

平成 30 年 5 月 18 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20592

研究課題名(和文) 口腔がんにおけるCetuximab耐性機構解析と免疫療法併用による新規治療の開発

研究課題名(英文) Analysis of Cetuximab resistance mechanism in oral cancer and Development of a novel treatment by combining immunotherapy

研究代表者

永田 将士 (Nagata, Masashi)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師

研究者番号：10635791

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)：近年、分子標的薬における獲得耐性による治療効果の低下が問題となっている。我々は口腔扁平上皮がん細胞株にてCetuximab耐性株の樹立に成功した。耐性株を使用して耐性因子を検索したところ、標的であるEGFRおよび下流シグナルのリン酸化Aktが高発現である細胞が高感受性を示し、Cetuximab感受性とPI3K/Akt経路の因果関係が示唆された。また、分子標的薬はNK細胞によるADCC活性や、他の免疫細胞による細胞障害が重要な治療効果因子として働くことが示唆されているため、血液サンプルを用い免疫細胞の変化を確認したが、Cetuximabの効果との関連は認めなかった。

研究成果の概要(英文)：In recent years, reduction of therapeutic effect due to acquisition resistance in molecular targeted drugs has become a problem. We succeeded in establishing Cetuximab resistant cell line in oral squamous cell carcinoma. We recognized cells with high expression of target EGFR and downstream signal phosphorylated Akt showed high sensitivity, suggesting a causal relationship between Cetuximab sensitivity and PI3K / Akt pathway. In addition, since it is suggested that ADCC activity by NK cells and cytotoxicity by other immune cells act as important therapeutic effect factors for molecular targeted drugs, changes in immune cells were confirmed using blood samples, but there was no association with the effect of Cetuximab.

研究分野：抗がん剤耐性

キーワード：分子標的薬 抗がん剤耐性 EGFR ADCC活性

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 口腔癌の現状と薬剤耐性について

口腔扁平上皮癌 (OSCC) では、cisplatin (CDDP) を含む白金製剤と代謝拮抗剤である 5-FU 系抗がん剤が汎用されている。およそ 10%~20% の患者では抗がん剤の効果が乏しく、長い間頭頸部がん領域において、新たな治療薬が強く望まれていた。2012 年に、アービタックス®における頭頸部がんの適応追加承認取得され、局所進行扁平上皮頭頸部がん (以下、LA-SCCHN) と再発又は転移性扁平上皮頭頸部がんに対し、放射線療法との併用や、5-FU や白金系抗がん剤との併用をすることが、新たな治療戦略となった。

近年、多くの領域にて分子標的薬の応用が行われているが、分子標的薬における獲得耐性による治療効果の低下が問題となっており、基礎研究が成されている。申請者らも、2013 年より Merck より Cetuximab の薬剤提供を獲得し、口腔扁平上皮がん細胞株にて Cetuximab 耐性株の樹立に成功した。耐性株や多数の口腔扁平上皮がん細胞株を使用して、Cetuximab 感受性を確認し、耐性因子を検索したところ、標的である EGFR が高発現である細胞が、Cetuximab に感受性を示し、下流のシグナルでは p-Akt も同様に高発現しており、Cetuximab 感受性と、PI3K/Akt 経路の因果関係が示唆された。また、既存の抗腫瘍薬と違い、分子標的薬は NK 細胞による ADCC 活性や、他の免疫細胞による細胞障害が重要な治療効果因子として働くことが注目されている。申請者らも、In vitro における結果と、実際の臨床像が乖離している印象があり、今後は実際の患者検体を用い、感受性を規定する因子を腫瘍自体からのみでなく、腫瘍周囲環境因子や宿主因子など多角的な検討を行い、さらにはより感受性を高める他の治療法との併用を提示することができる考えた。当科は口腔がん唯一腫瘍ペプチド療法を臨床で可動させており、免疫チームとの共同研究にて耐性メカニズムの検索から、耐性解除のための新規治療プロトコルを構築し、抗腫瘍効果の増強および予後の改善を図ることができると考えた。

また、実臨床では Cetuximab の単剤での使用は少なく、再発・転移症例に対しては Cetuximab に加え他の抗腫瘍薬を加えて治療が行われる。また、切除不能症例に対しては Cetuximab に加え放射線照射が施行される。我々はこれまでに抗がん剤耐性細胞株を樹立し、抗アポトーシスタンパクである cellular inhibitor of apoptosis protein 2 (cIAP2) の高発現が 5-FU への獲得耐性に関与することや、癌抑制因子である FBXW7 (F-box and WD repeat domain containing-7) の発現低下と化学放射線療法の治療効果との関係を明らかにした。また、放射線耐性株を使用し、放射線獲得耐

性への Interleukin-6/Nrf2 antioxidant pathway の関与を報告した。これらの因子関しても Cetuximab 耐性との関連性を検討する必要があると考えた。

## 2. 研究の目的

(1) 患者検体を用いた腫瘍自体および腫瘍周囲環境における Cetuximab 感受性因子の探索

(2) Cetuximab 耐性株を使用した、In vitro における、Cetuximab 耐性メカニズムの検討

## 3. 研究の方法

(1) Cetuximab 投与を行った患者の腫瘍組織における EGFR や pAkt の発現を免疫染色にて確認し、治療効果との関連を検討した。また、Cetuximab 投与時の患者血液を使用して、免疫に関する血球系の変化を確認し、治療効果との相関の有無を検討した

(2) OSCC 細胞株 SAS および Ca9-22 と、それらより樹立した Cetuximab 耐性株 (SAS/FR2、Ca9-22/FR2) を用いて実験を行った。抗がん剤耐性因子である抗アポトーシス蛋白の cIAP2 や癌抑制因子の FBXW7、放射線耐性因子である IL-6 の発現に関して、RT-qPCR、Western blotting 法などの手法を用いて in vitro の解析を行った。

## 4. 研究成果

(1) 腫瘍検体における EGFR 発現や pAKT の発現と Cetuximab 併用の化学療法や放射線療法の治療効果との関連は認められなかった。

(2) 耐性株を使用し以前報告した抗アポトーシス蛋白の発現を確認したが、有意な変化は認めなかった。また、FBXW7 の発現との関連も認めなかった。IL-6 経路に関して、Cetuximab 耐性への関連は認めなかった。

今後症例数を増やしていく事に加え、さらなる耐性株樹立および Microarray などによる網羅的解析を行い、Cetuximab 抵抗性に関する因子の探索を続けていく予定である。

## 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 8 件)

1. Arita H, Nagata M, Yoshida R, Matsuoka Y, Hirotsue A, Kawahara K, Sakata J, Nakashima H, Kojima T, Toya R, Murakami R, Hiraki A, Shinohara M, Nakayama H.

FBXW7 expression affects the response to chemoradiotherapy and overall survival among patients with oral squamous cell carcinoma: A single-center retrospective study.

Tumour Biol. 2017 Oct;39(10) 査読有り

2. Murakami R, Semba A, Kawahara K, Matsuyama K, Hiraki A, Nagata M, Toya R, Yamashita Y, Oya N, Nakayama H. Concurrent chemoradiotherapy with S-1 in patients with stage III-IV oral squamous cell carcinoma: A retrospective analysis of nodal classification based on the neck node level. *Mol Clin Oncol*. 2017 Jul;7(1):140-144. 査読有り

3. Sakata J, Yoshida R, Matsuoka Y, Nagata M, Hirosue A, Kawahara K, Nakamura T, Nakamoto M, Hirayama M, Takahashi N, Nakashima H, Arita H, Ogi H, Hiraki A, Shinohara M, Nakayama H. Predictive value of the combination of SMAD4 expression and lymphocyte infiltration in malignant transformation of oral leukoplakia. *Cancer medicine* 2017 Apr;6(4):730-738 査読有り

4. Tanaka T, Imamura T, Yoneda M, Irie A, Ogi H, Nagata M, Yoshida R, Fukuma D, Kawahara K, Shinohara M, Nakayama H. Enhancement of active MMP release and invasive activity of lymph node metastatic tongue cancer cells by elevated signaling via the TNF- $\alpha$ -TNFR1-NF- $\kappa$ B pathway and a possible involvement of angiotensin-like 4 in lung metastasis. *Int J Oncol*. 49(4):1377-84,2016 査読有り

5. Matsuoka Y\*, Nakayama H\*, Yoshida R, Hirosue A, Nagata M, Tanaka T, Kawahara K, Sakata J, Arita H, Nakashima H, Shinriki S, Fukuma D, Ogi H, Hiraki A, Shinohara M, Toya R, Murakami R. IL-6 controls resistance to radiation by suppressing oxidative stress via the Nrf2-antioxidant pathway in oral squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 115(10):1234-44, 2016 査読有り

6. Hiraki A, Yamamoto T, Yoshida R, Nagata M, Kawahara K, Nakagawa Y, Matsuoka Y, Tanaka T, Hirosue A, Fukuma D, Ikebe T, Shinohara M, Nakayama H. Factors affecting volume change of myocutaneous flaps in oral cancer. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 45(11):1395-99, 2016 査読有り

7. Hiraki A, Fukuma D, Nagata M, Shiraishi S, Kawahara K, Matsuoka Y, Nakagawa Y, Yoshida R, Tanaka T, Yohitake Y, Shinohara M, Yamashita Y, Nakayama H. Sentinel lymph node biopsy reduces the incidence of secondary neck metastasis in patients with oral squamous cell carcinoma. *Molecular and Clinical Oncology* 5(1):57-60, 2016 査読有り

8. Nakashima H, Matsuoka Y, Yoshida R, Nagata M, Hirosue A, Kawahara K, Sakata J, Arita H, Hiraki A, Nakayama H. Pre-treatment neutrophil to lymphocyte ratio predicts the chemoradiotherapy outcome and survival in patients with oral squamous cell carcinoma: a retrospective study. *BMC Cancer* 16(1):41, 2016 査読有り

〔学会発表〕(計 13 件)

1. 当科における舌扁平上皮癌 T2N0M0 症例の臨床的検討  
山名 啓介, 坂田 純基, 吉田 遼司, 廣末 晃之, 永田 将土, 廣田 溪, 福間 大喜, 尾木 秀直, 篠原 正徳, 中山 秀樹  
第 61 回 (公社) 日本口腔外科学会総会・学術大会、2016 年 11 月 25-27 日  
幕張メッセ、千葉、口演

2. Stage 口腔扁平上皮癌根治手術後の S-1 補助化学療法の有効性に関する検討  
吉田 遼司, 平山 真敏, 永田 将土, 廣末 晃之, 古賀 幹一, 高橋 望, 中元 雅史, 福間 大喜, 尾木 秀直, 平木 昭光, 篠原 正徳, 中山 秀樹  
第 54 回日本癌治療学会学術総会、2016 年 10 月 20 日-22 日  
パシフィコ横浜、横浜、ミニシンポジウム

3. 口腔症状を契機に筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の診断に至った 2 例  
森田 興輝, 吉田 遼司, 廣末 晃之, 永田 将土, 川原 健太, 上村 恭子, 古賀 幹一, 中山 秀樹  
第 26 回日本口腔内科学会、2016 年 9 月 23-24 日  
さん太ホール・さん太ギャラリー、岡山、口演

4. Tumor-suppressive microRNA-X regulates cancer cell migration, invasion and metastasis in oral squamous cell carcinoma by targeting metastasis-related molecule.  
Ryoji Yoshida, Junki Sakata, Yuichiro Matsuoka, Masashi Nagata, Akiyuki Hirosue, Kenta Kawahara, Hikaru Nakashima, Hidetaka Arita, Akimitsu Hiraki, Masanori Shinohara and Hideki Nakayama  
第 27 回日本臨床口腔病理学会総会・学術大会、2016 年 8 月 10-12 日  
広島大学 応仁会館、広島、ポスター

5. A study of predictive factors for occult cervical lymph node metastasis of clinical T2N0 tongue squamous cell carcinoma  
Junki Sakat, Akiyuki Hirosue, Ryoji Yoshida, Masashi Nagata, Kenta Kawahara, Yichiro Matsuoka, Hidetaka Arita, Hikaru Nakashima, Daiki Fukuma, Hidenao Ogi,

Masanori Shinohara and Hideki Nakayama  
第 27 回日本臨床口腔病理学会総会・学術大会、2016 年 8 月 10-12 日  
広島大学 応仁会館、広島、ポスター

6. Ameloblastic Carcinoma, Secondary Type, of the Mandible: A Case Report

Shunsuke Gohara, Ryoji Yoshida, Manabu Maeshiro, Koki Morita, Kenta Kawahara, Masashi Nagata, Akiyuki Hirose, Akimitsu Hraki, Masanori Shinohara and Hideki Nakayama

第 27 回日本臨床口腔病理学会総会・学術大会、2016 年 8 月 10-12 日  
広島大学 応仁会館、広島、ポスター

7. Ameloblastic Carcinoma, Primary Type, of the Maxilla: A Case Report

Kenshi Inutsuka, Ryoji Yoshida, Ayaka Miyasaka, Akira Yuno, Kenta Kawahara, Masashi Nagata

Akiyuki Hirose, Akimitsu Hraki, Masanori Shinohara, Yasunori Takeda, and Hideki Nakayama

第 27 回日本臨床口腔病理学会総会・学術大会、2016 年 8 月 10-12 日  
広島大学 応仁会館、広島、ポスター

8. A rare case of ameloblastic fibrodentinoma of the mandible

Hiraru Nakashima, Masatoshi Hirayama, Inutsuka Kenshi, Shunsuke Gohara, Junki Sakata, Ryoji Yoshida, Kenta Kawahara, Masashi Nagata, Masanori Shinohara and Hideki Nakayama

第 27 回日本臨床口腔病理学会総会・学術大会、2016 年 8 月 10-12 日  
広島大学 応仁会館、広島、ポスター

9. 口腔扁平上皮癌患者における循環 miRNA の発現に関する臨床的検討

中嶋光, 吉田遼司, 廣末晃之, 有田英生, 坂田純基, 松岡祐一郎, 川原健太, 中川純泰, 永田将士, 中山秀樹

第 40 回日本頭頸部癌学会、2016 年 6 月 9-10 日  
大宮ソニックシティ、埼玉、ポスター

10. 口腔扁平上皮癌における HMGA2 の臨床的意義

坂田純基, 廣末晃之, 吉田遼司, 永田将士, 松岡祐一郎, 有田英生, 中嶋光, 福間大喜, 尾木秀直, 篠原正徳, 中山秀樹

第 40 回日本頭頸部癌学会、2016 年 6 月 9-10 日  
大宮ソニックシティ、埼玉、ポスター

11. IL 6 は Nrf2 抗酸化経路を介して口腔扁平上皮癌細胞に放射線耐性を賦与す

る

松岡祐一郎, 吉田遼司, 廣末晃之, 田中拓也, 永田将士, 川原健太, 中川純泰, 有田英生, 坂田純基, 中嶋光, 尾木秀直, 平木昭光, 篠原正徳, 中山秀樹

第 40 回日本頭頸部癌学会、2016 年 6 月 9-10 日

大宮ソニックシティ、埼玉、口演

〔図書〕(計 1 件)

金田隆 (日本大学松戸歯学部放射線学講座)  
中山秀樹 (熊本大学大学院生命科学研究部歯科口腔外科学分野)

平井俊範 (宮崎大学医学部病態解析医学講座放射線医学分野)

生嶋一朗 (都城市郡医師会病院放射線科)

永田将士 (分担執筆)

画像診断別冊 KEY BOOK シリーズ

知っておきたい顎・歯・口腔の画像診断 P304 - 306

発行年 2017 年

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永田 将士 (NAGATA Masashi)

熊本大学・医学部附属病院 歯科口腔外科  
非常勤診療医師

研究者番号: 10635791

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

研究者番号： ( )