

平成 31 年 4 月 21 日現在

機関番号：17401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06974

研究課題名(和文) 口腔扁平上皮癌におけるIL-6を介する放射線耐性機序の解明と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Elucidate the mechanism of radioresistance via IL-6 in oral squamous cell carcinoma and development of novel therapeutic strategy

研究代表者

松岡 祐一郎 (Matsuoka, Yuichiro)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師

研究者番号：10802100

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)：口腔扁平上皮癌(以下、OSCC)におけるIL-6を介する放射線耐性機序の解明と新規治療法の開発を推進し、以下の点について明らかにした。1) OSCC患者組織において、IL-6の発現は腫瘍の増殖に関与していた。2) OSCC細胞は経時的にIL-6の細胞外分泌が増加しており、リン酸化STAT3のタンパクレベルが増加していた。3) OSCC細胞においてSTAT3阻害剤することで有意に放射線感受性が高くなることが確認された。4) *in vivo* 担癌マウスモデルにおいて、IL-6阻害剤トシリズマブ併用放射線療法は、対照群と比較して腫瘍増殖を経時的に有意に抑制した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、がん微小環境におけるOSCC細胞においてIL-6はSTAT3を活性化することで放射線抵抗性に寄与する可能性を生物学的により明らかにすることができた。従来の放射線療法とIL-6シグナリングを標的とした治療法の併用の可能性を模索することは、OSCC放射線耐性を克服という観点から重要かつ独創的なアプローチである。また、トシリズマブは、関節リウマチなどに対して既に承認されており、高い効果を示している。従って、トシリズマブを用いた非臨床試験の結果が良好なものであるならば、トシリズマブはドラッグ・リ・ポジショニングの観点からも臨床試験のデザインにおいて非常に期待できる。

研究成果の概要(英文)：We investigated the mechanism of radioresistance via IL-6 in oral squamous cell carcinoma (OSCC) and developed novel therapies, and obtained the following results. 1) The high expression of IL-6 was associated with the tumor growth in OSCC patients. 2) The extracellular secretion of IL-6 was sequentially increased in OSCC cells. 3) The blockade of IL-6-STAT3 signaling by the inhibitor of STAT3 sensitized OSCC cells to radiation. 4) The radiotherapy that combined tocilizumab significantly suppressed the tumor growth *in vivo* mice model.

研究分野：口腔扁平上皮癌

キーワード：口腔癌 放射線耐性 がん微小環境 IL-6 トシリズマブ

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

OSCC を含む口腔がんにおいて、放射線治療は重要な治療戦略の一つであるため、治療法として選択される場面が多く、頭頸部癌患者のうち放射線治療を受ける患者の割合は約 78% と高い (Cancer. 103:2216-27, 2005)。しかし、抗酸化能力の高い腫瘍細胞は ROS スカベンジャーにより放射線障害から逃避することで抵抗性を獲得している (Nature 458:780-3, 2009)。従って、高い抗酸化能を介した放射線抵抗性を解明することが OSCC 患者の予後の改善に大きく貢献すると考えられるが、未だ詳細なメカニズムは不明な点が多い。

悪性腫瘍において IL-6 は、慢性炎症環境の構築に重要であり、免疫逃避や腫瘍進展に機能すると言われている (Front. Oncol. 2:58, 2012)。しかし、OSCC における IL-6 の発現と化学・放射線療法の治療抵抗性との関連に関しては不明な点が多く、IL-6 シグナリングの制御が OSCC の放射線治療の標的となりうるかどうかは検討されていなかった。

近年、がん関連線維芽細胞 (CAFs) 及び腫瘍随伴マクロファージ (TAMs) などを構成要素とするがん微小環境ががんの発生、進展に極めて重要な因子であることが明らかとなっている (Nat. Rev. Cancer. 6:392-401, 2006)。申請者らは、OSCC においてがん微小環境における TAMs が化学放射線療法の治療効果と患者の不良な予後に影響を与えることを明らかにした (APMIS 123(3):205-14, 2015)。また、OSCC 患者における血清中の IL-6 濃度が局所および全身性炎症反応と強く相関し、全身性炎症反応の指標である好中球/リンパ球比 (NLR) が高い患者ほど OSCC に対する化学放射線療法の治療効果が低下していることを見出した (BMC cancer 16:41, 2016)。このように IL-6 は腫瘍細胞そのものだけではなく、腫瘍促進的ながん微小環境においても重要であり、有力な治療標的となりうる可能性が示唆された。

さらに、申請者らはこれまで Interleukin-6 (IL-6) による Kelch-like ECH-associated protein1(Keap1)- Nuclear factor erythroid 2-related factor 2(Nrf2)シグナル経路の制御と放射線抵抗性の関連性を明らかにし、新たな治療戦略の可能性を示してきたが、その研究は未だ途上である。

### 2. 研究の目的

本研究では、OSCC 患者に対するより有効性の高い放射線療法の開発を目指して、化学放射線療法施行 OSCC 患者における IL-6 の臨床病理学的意義の検討、がん微小環境において IL-6 による癌細胞の Nrf2 抗酸化経路調節機構の更なる解明、*in vivo* 担癌マウスモデルにおける IL-6 阻害剤トシリズマブ併用放射線療法の有効性の検討を行うことである。

### 3. 研究の方法

化学放射線療法施行した OSCC 患者の血清や組織などの臨床サンプルを用いて IL-6 タンパクの発現を解析し、各種臨床病理学的項目との関連性を統計学的に解析した。

OSCC 細胞において IL-6-STAT3 シグナリングにおける意義を検討するため、ELISA 法や Western blotting 法を用いて検討した。

OSCC 細胞株を使用し、STAT3 阻害剤を用いて放射線感受性を評価し、IL-6 と OSCC の放射線抵抗性の関連を clonogenic assay や modified high-density survival assay にて検討を行った。

ヒト癌細胞を移植した免疫不全マウス(Bulb/c-nu/nu) (雌 6 週齢)を用いて、IL-6 阻害剤であるトシリズマブを投与して放射線分割照射を行う。トシリズマブの抗腫瘍効果の検討、およびトシリズマブ併用の放射線治療の有効性の検討を行った。

### 4. 研究成果

一次治療として化学放射線療法を施行した 64 例の患者群において、IL-6 の発現と各種リン項目および予後の関連を解析した結果、IL-6 発現と cT stage と有意な相関を認めた (図 1)。その他、各種との臨床項目との関連は認めなかった。OSCC 組織において IL-6 は腫瘍増殖と関与していることが明らかとなった。また、患者予後との関連については、有意な相関関係は認められなかった。

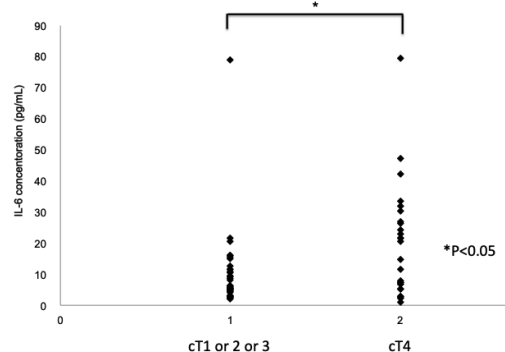


図 1. 血清 IL-6 発現と腫瘍増殖との関連

OSCC 細胞株 (SAS、HSC2) を用いて、IL-6 の細胞外分泌量を ELISA 法にて測定したところ、SAS、HSC2 とともに経時的に IL-6 細胞外分泌量が有意に増加した。また、両細胞株ともに、Western blotting 法を用いて経時的にリン酸化 STAT3 の発現量が増加し、STAT3 の活性化を認めた (図 2)。

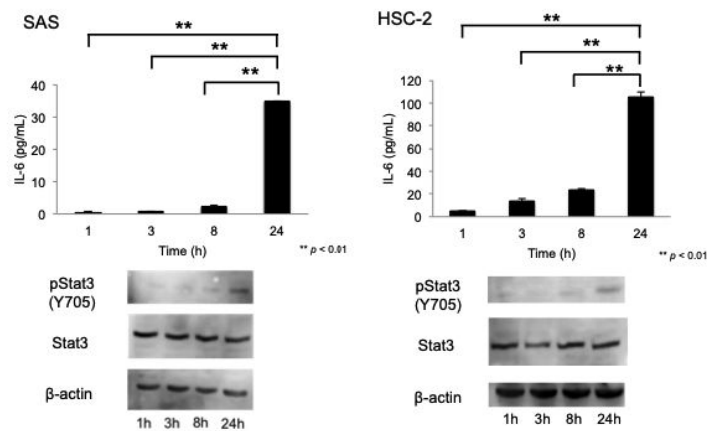


図2. OSCC細胞において細胞外IL-6分泌  
とリン酸化STAT3タンパク発現解析

IL-6シグナリング分子であるSTAT3の阻害剤を用いてIL-6-STAT3シグナル伝達経路を阻害した際のOSCC細胞（SAS）の放射線感受性を検討したところ、コントロール投与群と比較してSTAT3阻害剤投与群では放射線感受性が高いことが確認された（図3）。Clonogenic assayでも同様の傾向を認めた。これらの結果より、OSCC細胞において、IL-6-STAT3シグナル経路が活性化することで放射線抵抗性に関与する可能性が示唆された。

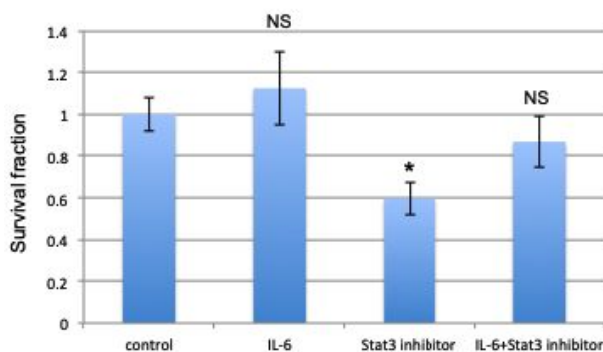


図3. SAS細胞における放射線感受性試験（Modified high-density survival assay）

免疫不全マウス（Bu1b/c-nu/nu）（雌6週齢）を用いた異種移植モデルにてトシリズマブを投与し、移植腫瘍の放射線感受性の変化を検討した（図4）。具体的には、免疫不全マウスに塩酸ケタミン 75mg/Kg + 塩酸メドミジン 1.0 mg/Kg を生理食塩水で希釈し腹腔内投与して麻酔をかけた後、SAS細胞株（ $1 \times 10^7$ ）を背部に皮下移植した。その後、SAS細胞が生着し、一定のサイズ（基準: 150 mm<sup>3</sup>）に増大した時点から、ヒト抗IgG抗体 100  $\mu$ l（Sigma）、ヒト化抗IL-6受容体抗体 100  $\mu$ g/100  $\mu$ lの2群（各群 n=5-10）に分けてそれぞれの試薬を腹腔内投与する。また、同時にX線 2 Gy/日を照射した。トシリズマブは48時間毎に投与し、X線は合計20 Gy（2 Gy/日、10 Gy/週）照射した（MBR-1520R; Hitachi）。また48時間毎に移植腫瘍のサイズ、体積を計測した。最後の照射が終了した時点から24時間後に屠殺を行い、移植腫瘍片および各種臓器の摘出を行った。

本プロトコルでは、実験群と対照群に有意な関連を認めなかったため、X線 6 Gy/日、連続7日間照射するプロトコルで検討を行った。トシリズマブ投与群において、対照群と比較して腫瘍増殖が経時的に有意に抑制され、縮小を認めた（図5）。また、得られた腫瘍片を用いて免疫組織学的染色を行ったところ、トシリズマブ投与群において、リン酸化Nrf2の発現が低下していることが明らかとなった（図6）。今後、より効果的なトシリズマブを併用した放射線照射プロトコルを検討し、移植腫瘍片を用いてDNAマイクロアレイ解析を行いIL-6依存的な放射線抵抗性の機構の解明を目指す。

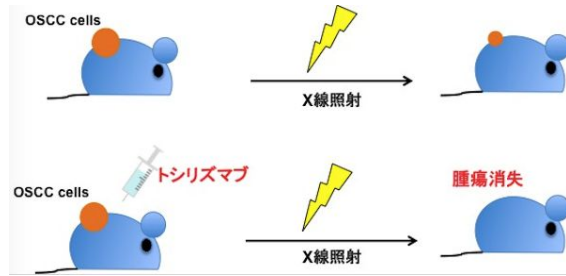


図 4. *in vivo* マウス実験系の概要

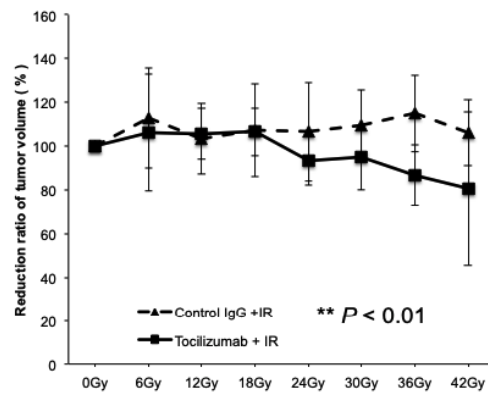


図 5. トシリズマブによる放射線感受性増感効果

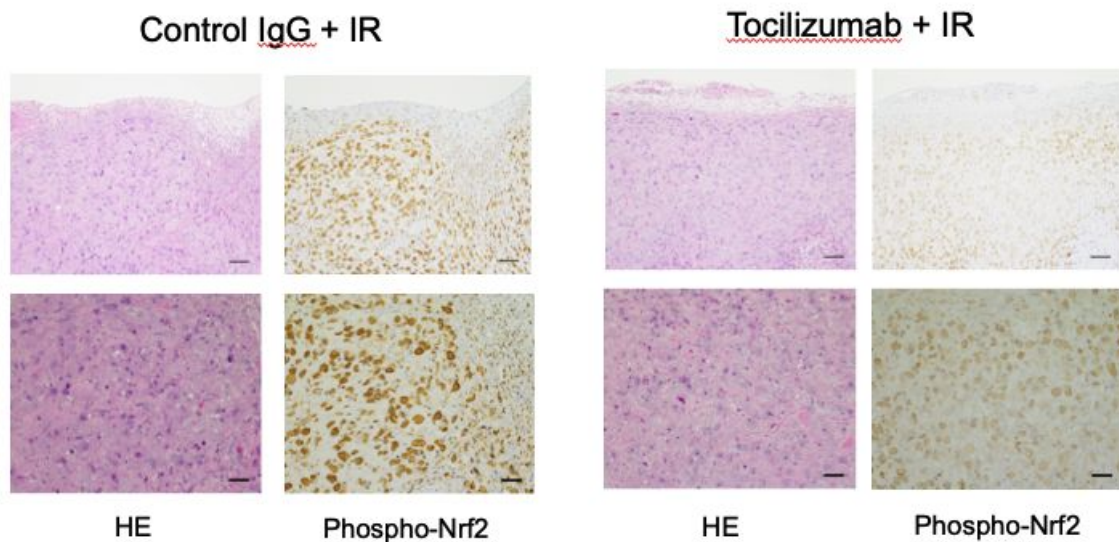


図 6. 移植腫瘍片におけるリン酸化 Nrf2 の発現

## 5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計 5 件)

Sakata J, Yoshida R, Matsuoka Y, Nagata M, Hirose 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 Med.* 査読有. 6(4):730-738, 2017, DOI: 10.1002/cam4.1005.

Arita H, Nagata M, Yoshida R, Matsuoka Y, Hirose 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.* 査読有. 2017 Oct;39(10):1010428317731771. DOI: 10.1177/1010428317731771.

Sakata S, Matsuoka Y, Kawahara K, Kakiuchi Y, Takaki A, Hirose A, Yoshida R, Saeki S, Fujii K, Nakayama H. **Severe interstitial pneumonia associated with anti-PD-1 immune checkpoint antibody after talc slurry pleurodesis.** *Respir Investig.* 査読有. 2018 Mar;56(2):195-198. doi: 10.1016/j.resinv.2017.11.006.

Sakata J, Yamana K, Yoshida R, Matsuoka Y, Kawahara K, Arita H, Nakashima H, Nagata M, Hirose A, Kawaguchi S, Gohara S, Nagao Y, Hiraki A, Shinohara M, Toya R, Murakami R, Nakayama H. Tumor budding as a novel predictor of occult metastasis in cT2N0 tongue squamous cell carcinoma. *Hum Pathol.* 査読有. 2018 Jun;76:1-8. doi:



10.1016/j.humpath.2017.12.021.

Nakashima H, Yoshida R, Hirose A, Kawahara K, Sakata J, Arita H, Yamamoto T, Toya R, Murakami R, Hiraki A, Shinohara M, Ito T, Kuwahara Y, Nakayama H. Circulating miRNA-1290 as a potential biomarker for response to chemoradiotherapy and prognosis of patients with advanced oral squamous cell carcinoma: A single-center retrospective study. *Tumour Biol.* 査読有. 2019 Mar;41(3):1010428319826853. doi: 10.1177/1010428319826853.

[学会発表](計9件)

Yuichiro Matsuoka, Ryoji Yoshida, Akiyuki Hirose, Takuya Tanaka, Masashi Nagata, Kenta Kawahara, Junki Sakata, Hidetaka Arita, Hikaru Nakashima, Akimitsu Hiraki, Masanori Shinohara, Hideki Nakayama

口腔扁平上皮癌の放射線抵抗性獲得機構における癌微小環境の役割- Interleukin-6/Nrf2 antioxidant pathwayの関与-

第41回日本頭頸部癌学会、2017年6月8日～9日、ウエスティン都ホテル京都、京都、口演  
有田 英生、吉田 遼司、松岡 祐一郎、廣末 晃之、永田 将士、川原 健太、坂田 純基、中嶋 光、川口 翔、郷原 俊輔、永尾 優果、山名 啓介、中山 秀樹

The role of IL-6 on radioresistance in oral squamous cell carcinoma

第76回日本癌学会学術総会 2017年9月28-30日、パシフィコ横浜、横浜、ポスター  
Yuichiro Matsuoka, Ryoji Yoshida, Akiyuki Hirose, Kenta Kawahara, Junki Sakata, Hidetaka Arita, Hikaru Nakashima, Akimitsu Hiraki, Masanori Shinohara, Hideki Nakayama

口腔扁平上皮癌の放射線耐性における癌微小環境の役割- IL-6/Nrf2抗酸化経路の関連-

第62回日本口腔外科学会総会・学術大会、2017年10月20日～22日、国立京都国際会館、京都、ポスター

松岡祐一郎、吉田遼司、廣末晃之、坂田純基、有田英生、中嶋光、尾木秀直、平木昭光、篠原正徳、中山秀樹

抗酸化ストレス調節因子である Nrf2 は口腔扁平上皮癌の放射線耐性を制御する

第36回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会、2018年1月25日-26日、新潟グランドホテル、新潟、ポスター

有田 英生、吉田 遼司、松岡 祐一郎、廣末 晃之、永田 将士、川原 健太、中嶋 光、坂田 純基、郷原 俊輔、永尾 優果、川口 翔、山名 啓介、中山 秀樹

口腔扁平上皮癌における IL-6、IL-6R シグナリングによる放射線感受性効果の有用性

第72回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会 2018年5月11-13日、ウイング愛知、愛知、ポスター

Yuichiro Matsuoka, Ryoji Yoshida, Akiyuki Hirose, Masashi Nagata, Kenta Kawahara, Junki Sakata, Hidetaka Arita, Hikaru Nakashima, Akimitsu Hiraki, Masanori Shinohara, Hideki Nakayama

Nrf2, anti-oxidative stress-regulatory factor, controls resistance to radiation in oral squamous cell carcinoma 第77回日本癌学会学術総会、2018年9月27日-29日、大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル大阪、大阪、ポスター

Hidetaka Arita, Ryoji Yoshida, Yuichiro Matsuoka, Akiyuki Hirose, Kenta Kawahara, Junki Sakata, Hikaru Nakashima, Sho Kawaguchi, Shunsuke Gouhara, Yuka Nagao, Keisuke Yamana, Hideki Nakayama

Investigation of the effect of tocilizumab on radiosensitivity in oral squamous cell carcinoma

第77回日本癌学会学術総会、2018年9月27-29日、大阪国際会議場、大阪、ポスター

Yuichiro Matsuoka, Masahiro Maki, Ryoji Yoshida, Akiyuki Hirose, Kenta Kawahara, Junki Sakata, Hidetaka Arita, Hikaru Nakashima, Masanori Shinohara, Hideki Nakaya

抗酸化ストレス調節因子 Nrf2 は口腔扁平上皮癌の放射線耐性を制御する  
第63回日本口腔外科学会総会・学術大会、2018年11月2日-4日、幕張メッセ国際会議場・国際展示場、千葉、ポスター

有田 英生、吉田 遼司、松岡 祐一郎、廣末 晃之、永田 将士、川原 健太、中嶋 光、坂田 純基、郷原 俊輔、永尾 優果、川口 翔、山名 啓介、中山 秀樹

口腔扁平上皮癌におけるトシリズマブによる放射線感受性効果の検討

第37回日本口腔腫瘍学会総会・学術集会 2019年1月24-25日、長崎ブリックホール、長崎、ポスター

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況（計0件）

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：有田 英生

ローマ字氏名：Arita Hidetaka

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。