

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：17301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07076

研究課題名(和文) KPU-300併用放射線増感療法抵抗性な口腔癌細胞株の放射線抵抗因子に関する解析

研究課題名(英文) Factors of radioresistance for oral cancer cells which were treated with KPU-300 radiosensitizing therapy.

研究代表者

奥山 紘平 (OKUYAMA, Kohei)

長崎大学・病院(歯学系)・助教

研究者番号：30781968

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、Fucci (Fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator) を導入し、細胞周期動態をきたままリアルタイムで可視化した舌癌細胞株を用いて、微小管阻害剤・放射線増感剤として報告されているKPU-300の細胞周期動態に与える影響と放射線増感治療戦略について解析した。KPU-300存在下にSAS-Fucci細胞をタイムラプス撮影すると、多くの細胞が死ぬものの、KPU-300抵抗性の生存したSAS-Fucci細胞も混在していた。死んだ細胞はコロニー上に一塊にまとまり、その周囲から絶えず細胞増殖し、M期での同調は得られなかった。

研究成果の概要(英文)：KPU-300 is a novel colchicine-type anti-microtubule agent derived from pulinabulin (NPI-2358). We characterized the effects of KPU-300 on cell cycle kinetics and radiosensitization using SAS cells, oral tongue cancer cell line, expressing the fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator (Fucci). KPU-300 was reported as a potent radiosensitizer which is due to the synchronization of cells in M phase. However, SAS-Fucci cells did not do that; cells tend to be arrested in G1 phase and dead cells were gathered with the center of colony.

研究分野：口腔がん

キーワード：Fucci 舌癌 細胞周期 放射線増感 微小管重合阻害 M期 KPU-300

1. 研究開始当初の背景

細胞周期を可視化する Fucci (fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator) を導入した HeLa 細胞(以下、HeLa-Fucci 細胞)を用いて、新規合成された 2-ピリジン基を有するペンゾフェノン-ジケトピペラジン型微小管重合阻害剤 KPU-300 による細胞周期動態に及ぼす影響並びに放射線感受性に対する影響を解析した。まず、HeLa-Fucci 細胞に 30 nM で 16 時間 KPU-300 を作用させた後、 β チューブリンを免疫染色すると、ほぼすべての M 期細胞において紡錘糸の形成阻害を認めた。フローサイトメトリーにより DNA 量、Fucci の蛍光を解析したところ、30 nM 以上の KPU-300 で処理されたほぼ全ての細胞は、M 期に同調することを確認した。一方、30 nM の KPU-300 を作用させることにより、M 期の丸い形態を呈したまま Fucci の mAG と mKO2 が同時発現する異常蛍光が出現し、M 期のマーカーであるリン酸化ヒストン H3 も同等に推移した。この Fucci の異常蛍光は初期 M 期にあることを過去に報告している(Honda-Uezono et al.BBRC,2012)。フローサイトメトリー上では、30 nM の KPU-300 を 24 時間作用後、Fucci の正常な分画とは明らかに区別できる分画(緑色および赤色の同時陽性)にほぼすべての細胞が分布した。この異常蛍光はスフェロイドにおいても観察されたが、スフェロイド内部を構成する G0 期にある静止細胞は、薬剤処理後に増殖期に移行し、M 期まで進め、同調させることが分かった。単層培養下での放射線照射との併用では、30 nM 以上の濃度の KPU-300 を 16 時間以上作用させた後に照射が行われた場合、放射線増感効果を認めた。この増感効果は KPU-300 による細胞周期の M 期への同調に起因すると考えられた。これを検証すべく、M 期細胞を分離する shake-off 法を用いたが、この方法だけでは多くの初期 G1 期細胞が混入することがわかった。そこで、Fucci の蛍光特性を組み合わせることでソーティングを行い、M 期初期の細胞を分離した。この細胞に 4 Gy 照射して得られた生存率は、KPU-300 によって M 期に同調した細胞に 4 Gy を照射して得られた生存率を補正したものと一致し、KPU-300 の放射線増感効果は、M 期初期への同調に起因することが示された。VDA は固形腫瘍内部の未熟な血管内皮細胞に特異的に作用して腫瘍血管を遮断し、中心部に広範な壊死を生じる。一方、腫瘍辺縁部の比較的成熟度の高い血管は VDA 抵抗性のため、同部からの腫瘍再発が問題となる。従って、VDA と放射線の併用では、放射線の腫瘍辺縁部への効果のみを考慮すればよいことになる。本研究で、スフェロイドを用いた実験に見られたように、KPU-300 処理により、増殖の盛んな外層の細胞間結合が疎になり、あるいは細胞死が起こり、低酸素細胞分画に酸素が到達することで再酸素化が生じ、引き続き増殖期へのリクルートメントが起

ると、KPU-300 による M 期初期への同調が誘導される。腫瘍周辺部においても腫瘍血管から 70~100 μ m 離れた領域では低酸素分画が存在するので、M 期初期に同調したこのタイミングで放射線を照射すれば、本薬剤が奏功しない腫瘍辺縁部における再酸素化と放射線感受性周期相への同調という効果的な放射線増感が期待できるものと考えられた。

2. 研究の目的

KPU-300 の水溶性プロドラッグ(KPU-300WA)が合成されている。現在、口腔がん治療は臨床における専門分野であり、中でも舌癌細胞株である SAS に着目した。以前所属していた東京医科歯科大学大学院歯学総合研究科口腔放射線治療学分野では、SAS に Fucci を導入した SAS-Fucci 細胞株の樹立に成功しており、HeLa-Fucci 細胞の他、本細胞を用いても KPU-300WA への毒性や放射線増感効果を検証することとした。予備実験として KPU-300WA(30nM)を 24 時間 SAS-Fucci 細胞に作用させた後に MTT アッセイにて生存率を求めたところ、HeLa-Fucci 細胞と同程度であったが、KPU-300WA 作用後に放射線照射し、コロニー形成法によって生存率を求めると、HeLa-Fucci 細胞でみられた放射線増感効果は得られなかった。すなわち、細胞株間の KPU-300WA の反応性に解離を認めた。SAS-Fucci 細胞で放射線増感が得られなかった原因を検索し、その因子を阻害することで KPU-300WA を用いた放射線増感効果を得るための方法について検討することを本課題の目的とした。

3. 研究の方法

SAS-Fucci 細胞に KPU-300WA を 24 時間作用後、コロニー形成法および MTT アッセイを行い、生存率を求める。続いて、KPU-300WA 存在下にタイムラプス撮影にて Fucci の動態を観察する。またはフローサイトメトリーを用いて Fucci の蛍光動態を定量解析する他、Western blotting によって Fucci の蛍光タンパクの定量解析を行う。初期 M 期細胞の定量についてはリン酸化ヒストン H3 の免疫染色法を用い、フローサイトメトリー上で解析する。実際、SAS-Fucci 細胞を用いてコロニー形成法による KPU-300 の放射線増感効果を評価すると、HeLa-Fucci 細胞にみられた M 期への同調を起因とする強力な放射線増感は得られなかった。これには KPU-300WA の効果を排除する SAS-Fucci 細胞に備えられたいくつかの防御機構があると考えられた。まず第一に、損傷した DNA 二重鎖切断(DSB: Double strand break)修復力が高い可能性が挙げられる。つまり DSB ダメージ応答、DNA 修復タンパクの合成・輸送が KPU-300WA の影響を受けないことが考えられる。これら主要な DNA 修復タンパク(γ H2AX, 53BP1 等)の発現を Western blotting を用いて定量解析し、この

仮説の是非を検証する。第二に、細胞内に取り込まれた KPU-300WA の細胞膜外への排出ポンプ機能が高い可能性も考えられ、この機能の仕組みが特定できれば、KPU-300WA 抵抗因子が特定できる。これについては Western blotting によるタンパク発現の定量解析を行う。タンパクが特定できれば、不活化後に KPU-300WA 存在下にタイムラプス像を撮影する。その結果、KPU-300WA の効果が十分に作用するようになり、これまで確認できなかった SAS-Fucci 細胞の M 期への同調や、Fucci の異常蛍光を確認できるようになるといふ仮説を検証し、過去の報告(Okuyama et al. PLoS One e0145995,2015)のように、それらに起因した強力な放射線増感効果を付与できる可能性がある。さらに、その他の未知の因子が KPU-300WA 抵抗性を生じている可能性も否定できないが、前者の実験結果を踏まえて適宜必要な実験計画を立案する。その他、免疫組織化学染色や免疫沈降反応を用いることによって標的タンパクが結合している特異的ゲノム DNA 断片をみたり、DNA の増幅領域を特定することができる。このように多方面から遺伝子・タンパク発現の検討が可能である。

KPU-300 に対する SAS-Fucci 細胞の主要な防御機構を探り、それらを阻害することで SAS-Fucci 細胞、ひいては微小管重合阻害剤抵抗性な各種細胞系についても、細胞周期を M 期へ同調させて放射線増感効果を与える方法を特定する。

4. 研究成果

KPU-300WA 存在下に SAS-Fucci 細胞をタイムラプス撮影すると、確かに多くの細胞が死ぬものの、KPU-300WA 抵抗性の生存した SAS-Fucci 細胞も少なからず混在していた。それらは G2/M 期を示す緑色細胞が多い傾向にあった。また死んだ細胞はコロニー上に一塊にまとまり、その直下もしくは周囲から絶えず細胞が増殖する様子がみられ、最終的には HeLa-Fucci 細胞でのタイムラプス像に見られたような M 期で同調する様子は見られなかった。さらに、この現象は SAS-Fucci 細胞にモノクローナル抗体である Cetuximab を作用させた場合においても認められたことから、KPU-300WA 特異的な現象ではないことが分かった。詳細を見てみると、Cetuximab 存在下に SAS-Fucci 細胞の培養を開始し、5 日程度までは単調に増殖してコロニーを形成するが、それ以上コロニーは増大しなかった。また、Cetuximab 群では、投与 120 時間経過時には、コロニー内の大半の細胞が G1 期で停止していることが明らかとなった。両者には G2/M 期の緑色細胞優位となるか G1 期の赤色細胞優位となるかの違いはあるものの、コロニーの動態としては同様の現象である。この現象を解明し、放射線抵抗性である G1 期を脱する因子が解明されれば、KPU-300WA を併用して放射線感受性である

M 期へ細胞周期を同調させる方法が可能となり、今後の検討課題としている。

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 9 件)

1. Okuyama K, Yamashiro M, Kaida A, Kawamata A, Mizutani M, Michi Y, Uzawa N, Yano T, Tohyama R, Yamaguchi S. Does a Vascularized Fibula Free Bone Grafted Immediately After Hemimandibulectomy in a Child Grow or Relapse During Adolescence? J Craniofac Surg in Press. 査読あり
2. Okuyama K, Yanamoto S, Naruse T, Sakamoto Y, Rokutanda S, Ohba S, Asahina I, Umeda M. Clinical complications in the application of polyglycolic acid sheets with fibrin glue after resection of mucosal lesions in oral cavity. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol 125:541-546, 2018. 査読あり
3. Naruse T, Tokuhisa M, Yanamoto S, Sakamoto Y, Okuyama K, Tsuchihashi H, Umeda M. Lower gingival squamous cell carcinoma with brain metastasis during long-term cetuximab treatment: A case report. Oncol Lett 15: 7158-7162, 2018. 査読あり
4. Okuyama K, Sakamoto Y, Naruse T, Yanamoto S, Umeda M. Tooth extraction in a patient after autologous skeletal myoblast sheet transplantation for severe dilated cardiomyopathy. Ann Med Surg 15:34-36, 2017. 査読あり
5. Okuyama K, Fujita S, Yanamoto S, Naruse T, Sakamoto Y, Kawakita A, Omori K, Tsuchihashi H, Umeda M. Unusual recurrent tongue spindle cell carcinoma with marked anaplasia occurring at the site of glossectomy for a well-differentiated squamous cell carcinoma: A case report. Mol Clin Oncol 7:341-346, 2017. 査読あり
6. Okuyama K, Sakamoto Y, Naruse T, Kawakita A, Yanamoto S, Furukawa K, Umeda M. Intraoral extraction of an ectopic mandibular third molar detected in the subcondylar region without a pathological cause: A case report and literature review. Cranio 35:327-331, 2017. 査読あり
7. Naruse T, Yanamoto S, Okuyama K, Yamashita K, Omori K, Nakao Y, Yamada SI, Umeda M. Therapeutic implication of mTORC2 in oral squamous cell carcinoma. Oral Oncol 65:23-32, 2017. 査読あり
8. Kim Y, Okuyama K, Michi Y, Ohyama Y, Uzawa N, Yamaguchi S. Potential factors influencing the development of oral tongue squamous cell carcinoma in young mature patients: Lingual position of the mandibular second molar and narrow tongue space. Oncol Lett 14:7339-7343, 2017. 査読あり
9. Okuyama K, Michi Y, Mizutani M, Yamashiro M, Kaida A, Harada K. Clinical study on

mandibular fracture after marginal resection of the mandible. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol 121:461-7, 2016. 査読あり

〔学会発表〕(計 21 件)

1. 福嶋大将, 奥山紘平, 土橋宏輝, 鳴瀬智史, 柳本惣市, 梅田正博. 下顎歯肉扁平上皮癌の骨髓浸潤先端組織における CD44v6 および IL-6 の発現に関する臨床的・免疫組織化学的解析. 第 36 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会, 2018 年 1 月 25-26 日, 新潟市.
2. 古川浩平, 柚島宏和, 五月女さき子, 林田咲, 奥山紘平, 鳴瀬智史, 柳本惣市, 川崎五郎, 梅田正博. 周術期口腔機能管理中に Numb-chin 症候群を発症し、多発性骨髓腫の再燃を早期に発見した 1 例. 第 36 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会, 2018 年 1 月 25-26 日, 新潟市.
3. 奥山紘平, 柳本惣市, 鳴瀬智史, 六反田 賢, 坂本由紀, 大場誠悟, 朝比奈 泉, 梅田正博. 口腔術後創におけるポリグリコール酸シート被覆後に認められた乳頭状肉芽形成に関する臨床的検討. 第 36 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会, 2018 年 1 月 25-26 日, 新潟市.
4. 土橋宏輝, 鳴瀬智史, 奥山紘平, 赤星僚一, 津田翔真, 古川浩平, 柳本惣市, 梅田正博. 放射線性顎骨骨髓炎により広範な皮膚壊死を生じた顎部壊死性筋膜炎の 1 例. 第 50 回日本口腔科学会九州地方部会, 2017 年 11 月 25 日, 福岡市.
5. 奥山紘平, 柳本惣市, 鳴瀬智史, 土橋宏輝, 梅田正博. 早期舌扁平上皮癌における Cancer-associated Fibroblast の発現と腫瘍上皮の未分化部分転化機構に関する解析. 第 62 回日本口腔外科学会総会・学術大会, 2017 年 10 月 20-22 日, 京都市.
6. 鳴瀬智史, 柳本惣市, 奥山紘平, 土橋宏輝, 古川浩平, 梅田正博. 舌癌患者における好中球・リンパ球比の予後予測因子としての有用性に関する検討. 第 62 回日本口腔外科学会総会・学術大会, 2017 年 10 月 20-22 日, 京都市.
7. 古川浩平, 鳴瀬智史, 土橋宏輝, 奥山紘平, 柳本惣市, 川崎五郎, 梅田正博. 舌癌患者の予後予測における術前末梢血リンパ球数・単球数比の検討. 第 62 回日本口腔外科学会総会・学術大会, 2017 年 10 月 20-22 日, 京都市.
8. 鳴瀬智史, 柳本惣市, 奥山紘平, 土橋宏輝, 津田翔真, 梅田正博. 切除困難な下顎歯肉癌顎部リンパ節転移に対し Cetuximab 併用 FP 療法中に発症した肺塞栓症の 1 例. 第 21 回九州地区口腔癌研究会, 2017 年 7 月 7 日, 鹿児島市.
9. Naruse T, Yanamoto S, Okuyama K, Yamashita K, Umeda M. Therapeutic implication of mTORC2 in oral squamous cell carcinoma. 6th World Congress of the International Academy of Oral Oncology, May 2017, Bangalore.
10. 足立真基, 坂本由紀, 古川浩平, 奥山紘

平, 柳本惣市, 梅田正博. 顎関節強直症を伴った SAPHO 症候群の 1 例. 第 71 回日本口腔科学会学術集会, 2017 年 4 月 26-27 日, 松山市.

11. 奥山紘平, 柳本惣市, 鳴瀬智史, 土橋宏輝, 品川兼一, 梅田正博. 早期舌扁平上皮癌の腫瘍浸潤先端部における Cancer-associated fibroblasts の発現に関する解析. 第 71 回日本口腔科学会学術集会, 2017 年 4 月 26-27 日, 松山市.
12. 奥山紘平, 山口 聡. 分類不能型免疫不全症患者に対して観血的歯科治療を施行した 1 例. 第 26 回日本有病者歯科医療学会総会・学術大会, 2017 年 3 月 4-5 日, 金沢市.
13. Sakamoto Y, Matsushita Y, Yanamoto S, Okuyama K, Naruse T, Umeda M. Eating function of the cases treated with dental implant after resection of oral cancer. 5th Congress of Asian Society of Head and Neck Oncology. March 2017, Bali.
14. 奥山紘平, 柳本惣市, 坂本由紀, 鳴瀬智史, 川北晃子, 大場誠悟, 朝比奈 泉, 梅田正博. 口腔がん化学療法におけるペグフィルグラスチムの使用経験. 第 35 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会, 2017 年 1 月 26-27 日, 福岡市.
15. 坂本由紀, 柳本惣市, 奥山紘平, 足立真基, 鳴瀬智史, 梅田正博. 舌に発生した未分化癌の 1 例. 第 35 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会, 2017 年 1 月 26-27 日, 福岡市.
16. 土橋宏輝, 鳴瀬智史, 柳本惣市, 奥山紘平, 山下健太郎, 梅田正博. 早期舌癌顎部後発転移における転移抑制遺伝子 NME1 の発現に関する免疫組織学的検討. 第 35 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会, 2017 年 1 月 26-27 日, 福岡市.
17. 奥山紘平, 柳本惣市, 鳴瀬智史, 川北晃子, 坂本由紀, 土橋宏輝, 藤田修一, 池田通, 梅田正博. 舌扁平上皮癌切除 4 年後に扁平上皮癌成分を含有する未分化肉腫として局所再発した 1 例. 第 61 回日本口腔外科学会総会・学術大会, 2016 年 11 月 25-27 日, 千葉市.
18. 金 裕純, 奥山紘平, 道 泰之, 大山巖雄, 鶴澤成一, 山口 聡. 50 歳未満の舌癌誘発因子としての患側下顎第二大臼歯の舌側傾斜と舌房面積の狭小. 第 61 回日本口腔外科学会総会・学術大会, 2016 年 11 月 25-27 日, 千葉市.
19. 坂本由紀, 柳本惣市, 奥山紘平, 鳴瀬智史, 梅田正博. 口腔扁平上皮癌の両側リンパ節転移(N2c)症例に関する臨床的検討. 第 61 回日本口腔外科学会総会・学術大会, 2016 年 11 月 25-27 日, 千葉市.
20. 鳴瀬智史, 柳本惣市, 奥山紘平, 大森景介, 山下健太郎, 土橋宏輝, 川北晃子, 坂本由紀, 山田慎一, 梅田正博. 舌癌における PD-1/PD-L1 の発現に関する免疫組織学的検討: 特に局所再発との関係について. 第 61 回日本口腔外科学会総会・学術大会, 2016 年

11月25-27日，千葉市。

21. 古川浩平，奥山紘平，坂本由紀，鳴瀬智史，川北晃子，柳本惣市，梅田正博。下顎枝後縁に認められた異所性下顎埋伏智歯の1例。第49回NPO法人日本口腔科学会九州地方部会，2016年10月15日，那覇市。

〔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

<http://oms-nagasaki.wixsite.com/clin-oral-oncol>

6. 研究組織

(1)研究代表者

奥山 紘平 (OKUYAMA, Kohei)
長崎大学・病院(歯学系)・助教
研究者番号：30781968

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

鈴木 啓司 (SUZUKI, Keiji)
長崎大学・原爆後障害医療研究所・准教授
研究者番号：00196809