

平成 30 年 6 月 14 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：16K20593

研究課題名(和文) 口腔癌におけるサイトカインを介した抗癌剤耐性機構解明と新規治療法開発

研究課題名(英文) Anticancer agent-resistant mechanism elucidation and new cure development through cytokine in oral cancer.

研究代表者

中川 純泰 (Nakagawa, Yoshihiro)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師

研究者番号：70732741

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)：fibronectinにおける抗癌剤耐性機序にの解明について研究を行ってきたが fibronectinの強発現・抑制実験では、細胞増殖活性に差が出てしまったため、抗癌剤耐性度試験の比較実験・検討を行うことができなかった。また、fibronectinの細胞膜受容体であるインテグリン受容体の発現抑制・強発現実験を試みたが、細胞形態・接着の異常が出現し、細胞増殖活性や同種株における耐性度に大きな変動が生じてしまったため比較検討を行うことができなかった。
以上より、fibronectinの直接的関与における抗癌剤耐性機序について解明することはできなかった。

研究成果の概要(英文)：I studied anticancer agent-resistant mechanism in the elucidation in fibronectin, but cell proliferation was not able to weigh it by the restraint experiment strong expression of fibronectin because a difference had appeared. I performed expression of integrin receptor restraint, strong expression, but was not able to weigh it because a difference had gone to a cell shape, the adhesion. I was not able to elucidate it about anticancer agent-related mechanism in the direct participation of fibronectin than the above.

研究分野：歯科口腔外科

キーワード：SAS 抗癌剤耐性 fibronectin

1. 研究開始当初の背景

口腔癌は頭頸部癌の約 60%を占める疾患であり、その 80%以上を OSCC が占めている。近年、OSCC の診断・治療法の選択肢は広がっているものの、その 5 年生存率は過去 30 年間ほとんど変化していない (Jemal et al. *Cancer Statistics*. 2012)。その原因として、腫瘍組織中に治療抵抗性癌細胞が存在していることが挙げられる (Reya et al. *Nature*. 2001)。抗癌剤耐性細胞はそのような高悪性癌細胞の一例であり、口腔癌治療における key drug である 5-FU に対する耐性は OSCC 患者の治療成功の大きな臨床的障壁となっている。5-FU をはじめとする抗癌剤への耐性機構について遺伝子変異、エピジェネティクス変化など様々な観点から研究が進められているが、未だパラダイムシフトには至っていない。そのような中、近年ある種のサイトカインが抗癌剤耐性に寄与していることが報告され (Pan et al. *Stem Cells*. 2015) 注目されている。しかし、固形腫瘍におけるサイトカインと抗癌剤耐性機構についてはほとんど研究はなされていない。以上より、OSCC におけるサイトカインによる抗癌剤耐性制御機構の解明は新たな OSCC の治療法や効果予測マーカーの開発に重要であると考えられる。

このような考え方から、申請者はこれまで OSCC における腫瘍微小環境と抗癌剤耐性との関係について研究を行ってきた。その結果、当科で樹立した 5-FU 耐性 OSCC 細胞株 (Nagata et al. *Br J Cancer*. 2011) において細胞外マトリックスの一種である Fibronectin (FN) や Osteopontin (OPN) が OSCC 培養細胞の 5-FU 耐性に関わっているという事実が明らかとなった (Naklagawa et al. *Int J Oncol*. 2014, Nakamura et al. *FEBS Lett*. 2015)。また、興味深いことに腫瘍間質の性状が抗癌剤の治療効果に関与している事実を見出してきた (Matsuoka et al. *APMIS* 2015)。

FN や OPN は、様々な機構で細胞生存に有利なシグナル伝達経路を活性化することで、細胞死をまぬがれ微小残存を招くことが分かっている。この細胞-ECM 結合による抗癌剤耐性機構は Cell adhesion mediated drug-resistance (CAM-DR) として知られている (Meads et al. *Nat Rev Cancer*. 2009)。この抗癌剤耐性機構は Enviroment-mediated drug resistance (EMDR) の一つであり、CAM-DR のほか、Soluble factor mediated drug-resistance (SFM-DR) が挙げられる。これは、腫瘍細胞や間質細胞がサイトカインやケモカインを介し、細胞生存に有利なシグナル伝達経路を活性化することで抗癌剤耐性を示す経路であることが報告されている。

申請者は既に CAM-DR が OSCC 細胞においても上述のようなシグナル伝達経路が細胞生存に関わっていることを見出している

が、5-FU 耐性 OSCC 細胞株の追加解析から 5-FU 耐性 OSCC 細胞において複数のサイトカインの発現が遺伝子・タンパク質レベルで親株に比べて高いという予備実験結果を得ている。特に IL-6 についてはその発現変動が大きく、他を大きく上回っていた。このような事実から、IL-6 による抗癌剤耐性制御機構の解明は抗癌剤耐性を示す OSCC に対する新たな治療法を創出する為の新たな知見をもたらすと考えられる。

そこで、本研究では、OSCC の抗癌剤耐性、主に 5-FU 耐性 OSCC 細胞を標的とした新たな治療法・治療効果予測マーカーの開発を目的として、OSCC の進展・抗癌剤耐性における IL-6 の機能解析を行う。本研究は、OSCC の研究向上に寄与するだけでなく、他の腫瘍における抗癌剤耐性制御機構解明にも新たな知見をもたらし、その治療法開発に貢献するものと考えられる。

2. 研究の目的

口腔扁平上皮癌 (Oral squamous cell carcinoma: OSCC) は口腔癌の 80%を占める疾患である。様々な治療法によって根治が目指されているが、治療成績に飛躍的な向上はみられない。その主な要因の一つに抗癌剤耐性癌細胞の存在が指摘されている。近年、抗癌剤耐性機構の解明が様々な視点から行われているが、申請者は細胞外基質やサイトカインが 5-FU 耐性に関与している可能性を見出してきた。しかし、OSCC においてサイトカインと 5-FU 耐性との関係については未だ未解明な部分が多い。そこで、本研究では IL-6 を介した OSCC の抗癌剤耐性制御機構の解明を行うとともに、腫瘍周囲微小環境に注目した新たな治療戦略を探索することを目的とした。

【1. OSCC における IL-6 発現の臨床的意義の解明】

OSCC において、IL-6 が腫瘍の生存や転移など悪性形質に関わることが報告されている (Shinriki et al. *Clin Cancer Res*. 2009)。申請者は既に IL-6 が 5-FU 耐性 OSCC 細胞株で発現が高いことを見出している。上述の内容を踏まえ、臨床検体を用いた発現解析や治療効果との関連については検討を行ったが、有意な差は認められなかった。そこで本研究では、さらに臨床検体の症例を増やし、IL-6 の発現をとらえる。本研究期間中に、当科で 5-FU 系抗癌剤である TS-1 併用化学放射線療法を受けた OSCC 患者の組織検体における IL-6 の発現状況を再度解析することで OSCC 患者、特に TS-1 併用化学放射線療法を受けた症例における IL-6 の臨床的意義を再検討する。

【2. OSCC の発生・進展における IL-6 の機能の解明】

IL-6 はサイトカインとして腫瘍細胞の増殖、遊走、転移に関わり、また免疫系細胞に作用することで様々な免疫応答の異常を引き起こすことが知られている。特に STAT3 経路を介

して、様々な細胞内シグナルを制御することが報告されてきているが、標的タンパク質や表現系は細胞のタイプや状況によって大きく異なり、またそれらの機能がどの程度 5-FU 耐性に関与しているかは不明である。本研究では、OSCC において IL-6 の発現上昇あるいは低下の結果、5-FU 耐性がどのような分子機序で誘導されるか、それが臨床的な知見にどのように関連するのかを再度検討する。

【3. IL-6 受容体結合阻害剤による 5-FU 耐性克服の可能性の検討】

前述のように、申請者は OSCC 培養細胞における 5-FU 耐性機序に、IL-6 関与しているという予備的実験データを有しており、実際に当科ではマウスモデルにおいて OSCC に対する単剤での有用性を示してきた (Shinriki et al. Clin Cancer Res. 2009, J Pathol. 2011)。卵巣癌では既に IL-6 阻害剤による化学療法の上乗せ効果を期待した臨床試験が始まっており (Dijkgraaf et al. Ann Oncol. 2015)、申請者のこれまでの知見等を踏まえると、IL-6 阻害剤は OSCC においても有望な分子標的治療薬の候補となりうると考えられる。そこで、本研究では抗 IL-6 受容体抗体による 5-FU 耐性克服の可能性の検討を再度行う。

③ 当該分野における本研究の学術的な特色・独創的な点及び予想される結果と意義

過去 30 年間、OSCC 患者の明らかな予後の改善が認められないという事実は、治療抵抗性癌細胞の存在を顕著に示している。本研究の解析対象である IL-6 は腫瘍微小環境の構成要素の一つであり、これまでの申請者の知見から 5-FU 耐性に関与していると考えられる。しかし、過去に IL-6 と抗癌剤耐性に関しての臨床的解析が欠落していることなどから、実際の腫瘍および 5-FU 耐性 OSCC 細胞における IL-6 の機能は未知数である。したがって、多彩な像を呈するがんにおける IL-6 の臨床的意義・機能の解明を目指す本研究は、先駆的であり、OSCC に限らずがん研究のひとつの基盤になると考えられる。申請者は、現時点で IL-6 発現量と 5-FU 耐性の相関関係を明らかにし、それが本プロジェクトの始点となっている。既に細胞レベルで得られている知見を実際の臨床検体や動物モデルで再検討することで、OSCC のみならず他のがんの病態解明および新規診断・治療法の開発の一躍を担うものに発展すると考えられる。

3. 研究の方法

【1】OSCC における IL-6 発現の臨床的意義の解明

申請者は、当該分野における細胞外基質と抗癌剤耐性機序との関連性について既に報告をしてきた (Nakagawa et al. Int J Oncol. 2014, Nakamura et al. FEBS Lett. 2015)。また、予備的実験から 5-FU 耐性 OSCC 細胞株で IL-6 の発現量が高いという結果を得ている。そこで、実際の臨床検体における IL-6 の発現量・分泌量と 5-FU 系抗癌剤の治療効

果との関連については検討を一度行ったが、症例数が少数であり、有意な差は認められなかった。そこで、IL-6 と抗癌剤耐性における関係性をさらに明確にするため、TS-1 併用化学放射線療法を受けた症例の組織検体や治療前血漿を用いて再度検討を行う。IL-6 の発現様式を免疫組織化学染色、ELISA 法にて解析し、各種臨床情報との関連を統計学的に検討する。

【2】IL-6 の発現変動が OSCC の進展に及ぼす影響とその分子機構の解析

IL-6 発現の上昇が OSCC の 5-FU 耐性に寄与していることが示唆されるため、IL-6 の過剰発現によって起こる 5-FU 耐性獲得を *in vivo*、*in vitro* で解析する。

5-FU 耐性 OSCC 細胞株 (Nagata et al. Br J Cancer. 2011) において IL-6 の遺伝子・タンパクレベルでの発現が抗癌剤耐性株で上昇していることは先に示した通りである。しかし、実際に親株において、IL-6 の過剰発現により、抗癌剤耐性度が上昇しているかという点は未解明である。これらに対し、詳細なメカニズムを解析するために以下の実験を予定している。

(a) IL-6 の強制発現による解析 (*in vitro*)
FN 応答性に GFP を発現するレトロウイルスベクターによる強制発現系を用い、GFP でモニター可能な IL-6 の安定的強制発現を行う。このことで多くの項目において幅広い安定した解析が可能になると考える。FN 高発現細胞は GFP の輝度を指標として FACS にて行う。すなわち、GFP の輝度が高い細胞ほど IL-6 の発現も高いと定義し、GFP 高輝度分画を分取し、まずは *in vitro* での実験に供する。*in vitro* の実験は MTS assay による増殖能の評価、抗癌剤などの各種ストレス環境下でのアポトーシスの評価、抗癌剤耐性度の評価などを中心に行う。また、表現系の変化から重要と考えられる細胞内外関連因子の発現変化をタンパク質 (ウエスタンブロッティング法、免疫染色、ELISA 法など)・遺伝子 (リアルタイム PCR 法など) レベル両面で解析する。また個別因子の解析と並行して、IL-6 強制発現株およびコントロール株より抽出した RNA をもとに Affymetrix 社製 GeneChip (Gene 1.0 ST Array) システムを用いて網羅的に遺伝子発現変化を解析する。これにより、予測のできない IL-6 関連分子変動の探索を試みる。

(b) IL-6 の強制発現による解析 (*in vivo*)
SCID マウスに、樹立した IL-6 強制発現株およびコントロール株を移植し、5-FU を投与した際の治療効果の変化について評価する。GFP 発現株であるため、蛍光検出システムにより簡便に腫瘍の部位や体積を評価することが可能となる。続いて、組織学的解析を免疫組織化学染色などにより行う。これらに並行して、*in vitro* で数種類の OSCC 細胞株 (OSC-20、OSC-19、HSC-3) を用いて、IL-6 の安定的強制発現で同様の現象が得られる

かどうか、すなわち普遍性を持った現象であるかどうかを確認する。

4. 研究成果

【1】OSCC における FIL-6 発現の臨床

的意義の解明

臨床組織検体や治療前血漿を使用し検討を行ったところ、一定の傾向は認められるものの、有意差を認めるには至らなかった。また、今回症例数を増加させて検討予定であったが、被災により使用可能な臨床検体が減少してしまい予想された症例数を増加させることができず、今後臨床を行う上で長期にわたり再度症例を収集し、検討する予定である。

【2】IL-6 の発現変動が OSCC の進展

に及ぼす影響とその分子機構の解析

レトロウイルスベクターの確保と実験手技について再検討中であり、また、上述した【1】の検討課題に対し、実験継続可能なまでの十分な検討ができていない状態であるため、実験としては停滞している状態である。

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 件)

〔学会発表〕 (計 件)

〔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

中川 純泰 Nakagawa Yoshihiro

熊本大学 医学部附属病院 医員

研究者番号：70732741

(2) 研究分担者

研究者番号：

(3) 連携研究者

中山 秀樹 Nakayama Hideki

熊本大学 医学部附属病院 教授

研究者番号：70381001

(4) 研究協力者

当科大学院生

熊本大学医学部附属病院歯科口腔外科学分野