

令和元年6月17日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20581

研究課題名(和文) 抗癌剤耐性口腔扁平上皮癌細胞に対する免疫チェックポイント阻害剤併用療法の開発

研究課題名(英文) Development of the combined therapy with an immune check point inhibitor against anticancer agent-resistant oral squamous cell carcinoma cells

研究代表者

Ferdous Tarannum (Ferdous, Tarannum)

山口大学・医学部附属病院・学術研究員

研究者番号：70647932

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：抗癌剤(5-FU, Cisplatin)または分子標的薬(Cetuximab)耐性口腔扁平上皮癌細胞を作製し、それぞれマウスに移植して各薬剤の耐性腫瘍を作製し、免疫チェックポイント阻害剤(マウス抗PD-1抗体)を投与すると、抗PD-1抗体は抗腫瘍効果を発現し、各薬剤に対して感受性が乏しい状況であっても、抗PD-1抗体と併用することで抗腫瘍効果を増強できた。また薬剤耐性腫瘍に対して、Cetuximabは5-FUやシスプラチンよりもマウス抗PD-1抗体との併用効果が大きかった。以上より、現在免疫チェックポイント阻害剤が単剤投与されているが、抗癌剤や分子標的薬との併用療法は有効性が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果から、薬剤耐性腫瘍に対しても免疫チェックポイント阻害剤は抗腫瘍効果を発現可能であり、抗癌剤や分子標的治療薬との併用ではさらに抗腫瘍効果が増強される可能性が示唆された。免疫チェックポイント阻害剤ニボルマブの1サイクルの治療費は当初5000万円、薬価が下がった現状でさえも2000万円近くまで必要である。またニボルマブが第一選択として使用できない現状では、ニボルマブの奏功率は20%程度でしかない。そこで医療経済学的観点から、また臨床的有用性の点からも、難治性口腔癌に対する適切な治療レジメンの開発が望まれるが、単剤投与では限界があるが、抗癌剤や分子標的薬との併用療法は今後大きく期待できる。

研究成果の概要(英文)：We established anticancer agent (5-FU or Cisplatin; CDDP)-resistant or molecular-targeted agent (Cetuximab; CET)-resistant oral squamous cell carcinoma cells to develop each drug-resistant tumors. 5-FU, CDDP or CET-resistant tumors showed low sensitivity to each agent. Then these tumors were treated with immune check point inhibitors (anti-PD-1 antibody; ICPI) alone or in combination with 5-FU, CDDP or CET. Single-agent administration of ICPI showed moderate level of antitumor effect against each type of resistant tumors. Moreover, ICPI in combination with 5-FU, CDDP or CET showed enhanced antitumor effect than each agent alone. Among all of these drug combinations, ICPI showed the highest level of anti-tumor effect in combination with CET than 5-FU or CDDP. Above findings suggested that, single-agent administration of ICPI could be effective against drug-resistant tumors, and its antitumor effect could be further enhanced when combined with other anticancer agents.

研究分野：口腔腫瘍

キーワード：PD-1 5-FU cisplatin cetuximab drug resistance

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、癌治療における4本目の柱として免疫療法が脚光を浴びている。これは、癌細胞が免疫反応から回避するメカニズムを抑える免疫チェックポイント阻害剤と呼ばれる Nivolumab と Ipilimumab が根治切除不能な悪性黒色腫に対して国内で認可されたことによる。希少癌ではあるが、再発・転移しやすい悪性黒色腫に対する1年生存率は Nivolumab 単剤が 73%、Ipilimumab 単剤が 80%、Nivolumab と Ipilimumab の併用で 85%と報告され、これまで使用されていた Dacarbazine をはるかに凌駕する治療成績である。Nivolumab は、癌細胞が免疫から身を守ろうとする Programmed death-1(PD-1)/ PD-ligand 1 (PD-L1) pathway を阻害可能なヒト PD-1 に対するモノクローナル抗体である。Nivolumab は、癌細胞に直接作用するのではなく、ヒトが本来持つ免疫反応を調節して癌と戦うというコンセプトの薬剤であり、難治性腫瘍に対して劇的な治療効果を示すというエビデンスが蓄積されてきたことから、難治性扁平上皮非小細胞肺癌、多形性膠芽腫、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、肝細胞癌および膀胱癌など広範囲な適応で臨床試験が進んでいる。頭頸部癌においてもプラチナ製剤抵抗性の再発又は転移性頭頸部扁平上皮癌患者を対象とした Nivolumab の臨床第 相臨床試験が終了し、2017年3月から口腔癌も含めた頭頸部癌で使用が認可された。これでまた一つ有望な治療オプションが加わったものの、Nivolumab は高価であり、当初の1/4程に薬価が下げられたとはいえ、既存の抗癌剤より遥かに高価である。そこで、抗癌剤や分子標的薬と併用することで、抗腫瘍効果を高めるだけでなく Nivolumab の投与量の減少につなげることは、医療経済的にも重要である。また、Nivolumab の Responder を見分けるための Biomarker が不明確なことも現状の大きな問題点となっている。すなわち、腎臓癌、食道癌、胃癌、尿路上皮癌、膵臓癌、悪性黒色腫において PD-L1 の高発現が予後不良と強く関連することが報告されており、我々も唾液腺癌における PD-L1 の高発現が予後不良につながることを報告した。しかしながら、現時点では相反する意見があり、PD-L1 の発現は Nivolumab の Biomarker としてコンセンサスが得られていない。近い将来口腔癌への使用が可能となる Nivolumab の有用な Biomarker の探索と、難治性口腔癌に対する Nivolumab 併用療法の開発が、当初急務であると考えた。

### 2. 研究の目的

抗癌剤 (5-FU、Cisplatin) または分子標的薬 (Cetuximab) 耐性口腔扁平上皮癌細胞に対する免疫チェックポイント阻害剤併用療法の開発を第一の目的とし、免疫チェックポイント阻害剤のバイオマーカーの探索を第二の目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) Nivolumab は、ヒトリンパ球を介してヒト癌細胞に作用するため、動物実験には使用できないため、まずマウス用抗 PD-1 抗体を用いたマウス実験モデルの作製を行う。すなわち、薬剤耐性マウス扁平上皮癌細胞株(SCC /FU、SC /CDDP、SCC /CET)を樹立し、親株 SCC ならびに薬剤耐性株(SCC /FU、SC /CDDP、SCC /CET)を C3H/HeN マウスに移植して安定したマウス腫瘍の作製を目指す。

(2) 上記マウス実験モデルを用いて、マウス用抗 PD-1 抗体単剤あるいは5-FU、Cisplatin または Cetuximab の何れかとの併用療法を行い、顕著な抗腫瘍効果を発現できる治療レジメンを検討する。

(3) マウス用抗 PD-1 抗体が最も奏効したマウス腫瘍と最も奏効しなかったマウス腫瘍を選別し、それぞれから Total RNA と蛋白を抽出し、マイクロアレイ解析に加え、パスウェイ解析とプロテオミクス解析を用いて、両者間で特異的発現変動する遺伝子・蛋白を検索することによるマウス用抗 PD-1 抗体の Biomarker の探索を行う。

### 4. 研究成果

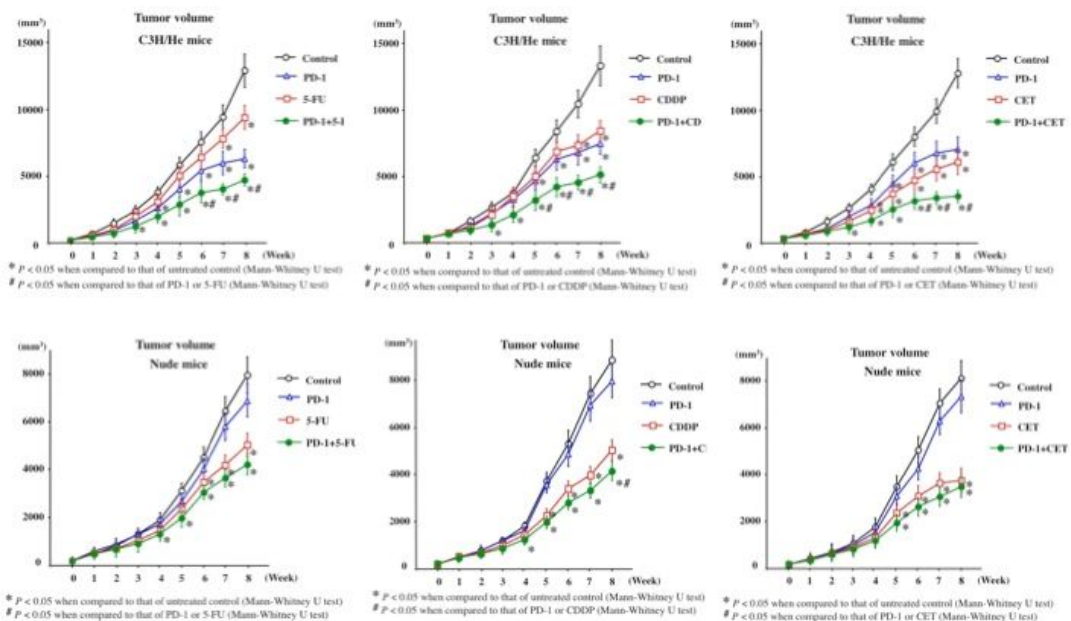
(1) これまでに SCC (C3H マウスより自然発生したマウス由来扁平上皮癌細胞株) を C3H 系マウスに移植するモデル(O'Malley et al., H & N Surg 1997) が応用されており、SCC を C3H/HeN のマウス咬筋へ移植することで、顎骨吸モデル(Cui, et al., Clin Cancer Res 2005)が報告されている。そこで SCC を C3H/He マウス背部皮下へ移植することで、マウス皮下腫瘍モデルを作製した(下図)。



次に、SCC を 5-FU、Cisplatin、Cetuximab で長期間処理することにより、各薬剤に対する耐性株 SCC /FU、SCC /CDDP、SCC /CET を作製した。さらにそれぞれの薬剤耐性株を C3H/He マウス背部皮下へ移植することで、マウス皮下腫瘍が作製されることを確認した。

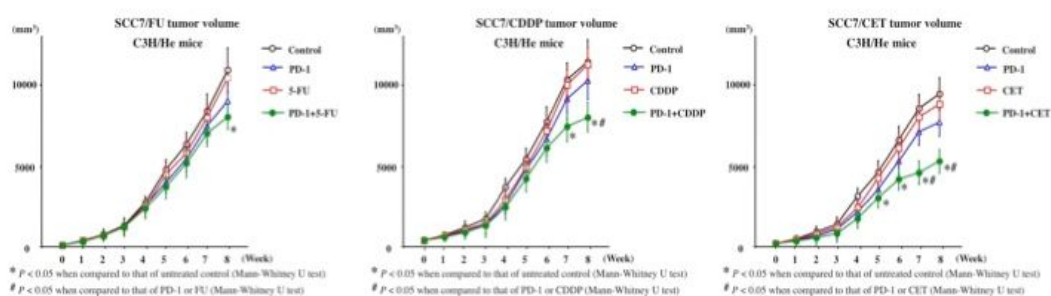
(2) 上記マウス実験モデルを用いて、SCC 腫瘍に対するマウス用抗PD-1抗体単剤あるいは5-FU、CisplatinまたはCetuximabの何れかとの併用療法を行った。すなわち、マウス抗PD-1抗体

20mg/kgを第1週目に、10mg/kgを第2週目以降に腹腔内投与を週1回継続、5-FU 20mg/kgを週2回腹腔内投与、シスプラチン 5mg/kgを週1回腹腔内投与、Cetuximab 20mg/kgを週2回腹腔内投与、+ の併用療法、+ の併用療法、+ の併用療法、の7つのレジメンを施行した。その結果、のPD-1抗体とCetuximabの併用療法が最も顕著な抗腫瘍効果



を示した。なお、ヌードマウスに移植して作製したSCC 腫瘍に対しては、マウス用抗PD-1抗体の抗腫瘍効果はほとんど見られなかった。

さらに、薬剤耐性腫瘍に対して上記①～ のレジメンを用いて、SCC /FU腫瘍には、を、SCC /CDDP腫瘍には、を、SCC /CET腫瘍には、を施行した。その結果、未処理対照の各薬剤耐性腫瘍と比較して、屠殺前の8週間の治療終了時、SCC /FU腫瘍においては約14.6%縮小、では約4.2%縮小、では約25.3%縮小を示した。またSCC /CDDP腫瘍においては約10.7%縮小、では約1.4%縮小、では約30.2%縮小を示した。さらにSCC /CET腫瘍においては約18.3%縮小、では約6.7%縮小、では約43.9%縮小を示した。すなわち、抗癌剤や分子標的薬の腫瘍に対して抗PD-1抗体は抗腫瘍効果を発現し、各薬剤に対して感受性が乏しい状況であっても、抗PD-1抗体と併用することで抗腫瘍効果を増強できる可能性が示唆された。薬剤耐性腫瘍に対しても、Cetuximabは5-FUやシスプラチンよりもマウス用抗PD-1抗体との併用効果が大きかった。



(3) 研究開始当初は、親株SCC と比較して低濃度の薬剤への長期間暴露により作製した耐性株は、すなわち各種抗癌剤や分子標的薬に対して耐性を獲得したSCC /FU, SCC /CDDP, SCC /CETは、遺伝子変異が蓄積している可能性があるため、抗PD-1抗体が著効すると期待していた。しかしながら、予想と反して、SCC 腫瘍と比較して、SCC /FU腫瘍も、SCC /CDDP腫瘍も、SCC /CET腫瘍も、抗PD-1抗体に対する感受性は、大きな差異を認めなかった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 13 件)

1. Harada K, Minami H, **Ferdous T**, Kato Y, Umeda H, Horinaga D, Uchida K, Park SC, Hanazawa H, Takahashi S, Ohota M, Matsumoto H, Maruta J, Kakutani H, Aritomi S, Shibuya K, Mishima K. The Elemental diet for chemoradiotherapy-induced oral mucositis: A prospective study in patients with oral squamous cell carcinoma. Mol Clin Oncol. 査読有り, 2019, 10, 159-167, doi: 10.3892/mco.2018.1769.

2. Harada K, **Ferdous T**, Minami H, Mishima K. Prognostic significance of FOXM1 in oral squamous cell carcinoma patients treated by docetaxel-containing regimens. *Mol Clin Oncol*. 査読有り、2019、10、29-36、 doi: 10.3892/mco.2018.1770.
3. Harada K, **Ferdous T**, Mizukami Y, Mishima K. Elemental diet inhibits pro-inflammatory cytokine production in keratinocytes through the suppression of NF- $\kappa$ B activation. *Oncol Rep*. 査読有り、2018、40、361-368、 doi: 10.3892/or.2018.6440.
4. Yamanouchi R, Harada K, **Ferdous T**, Ueyama Y. Low carbonyl reductase 1 expression is associated with poor prognosis in patients with oral squamous cell carcinoma. *Mol Clin Oncol*. 査読有り、2018、8、400-406、 doi: 10.3892/mco.2018.1548.
5. Harada K, **Ferdous T**, Ueyama Y. PD-L1 expression in malignant salivary gland tumors. *BMC Cancer*. 査読有り、2018、18、156、 doi: 10.1186/s12885-018-4069-3.
6. Harada K, **Ferdous T**, Kobayashi H, Ueyama Y. Elemental Diet Accelerates the Recovery From Oral Mucositis and Dermatitis Induced by 5-Fluorouracil Through the Induction of Fibroblast Growth Factor 2. *Integr Cancer Ther*. 査読有り、2018、17、423-430、 doi: 10.1177/1534735417721014.
7. Harada K, **Ferdous T**, Harada T, Takenawa T, Ueyama Y. Gimeracil enhances the antitumor effect of cisplatin in oral squamous cell carcinoma cells *in vitro* and *in vivo*. *Oncol Lett*. 査読有り、2017、14、3349-3356、 doi: 10.3892/ol.2017.6602.
8. Harada K, **Ferdous T**, Harada T, Ueyama Y. High expression of stathmin 1 is a strong prognostic marker in oral squamous cell carcinoma patients treated by docetaxel-containing regimens. *Clin Exp Med*. 査読有り、2017、17、45-50、 doi:10.1007/s10238-015-0403-0.
9. Harada K, **Ferdous T**, Ueyama Y. Therapeutic strategies with oral fluoropyrimidine anticancer agent, S-1 against oral cancer. *Jpn Dent Sci Rev*. 査読有り、2017、53、61-77、 doi: 10.1016/j.jdsr.2016.11.001.
10. Harada K, Takenawa T, **Ferdous T**, Kuramitsu Y, Ueyama Y. Calreticulin is a novel independent prognostic factor for oral squamous cell carcinoma. *Oncol Lett*. 査読有り、2017、13、4857-4862、 doi: 10.3892/ol.2017.6062.
11. Harada K, **Ferdous T**, Ueyama Y. Gimeracil Exerts Radiosensitizing Effects on Oral Squamous Cell Carcinoma Cells In Vitro and In Vivo. *Anticancer Res*. 査読有り、2016、36、5923-5930.
12. Harada K, **Ferdous T**, Cui D, Kuramitsu Y, Matsumoto T, Ikeda E, Okano H, Ueyama Y. Induction of artificial cancer stem cells from tongue cancer cells by defined reprogramming factors. *BMC Cancer*. 査読有り、2016 Jul 27;16:548. doi:10.1186/s12885-016-2416-9.
13. Harada K, **Ferdous T**, Harada T, Ueyama Y. Metformin in combination with 5-fluorouracil suppresses tumor growth by inhibiting the Warburg effect in human oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol*. 査読有り、2016、49、276-284、 doi:10.3892/ijo.2016.3523.

〔学会発表〕(計4件)

1. Koji Harada, Rieko Fujiwara, **Tarannum Ferdous**, Hirotsugu Umeda, Daijyu Horinaga, Kenichiro Uchida and Katsuaki Mishima、Expression of EpCAM in human oral squamous cell carcinoma、ACOMS、2018
2. Koji Harada, **Tarannum Ferdous**, Yoshiaki Kato, Hirotsugu Umeda, Daiju Horinaga, Kenichiro Uchida, SungChul Park, Hideki Hanazawa, Shotaro Takahashi, Misaki Ohta, Hiromi Matsumoto, Junko Maruta, Hiromi Kakutani, Keiko Shibuya, Katsuaki Mishima、Elemental diet Elental® against chemoradiotherapy-induced oral mucositis: a prospective study in patients with oral squamous cell carcinoma、日本癌治療学会、2018
3. **Tarannum Ferdous**, Koji Harada and Yoshiya Ueyama、High Expression of FOXM1 is a potential prognostic marker for oral squamous cell carcinoma patients treated by docetaxel-containing regimens、ESMO、2016

4. Takanori Takenawa, Koji Harada, Tarannum Ferdous and Yoshiya Ueyama, Expression of calreticulin is a novel independent prognostic factor for oral squamous cell carcinoma, ESMO, 2016

〔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：  
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：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：原田 耕志

ローマ字氏名： HARADA, Koji

研究協力者氏名：久野 高博

ローマ字氏名： HISANO, Takahiro

研究協力者氏名：藤原 里依子

ローマ字氏名： FUJIWARA, Rieko

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。