されている。一方で、COX-2という生体内で炎症が生じた際に誘導される酵素がある。我々は、咽頭癌の検体でCOX-2の発現が高い症例程、抗癌剤に対する感受性が低いことを確認した。またこのCOX-2を阻害することで癌細胞の幹細胞としての性質が抑えられ、抗癌剤に対する感受性が向上することを確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義
がん幹細胞に対する治療を行うことができれば、化学療法の抵抗性の改善や再発転移の抑制が期待されている。しかしながら現時点では頭頸部癌において、有効な方法はない。今回我々は、頭頸部扁平上皮癌において、COX-2という炎症の際に誘導される酵素ががん幹細胞の性質と関連があることを確認した。このCOX-2を阻害することで、各種の幹細胞としての特徴を抑制することができた。これらの結果はこれまで他癌腫で報告されているものと同様の結果であった。

研究成果の概要（英文）：COX-2 is one of the two isoforms of cyclooxygenase, an enzyme that catalyzes the conversion of arachidonic acid to prostaglandins. COX-2 is considered to be associated with progression in various cancers, and its expression has been reported to have an impact on poor prognosis in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC). Furthermore, COX-2 expression has been reported to be associated with sensitivity of anticancer drugs. However, the precise mechanism of COX-2 on chemoresistance in HNSCC is not fully elucidated. The aim of the present study was to investigate the impact of COX-2 on cancer stem cell property, and to reveal its effect on chemoresistance. As a result, we found that COX-2 expression is associated with cancer stemness property, and inhibition of COX-2 has the possibility to improve chemosensitivity in HNSCCs. Our results indicate that COX-2 is an attractive target for the treatment of HNSCC.

研究分野：頭頸部腫瘍

キーワード：がん幹細胞　頭頸部扁平上皮癌　COX-2

様　式　C－１９、F－１９－１、Z－１９、CK－１９（共通）

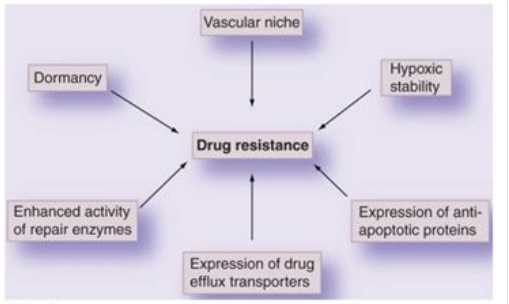
１．研究開始当初の背景

（１）頭頸部癌とがん幹細胞

頭頸部癌全体の 5 年生存率は約 50%と依然として不良であり、その主な要因は治療後の局所再発および遠隔転移である。近年、悪性腫瘍を構成する細胞の中に、自己複製能・多分化能を有し、治療抵抗性を示す、がん幹細胞（Cancer Stem Cells、以下 CSCs）と呼ばれる細胞集団が存在するという概念が広まり、頭頸部癌においてもその存在が提唱されている（Prince, Proc Natl Acad Sci USA, 2007)。CSCs が、悪性腫瘍の増殖や転移、治療抵抗性に直接関連していることが頭頸部を含めた複数の領域の研究から明らかにされて始めている。CSCs の特徴(以下 stemness property)を持った細胞とそうでない細胞とでは、腫瘍の増殖や転移に大きな差があるということが in vitro（Han, BMC Cancer, 2014）でも in vivo(Koo, Oncogene, 2015)でも確認されている。我々も、舌扁平上皮癌細胞株である SCC4 を用いて、stemness property の一つである、薬剤排出能を有する細胞を抽出したところ、それらの細胞において Oct3/4 や Nanog といった幹細胞関連遺伝子の発現量が多いこと、遊走能・浸潤能が高いことを報告した（Habu, BMC Cancer,2015)。また、舌癌の臨床検体を用いて Oct3/4 の発現量を調べた研究では、その発現量と予後に相関を認めたという報告（Koo, Oncogene、2015）もある。つまり、頭頸部癌においても stemness property が予後不良の因子になっていることが強く推測されている。

（２）CSCs と薬剤抵抗性

CSCs が癌の悪性化に関わるメカニズムとして、薬剤抵抗性がある（図１)。CSCs には MDR-1 や ABCG2 といった薬剤抵抗性に強く関わっている遺伝子の発現が高いことが数多く報告されている。また、幹細胞関連遺伝子の一つである Nanog を downregulation することで、頭頸部癌幹細胞の cisplatin に対する感受性を高められたという報告（Huang, Int J Mmol Sci, 2014）の他、肝癌の side population を用いた研究で、幹細胞の維持に重要とされている Akt signaling pathway を介して ABCG2 を阻害することで doxorubicin 抵抗性を改善することができたという報告もある（Hu, Carcinogenesis, 2008)。つまり、stemness property を制御することで薬剤抵抗性を改善させることができると予想されるが、既存の薬剤を用いてその効果を報告したものは今のところない。



【図１】Major factors enhancing cancer stem cell survival following radio/chemotherapy. *Hu, Carcinogenesis,* 2008

（３）CSCs をターゲットとした治療の探求

CSCs を標的とした治療を行うことができれば、薬剤抵抗性を改善し、ひいては癌治療の予後改善が期待できる。その手法として、現在のところ表面マーカーや転写因子、シグナルプロテインをターゲットとした研究が報告されている（図 2)。

我々はこれまでの頭頸部癌と COX-2 発現との関連について研究してきた経緯(Fujii, J Exp Clin Cancer Res, 2014)から、COX-2 に着目した。これまで他臓器の悪性腫瘍で COX-2 阻害薬が他のシグナル経路を介して CSCs を抑制することが示されている。例えば、乳癌細胞株を用いた研究で、COX-2 により誘導される PGE2 の受容体である EP4 を阻害することで、CSCs が生存する際に重要とされている PI3K/Akt pathway を介し、stemness property を抑制するという報告（Majumder, Cancer Science, 2014）や、肝細胞癌において選択的 COX-2 阻害薬を使用することで、PPARγ刺激を介した Akt signaling 抑制により同様に stemness property を抑制したという報告（Chu, Oncotarget, 2013）等がある。以上から、COX-2 は stemness property と密接な関係があることが推測され、本研究は頭頸部癌における COX-2 阻害薬による stemness property の制御機構を解明し、特に薬剤耐性を改善することで頭頸部癌の予後向上に寄与することを目的としている。

【図2】Schematic diagram summarizing the therapeutic strategies targeting cancer stem cells. *Hong, Recent Pat AntiCancer Drug Discov,* 2015

２．研究の目的

近年、悪性腫瘍を構成する細胞集団は均一なものではなく、一部に自己複製能・多分化能を有し、治療抵抗性を示す、がん幹細胞と呼ばれる集団が存在するという概念が広まっている。頭頸部癌においても、がん幹細胞が腫瘍の増殖や転移、治療抵抗性に関連しているという事が少しずつ明らかにされており、さらなる予後改善のために、今後はがん幹細胞をターゲットにした治療が求められるようになると予想される。その中で、選択的 COX-2 阻害薬が、がん幹細胞

の維持に影響を及ぼし、治療の感受性を高めるという報告が頭頸部以外の複数の領域の研究で明らかにされ始めている。本研究は、頭頸部癌におけるがん幹細胞と COX-2 の関係を解明するとともに、選択的 COX-2 阻害薬ががん幹細胞に与える影響を明らかにすることで、同薬が頭頸部癌治療に提供しうる新たな可能性について検討することを目的としている。

３．研究の方法

（１）COX-2 発現と化学療法抵抗性の関連

慶應義塾大学医学部耳鼻咽喉科にて導入化学療法を行った下咽頭癌症例を対象に、治療前の生検検体を用いて、免疫組織学的に COX-2 の発現の程度を確認する。発現の程度は tissue studio というソフトウエアを用いて定量化する。同じ症例で、導入化学療法を施行後に原発切除した検体を用いて、導入化学療法の組織学的な効果判定を確認する。

（２）選択的 COX-2 阻害薬による stemness property 制御機構の検討

頭頸部癌細胞における COX-2 阻害薬による stemness property の制御機構を明らかにする。
これまで、我々は、頭頸部扁平上皮癌細胞株である、FaDu と Detroit562 を用いて、選択的 COX-2 阻害薬である celecoxib(Toronto Research Chemicals,Canada)の負荷試験を行い、がん幹細胞関連遺伝子（Oct3/4、Nanog）の発現量をする。それぞれの細胞株に対して、コントロールとして DMSO を用い、celecoxib（50μM）6 時間、12 時間の負荷実験を行い、DMSO を基準とした場合、celecoxib 投与により Oct3/4 と Nanog といった幹細胞関連遺伝子の発現の変化を mRNA レベルで real time PCR にて評価し、COX-2 阻害薬が stemness property を制御する仕組みについて解明していく。

（３）選択的 COX-2 阻害薬による薬剤感受性への影響の評価及び stemness property の関与の検討

頭頸部癌治療におけるキードラッグの一つである docetaxel の感受性における選択的 COX-2 阻害薬の効果について評価する。頭頸部癌細胞株(FaDu, Detroit562)を用いて docetaxel の薬剤感受性テストを行う。すなわち docetaxel について 1nM，10nM，100nM，1μM、10μM，100μM，1mM の濃度で培養し、MTS アッセイで細胞生存率を評価する。続いて docetaxel+celecoxib、で同様の薬剤感受性評価を行う。
さらに ultra low attachment plate を用いて、Anchorage independent の細胞増殖能について celecoxib 投与の影響を評価することで、COX-2 阻害薬により生じる腫瘍細胞の stemness property への効果について解析を行う。

４．研究成果

（１）下咽頭癌症例において、治療前の生検検体における COX-2 発現の多い症例ほど、導入化学療法の組織学的治療効果判定が低いという結果であった。（図 3）つまり、COX-2 発現が高い症例ほど、docetaxel を含む化学療法に対して薬剤抵抗性が高いという結果であった。

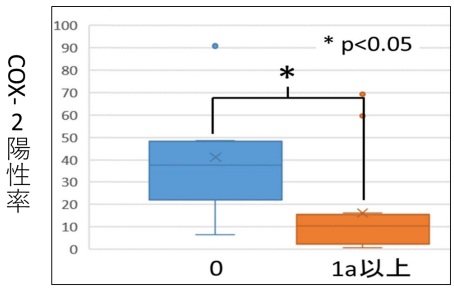


図 3 組織学的治療効果判定

（２）頭頸部癌細胞株を用いて、celecoxib50μM の薬剤負荷を行うと、12 時間で oct や nanog といった幹細胞関連遺伝子発現が低下することが確認された。（図 4）つまり、celcoxib の投与により、mRNA レベルで幹細胞関連遺伝子発現の変化が生じることを確認した。

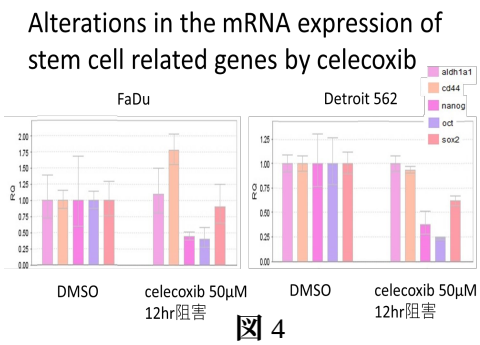


図 4

（３）頭頸部癌細胞株を用いて、docetaxel 単剤と docetaxel と celecoxib10μM（＝細胞毒性を伴わない濃度）を投与した際の生存曲線を確認した所、celecoxib を投与した方が、有意に生存曲線が左方に移動する傾向であった。（図 5）つまり、celecoxib の投与により、docetaxel に対する薬剤抵抗性を改善させる可能性があることが確認された。

また、頭頸部癌細胞株を ultra low attachment plate に培養すると、DMSO 投与のコントロール群に比べて、celecoxib 投与の方が、その性質が抑制されることを確認した。（図 6）つまり、celecoxib の投与により、幹細胞形質の一つである anchorage independent な増殖が阻害されることが確認できた。

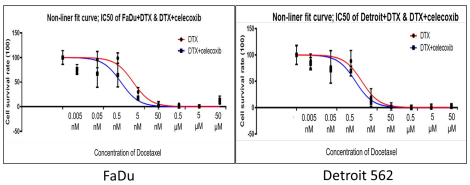


図 5

（４）今後の展望

今回の研究で COX-2 とがん幹細胞の関連が示唆される結果であった。これらの結果は他の癌腫における先行研究とほぼ同等の結果であった。しかし、他癌腫における phase2/3 の臨床試験では抗癌治療において COX-2 阻害薬の上乗せ効果は確認できていない。その原因の一つとして、COX-2 阻害薬の多岐にわたる作用が考えられている。具体的には、アラキドン酸カスケードの下流の PGE2 の受容体である EP1-4 の作用はそれぞれ異なることが知られている。アラキドン酸カスケードのどの部分が実際にがん幹細胞の維持に関係しているかを特定することで、より効果的な治療方法を開発できる可能性があると考えている。

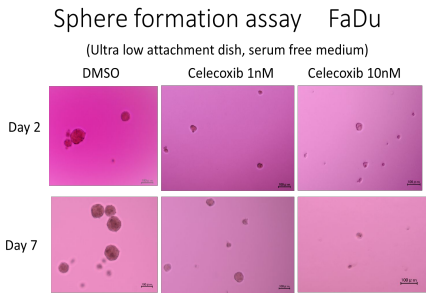


図 6

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計　０　件）

〔学会発表〕（計　２　件）

1. 斎藤真、頭頸部扁平上皮癌における COX-2 発現とがん幹細胞形質を介した化学療法抵抗性の関連の検討、第 119 回日本耳鼻咽喉科学会、2018 年

2. S. Saito, COX-2 expression is associated with chemoresistance through cancer stem property in head and neck squamous cell carcinoma. AACR annual meeting 2018

〔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
特になし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。