

令和元年6月4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：16K20613

研究課題名（和文）口腔扁平上皮癌におけるセツキシマブ耐性化に伴う代謝変化の解析と新規治療法の考案

研究課題名（英文）Analysis of metabolic changes associated with cetuximab resistance in oral squamous cell carcinoma and designing of new treatment

研究代表者

吉川 桃子 (Yoshikawa, Momoko)

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・訪問研究員

研究者番号：50570967

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）：癌幹細胞マーカーであるCD44v 陽性口腔扁平上皮癌細胞を用いてセツキシマブ耐性細胞を樹立し、メタボロームによる代謝解析から、セツキシマブ耐性細胞は親株と異なった代謝経路の活性が高いことを見出した。セツキシマブ耐性化に伴う代謝変化について分子レベルで解析を行い、セツキシマブ不応症例に対する新規治療法を開発することを目的として解析を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

セツキシマブ耐性化に伴う分子機構の解析を行うことで、セツキシマブ不応症例に対する新規治療法の開発および患者個別の治療法の可能性も示唆された。

研究成果の概要（英文）：Our group established cetuximab-resistant cells by using oral squamous cell carcinoma cells expressing CD44v, which is cancer stem cell marker. We also found that cetuximab-resistant cells had high activity of metabolic pathways different from those of the original cell strain by metabolic analysis. We continue to analyze at the molecular level of the metabolic changes associated with cetuximab resistance, and aim at developing new treatments for cetuximab refractory cases.

研究分野：口腔癌

キーワード：CD44v 口腔扁平上皮癌 セツキシマブ

## 1. 研究開始当初の背景

癌の再発・転移・治療抵抗性の獲得には癌幹細胞の存在が関与していると考えられ、口腔扁平上皮癌においては CD44v が癌幹細胞マーカーとして知られている。これまでに我々の研究グループは、癌細胞表面の CD44v が xCT シスチントランスポーターを安定化し、抗酸化物質である GSH (還元型グルタチオン) の産生を高めることで、酸化ストレス抵抗性を促進し、腫瘍の増大や治療抵抗性に寄与することを明らかにしてきた (Ishimoto et al. Cancer Cell 2011)。さらに、xCT シスチントランスポーターの特異的阻害剤であるスルファサラジンをを用いた治療実験では、CD44v 陽性の未分化な癌細胞において選択的に細胞死を誘導することを見出した。これらの研究結果は、癌幹細胞を特異的にターゲットとする新しい治療法開発の可能性を示唆している (Yoshikawa et al. Cancer Research 2013)。一方、口腔扁平上皮癌では EGFR 遺伝子の増幅が認められることから、分子標的治療薬であるセツキシマブ (抗 EGFR 抗体薬) の臨床応用が、切除不能進行再発癌に対して開始されている。しかし、ある時期に腫瘍の進行・増悪を認め、セツキシマブに対する抵抗性を獲得すると考えられる。そこで、EGFR 高発現でセツキシマブ感受性を有する CD44v 陽性口腔扁平上皮癌細胞の 2 種類を用いて、セツキシマブ耐性細胞を樹立し、セツキシマブ耐性細胞の特性を細胞内代謝に着目して解析を進めてきた。メタボローム解析結果から、親株とセツキシマブ耐性細胞は異なる代謝経路を使用する傾向があることがわかった。さらにセツキシマブ耐性細胞は、GSH 合成経路に依存する傾向があり、実際に GSH の産生を抑えるスルファサラジンに対する感受性が亢進していることも確認した。このことから、代謝の違いにより、スルファサラジンの感受性が異なることが示唆された。つまり、EGFR 標的治療と xCT シスチントランスポーターの特異的阻害剤スルファサラジンの併用は、口腔扁平上皮癌において有効であると考えられる。そこで、親株とセツキシマブ耐性細胞の代謝のシフトに関する遺伝子およびマーカーを探索し、それぞれの代謝のシフトを検出可能なモデルの作成および薬剤開発を行うことを目的とした。このようにセツキシマブ耐性化に伴う細胞内代謝変化を解析することは、口腔扁平上皮癌のセツキシマブ治療に対して非常に有用な情報をもたらすことが期待できる。

## 2. 研究の目的

口腔扁平上皮癌では EGFR 遺伝子の増幅が認められ、その生存・増殖が EGFR シグナルに依存する傾向があることから、EGFR 標的治療薬セツキシマブの臨床応用が開始されている。しかし、ある時期に腫瘍の進行・増悪を認めることが多く、腫瘍がセツキシマブに対する抵抗性を獲得すると考えられる。我々はこれまでに、癌幹細胞マーカーである CD44v 陽性口腔扁平上皮癌細胞を用いてセツキシマブ耐性細胞を樹立した。そしてメタボロームによる代謝解析から、親株とセツキシマブ耐性細胞は異なる代謝経路を使用する傾向があることを見出してきた。本研究では、EGFR シグナルが口腔扁平上皮癌の糖代謝に果たす役割と、セツキシマブ耐性化に伴う代謝変化について分子レベルで解析を行い、セツキシマブ不応症例に対する新規治療法を開発することを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では、口腔扁平上皮癌におけるセツキシマブ治療の抵抗性について細胞内代謝変化に着目して解析を行うものである。当初の計画とは一部変更して実験を行った。

- (1) 親株とセツキシマブ耐性細胞の代謝シフトを決定づける分子メカニズムの解明
- (2) それぞれの代謝シフトを検出可能なモデルの作成
- (3) ヒトの口腔扁平上皮癌の臨床サンプルを用いて、特異的なバイオマーカーの発現解析
- (4) セツキシマブ投与後のヒト臨床検体における間葉細胞の培養方法の確立および機能解析

## 4. 研究成果

- (1) 親株とセツキシマブ耐性細胞の代謝シフトを決定づける分子メカニズムの解明  
EGFR 高発現でセツキシマブ感受性を有する CD44v 陽性口腔扁平上皮癌細胞を用いて、セツキシマブ耐性細胞を樹立した。マイクロアレイによる遺伝子発現解析結果から、セツキシマブ耐性細胞は CD44v 陽性の未分化な腫瘍を形成する細胞と遺伝子発現が類似しており、実際にセツキシマブ治療後の腫瘍組織は CD44v 陽性の未分化な腫瘍となることから、セツキシマブ耐性細胞は親株と比べて、より癌幹細胞としての性質が強いことが示唆された。メタボロームによる細胞内代謝解析を行ったところ、親株は解糖系を使用し、セツキシマブ耐性細胞は、ミトコンドリアにおける酸化的リン酸化を使用する傾向があることがわかった。つまり、セツキシマ

ブ耐性化に伴って、同じ CD44v 陽性癌細胞であっても、より癌幹細胞としての性質が強くなり、細胞内代謝も変化していくことが示唆された。細胞内代謝変化をみるマーカーとして、PKM1、PKM2、および hnRNP1 に着目して解析を進めた。親株は PKM2 の発現が高いのに対し、セツキシマブ耐性細胞は PKM1 の発現が高くなっていることが確認された。また PKM1 と PKM2 の発現に関与しているといわれる hnRNP1 の発現をみてみると、セツキシマブ耐性細胞で hnRNP1 の発現が低い傾向があることがわかった。

## (2) それぞれの代謝シフトを検出可能なモデルの作成

親株とセツキシマブ耐性細胞において PKM1 と PKM2 の発現に差があることが確認されたため、これらの分子の発現によって代謝変化がおこるかを検証した。hnRNP1 を RNA 干渉により発現抑制した細胞株を作成したところ、スルファサラジン感受性が高くなることがわかった。hnRNP1 の発現の違いによる代謝変化について、さらなる解析を進めているところである。

また、代謝の違いにより腫瘍の階層性にも影響を及ぼすことができるのかについて、*in vitro*・*in vivo* 条件で検討した。これまでに、親株・セツキシマブ耐性細胞をそれぞれ免疫不全マウスの背部皮下に移植すると、組織学的に親株は CD44v 陽性細胞と CD44v 陰性細胞からなる階層性を有する高分化型の腫瘍を形成するのに対し、セツキシマブ耐性細胞は大多数を CD44v 陽性細胞からなる未分化な腫瘍を形成することを見つけてきた。*in vitro* 条件で親株に対して、代謝による細胞分化の違いができるかを確認したところ、グルタミン添加で Involucrin や Cytokeratin10 などの分化マーカーの発現が抑制され、グルコース添加で分化マーカーの発現が高く分化を誘導する傾向があることがわかった。

## (3) ヒトの口腔扁平上皮癌の臨床サンプルを用いて、特異的なバイオマーカーの発現解析

ヒトの口腔扁平上皮癌におけるセツキシマブ治療前後の臨床サンプルを用いて免疫染色を行った。セツキシマブ治療後の検体において CD44v 陽性細胞の発現が高く、より未分化な腫瘍となる傾向があることがわかった(図1)。これは先行実験において、セツキシマブ耐性細胞をマウス背部皮下に移植して得られた腫瘍の組織型と類似しており、また、マウス腫瘍に対し、セツキシマブで治療した腫瘍の組織型とも類似していることがわかった。

しかし、検体数が少なく、さらにサンプル数を増やしての検証が必要と考える。また、前向きにセツキシマブ投与後の組織像の違いによるセツキシマブ感受性の評価も行っていきたいと考えている。

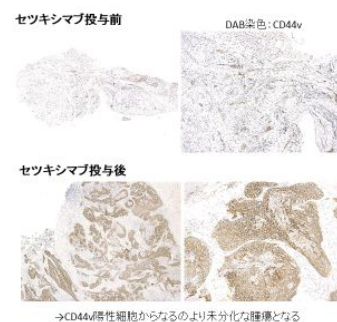


図1: セツキシマブ治療後のヒト口腔扁平上皮癌

## (4) セツキシマブ投与後のヒト臨床検体における間葉細胞の培養方法の確立および機能解析

セツキシマブ投与後のヒト臨床検体において、間葉細胞の培養方法の確立に成功した。これは舌に生じたセツキシマブ投与後に再発をきたした希少癌であり超難治性低分化扁平上皮癌の亜型である紡錘細胞癌より樹立したものである。当初予定していなかった計画ではあるが、臨床検体を用いた間質性の細胞特性解析は上皮-間葉相互作用に関する今後の研究に重要な要素であると考え解析を進めた。臨床サンプルから、フローサイトメーターを用いて細胞表面マーカーの解析を実施した結果、EpCAM (上皮マーカー) 陽性細胞、および PDGFR (間葉マーカー) 陽性細胞中のいずれにおいても EGFR 陽性細胞が存在したが、それぞれ 10% 台の陽性率であった。過去の報告では頭頸部扁平上皮癌における EGFR 陽性率は 80-90%とされており、本結果はセツキシマブ耐性の性質を保持した何かしらの腫瘍関連細胞、特に異常増殖能を示す幹細胞性質を強く保持している細胞が存在する可能性が考えられた。癌幹細胞マーカーである CD44v は上皮マーカー EpCAM 陽性細胞および間葉マーカー PDGFR 陽性細胞ともに発現した(図2)。

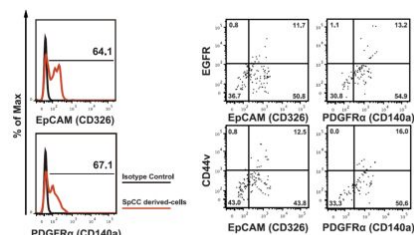


図2: 未分化なセツキシマブ耐性口腔扁平上皮癌細胞(紡錘細胞癌)のフローサイトメーターによる解析

次に、培養によって得られた間葉細胞が幹細胞性質を保持しているかを確認するため、コロニー形成能や倍加時間、および遊走能を解析したところ、いずれもその特徴を示した。また、間葉系幹細胞の特徴である骨・軟骨・脂肪への分化能を示した。さらに、培養細胞に対する薬剤試験を試みたところ、PDGFR 阻害薬であるイマチニブにて致死効果を得た(図3)。本研究では、紡錘細胞癌に対するイマチニブ適用の可能性が示唆され、特に現状の臓器別薬剤適応に合わない組織型を持つ希少がんの個別化治療への足がかりになると考えられた(Ouchi, Yoshikawa et al. Journal of Dental Research 2018)。

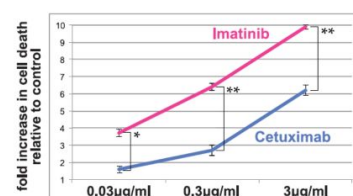


図3: 紡錘細胞癌に対するイマチニブの治療効果

しかしながら、樹立した SpCC 由来間葉細胞が生体内において単独で悪性度を示すのか、な

いしは正常・腫瘍上皮細胞と何らかの相互作用により悪性度を維持しているかどうかはまだ明らかにされていないため、現在免疫不全マウスに樹立した細胞株を移植し、解析を進めている。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Ouchi T, Morikawa S, Shibata S, Takahashi M, Yoshikawa M, Soma T, Miyashita H, Muraoka W, Kameyama K, Kawana H, Arima Y, Saya H, Okano H, Nakagawa T, Asoda S.

Recurrent Spindle Cell Carcinoma Shows Features of Mesenchymal Stem Cells.

Journal of Dental Research. 査読有 2018 Jul;97(7):779-786. doi:

10.1177/0022034518759278.