

令和 2 年 5 月 14 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11870

研究課題名(和文) 口腔癌の高浸潤性獲得メカニズムと微小管の関連解析

研究課題名(英文) Association analysis of microtubules and the mechanism of highly invasive acquisition in oral cancer

研究代表者

北原 寛子 (Kitahara, Hiroko)

金沢大学・附属病院・医員

研究者番号：70507053

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、微小管阻害薬であるエリブリン、パクリタキセル、ビンブラスチンの効果を、高浸潤頭頸部扁平上皮癌(OLC01, OSC-19)細胞を用いて検討した。結果、エリブリンがOLC01細胞に対して、パクリタキセルやビンブラスチンよりも高い感受性があることを明らかにした。また、エリブリンの高感受性はTUBB3の発現低下と相関していた。マウスの舌にOLC01を移植し、微小管阻害薬を投与、エリブリンは高い増殖抑制作用を示した。

以上の結果より、エリブリンは高浸潤頭頸部癌に選択的に高感受性を示す可能性が示唆され、エリブリンの頭頸部癌への適応拡大の可能性があると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

R/M SCCHNに対する薬物療法は手術療法、放射線療法とともに集学的治療の一環として行われてきたが、近年その役割は大きくなってきている。本研究は口腔癌の高浸潤性獲得メカニズムと微小管の関連を解析し、高浸潤口腔扁平上皮癌の克服のための情報提供を目指した。本研究で使用した薬剤はいずれも臨床での使用がすでに承認されていることから、迅速に新しい医師主導の臨床研究へと移行でき、すでに市販されている薬の新しい適応症を発見することで、臨床で使用されるまでの時間が大幅に短縮される可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In the present study, the effects of eribulin, paclitaxel and vinblastine were investigated in recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (R/M SCCHN) (OLC-01 and OSC-19). Eribulin was highly sensitive to OLC01 cells in comparison with paclitaxel and vinblastine. The reduced expression of Tubulin Beta 3 Class III following treatment was correlated with a high sensitivity to eribulin. The anticancer effect of eribulin, paclitaxel and vinblastine were evaluated in OLC01 human R/M SCCHN xenograft models using mice. Eribulin exhibits significant and superior in vivo anticancer efficacy at much lower concentrations than paclitaxel and vinblastine.

In conclusion, the present study suggested that eribulin may be selectively sensitive to R/M SCCHN. As a clinically approved drug, the continued investigation of the preclinical antitumor attributes of eribulin may significantly contribute to future progress in identifying novel uses of eribulin against R/M SCCHN.

研究分野：口腔外科

キーワード：口腔扁平上皮癌 微小管阻害薬

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

体内で常に生成される癌細胞は腫瘍免疫により大部分が死滅するが、癌組織には複数のがん免疫逃避機構があり、悪性度の高い癌細胞は様々な環境で免疫寛容を成立させ生存している。再発または遠隔転移を有する頭頸部扁平上皮癌：R/M SCCHN(Recurrent and/or Metastatic Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck)の浸潤先端部では、僅か数個の癌細胞が周囲微小環境で免疫寛容を成立させ腫瘍免疫から逃れ生存している。画像や手術中に、この少数個の癌細胞を検出することは極めて困難なため、腫瘍切除範囲の設定を誤り、再発の可能性が高まる。よって、現在でも R/M SCCHN 患者は予後不良で根本的な治療が困難である。R/M SCCHN に対する薬物療法は手術療法、放射線療法とともに集学的治療の一環として行われてきたが、近年その役割は大きくなってきている。新しい分子標的薬の開発にもかかわらず依然として生存率は厳しい状況にある。

近年、上皮細胞の EMT において微小管が関わることが報告され<sup>(1)</sup>、さらに微小管阻害薬のエリブリンが上皮間葉移行(EMT)から間葉上皮移行(MET)状態に表現型を逆転させることによって乳癌細胞の実験的転移を抑制することが報告された<sup>(2)</sup>。この結果を踏まえて、悪性度の異なる頭頸部扁平上皮癌細胞株に対するエリブリンの増殖阻害活性を調べた。その結果、R/M SCCHN 細胞は最も高い感受性を示し、乳癌細胞と比較しても一桁高い感受性を示していた。さらに、この R/M SCCHN 細胞はエリブリン処理により、MET が誘導されるとともに、EGFR の発現亢進が誘導されセツキシマブへの感受性が高まることを明らかにした<sup>(3)</sup>。

### 2. 研究の目的

これまでの結果より我々は乳がんに対する微小管阻害薬が R/M SCCHN に対して、特異的に高い感受性を持ち、さらに低浸潤性癌の表現型へ誘導することを見出した。

口腔扁平上皮癌の高浸潤性獲得メカニズムと微小管の関連を解析し、R/M SCCHN の克服のためエリブリンが新規治療薬としての可能性を評価する。

### 3. 研究の方法

#### (1)細胞株

局所進行性頭頸部扁平上皮癌患者から樹立した浸潤様式 3 型：OSC20 細胞、再発・転移性頭頸部扁平上皮癌患者から樹立した浸潤様式 4C 型：OSC19 細胞、4D 型：OLC01 細胞を使用。コントロールとしてヒト正常口腔粘膜線維芽細胞:KD を用いた。

#### (2)Proliferation assay

3 種の SCCHN 細胞株を 96 ウェルプレートに播種し、0, 0.01, 0.1, 1, 5, 10 nM の微小管阻害薬エリブリン、パクリタキセル、ビンブラスチンを添加し、それぞれ 3 日間培養後、CellTiter 96 Aqueous を使用して、マイクロプレートリーダー (iMark マイクロプレートリーダー; BioRad Laboratories, Inc. Hercules, CA, USA) にて細胞数を測定、平均 IC<sub>50</sub> 値を算出した。

#### (3)RNA 抽出および RT-qPCR

3 種の SCCHN 細胞株から TRI Reagent(Merck KGaA), PureLink RNA Mini kit(Thermo Fisher Scientific, Inc. Tokyo, Japan) を使用して RNA を抽出。PrimeScript 1st strand cDNA Synthesis kit(Takara Biotechnology, Inc. Tokyo, Japan) を使用して cDNA を合成。HEX/ZEN/IBFQ ラベルプローブを用いた TaqMan probe 法による real-time RT-PCR 法を用い比較 Ct 法にて定量化した。

#### (4)Western blot analysis

IC<sub>50</sub> 濃度の微小管阻害薬で処理した各細胞からタンパク質を抽出。Western blot 法にて検出。10%SDS-PAGE にて電気泳動後、PVDF メンブレンに転写。一次抗体として anti-TUBB3 (cat.no.52623:Abcam, Tokyo, Japan), 二次抗体として anti-mouse IgG (cat.no.7076:Cell Signalling Technology, Inc. Danvers, MA, USA) を使用。ECL Primer Western Blotting Detection Reagent(GE Healthcare Little Chalfont, UK) にて処理し、C-DiGit(M&S TechnoSystems, Tokyo, Japan) にて可視化した。

#### (5)同所性異種移植研究

1 × 10<sup>6</sup> 個 OLC01 細胞を 5~6 週齢雌 NOD-SCID マウスの舌に移植し、移植後 3, 5, 7 日目に微小管阻害薬を尾静脈より投与し、10 日目に犠牲死し、舌の腫瘍サイズを測定した。舌の腫瘍標本はホルマリン固定後、パラフィン包埋し、厚さ 4 μm の切片を作成。HE 染色した。

### 4. 研究成果

#### (1)SCCHN 細胞に対する微小管阻害薬の感受性

各細胞株に微小管阻害薬を添加し増殖抑制効果を比較した。微小管阻害薬はそれぞれ OLC01 細胞に高い感受性を示した。また、OLC01 細胞においてエリブリンはパクリタキセル、ビンブラスチンよりも高い増殖抑制効果を認め、高い感受性を示した (Figure1, Table1)。

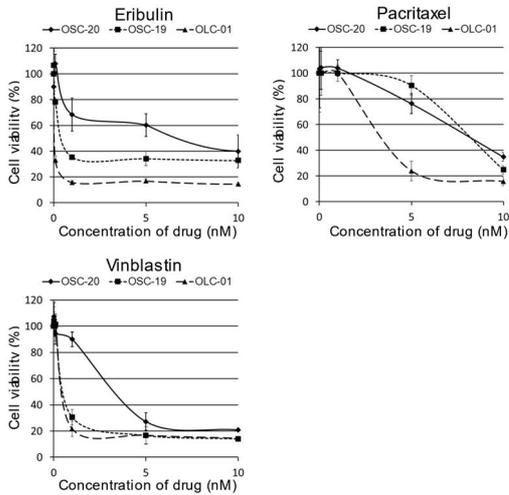


Figure 1. SCCHN に対する微小管阻害薬の効果

Table I. The effects of microtubule inhibitors on SCCHN cell lines.

Drug	IC <sub>50</sub> (nM)		
	OSC-20	OSC-19	OLC-01
Eribulin	5.673 (1.765)	0.512 (0.060)	0.063 (0.008)
Paclitaxel	6.924 (0.513)	6.224 (0.779)	3.366 (0.419)
Vinblastine	3.263 (0.372)	0.511 (0.058)	0.534 (0.114)

Values are expressed as the mean (SEM).

### (2) SCCHN 細胞でのチューブリンの発現

エリブリンの発現は TUBB3 の発現低下と相関することが既に論文で報告されている<sup>(4)</sup>。そこで OLC01 細胞のエリブリンに対する高感度のメカニズムを分析するためチューブリンの発現を分析することとした。OSC-20 細胞では TUBB2A, TUBB4B の発現が高く、OLC01 細胞では TUBB3 において他の細胞よりも高く発現していた(Figure2)。続いて各細胞を微小管阻害薬にて処理した後に、TUBB3 の発現を検討した。OLC01 細胞にエリブリンを処理すると TUBB3 の発現は低下しました。一方で OSC-19 細胞、OSC-20 細胞では発現低下が認められませんでした。(figure3A)。続いて TUBB3 のタンパク質の発現を検討したところ、同様に OLC01 細胞ではエリブリン処理後に発現低下を示した(Figure3B)。

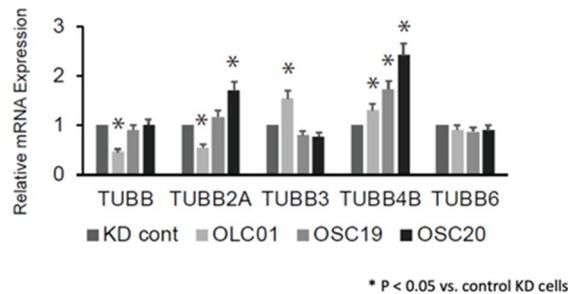


Figure2. SCCHN 細胞におけるチューブリンの発現

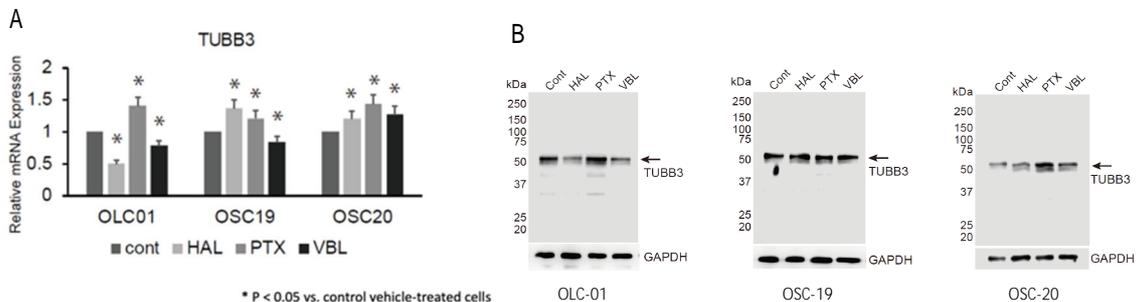


Figure3. SCCHN 細胞における TUBB3 の発現 (A)RT-qPCR における RNA 発現 (B) Western blot analysis におけるタンパク質発現

### (3) 微小管阻害薬投与による同所性異種移植腫瘍の増殖抑制効果

OLC01 細胞を使用し作成した同所性異種移植腫瘍モデルにて各微小管阻害薬の腫瘍抑制作用効果を検討した。パクリタキセルでは 0.5mg/kg では 7 日目に増殖抑制が見られたが、0.125mg/kg では抑制効果が認められませんでした。ビンブラスチンではコントロールと比較し 35.5-73.3% の腫瘍抑制が見られた。また、エリブリン投与群は 0.125mg/kg, 0.5mg/kg 共に腫瘍の縮小を認めました。コントロール群と比較すると 95%以上の増殖抑制を示しました(figure4A,B)。次に移植腫瘍標本を HE 染色した。コントロール群では間質への腫瘍細胞の浸潤像が認められた。エリ

プリン投与群では矢印で示すような空胞変性や異常な有糸分裂像が認められたが、パクリタキセル投与群、ビンブラスチン投与群ではエリブリン投与群で見られたような変化は認められなかった。

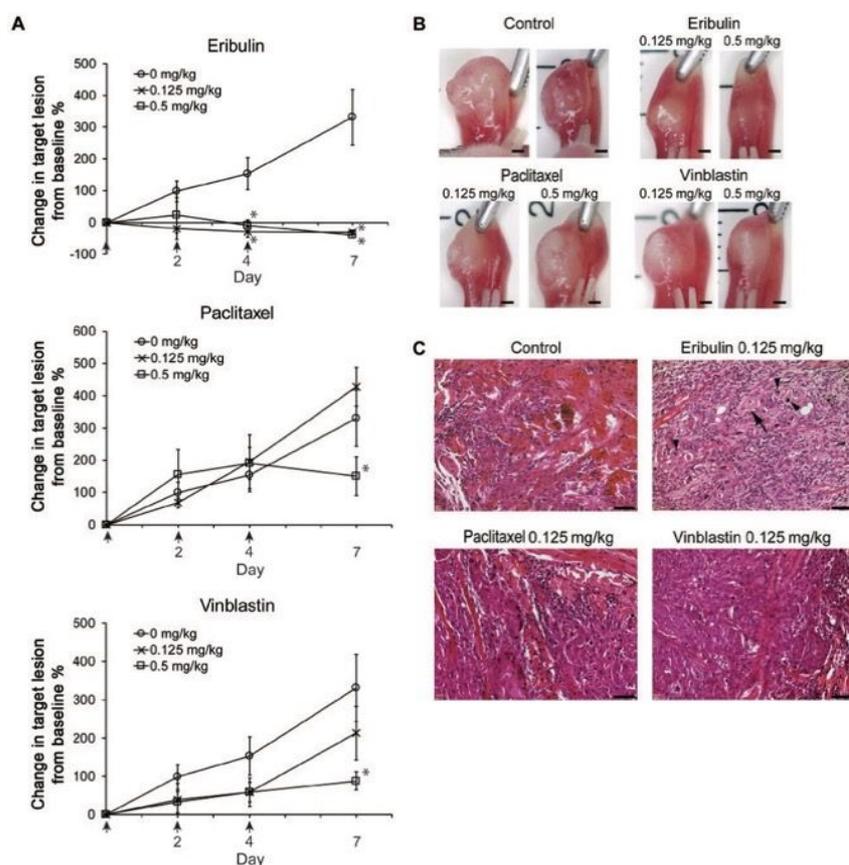


Figure4. 同所性異種移植腫瘍モデルへの微小管障害薬投与 (A)微小管障害薬による増殖抑制効果 (B)微小管障害薬投与後7日目の舌腫瘍 スケールバー:1mm (C)移植腫瘍標本のHE染色像 スケールバー:50 $\mu$ m

エリブリンは R/M SCCHN に選択的に高感受性を示す可能性が示唆され、エリブリンの頭頸部扁平上皮癌への適応拡大の可能性があると考えられた。

<引用文献>

Nakaya Y, Sukowate EW, et al:RhoA and Microtubule dynamics control cell-basement membrane interaction in EMT during gastrulation. *Nat Cell Biol* 10(7):765-775, 2008.

Yoshida T, Ozawa Y, et al:Eribulin mesylate suppresses experimental metastasis of breast cancer cells by reversing phenotype from epithelial-mesenchymal transition(EMT) to mesenchymal-epithelial transition(MET) states. *Br J Cancer* 110(6):1497-1505, 2014.

Kitahara H, Hirai M, et al:Eribulin sensitizes oral squamous cell carcinoma cells to cetuximab via induction of mesenchymal-to-epithelial transition. *Oncology reports* 36:3139-3144, 2016.

Wilson L, Lopus M, et al:Effects of eribulin on microtubule binding and dynamic instability are strengthened in the absence of the  $\beta$  tubulin isotype. *Biochemistry* 54(42):6482-6489, 2015.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hira-Miyazawa Mayuko, Nakamura Hiroyuki, Hirai Mariko, Kobayashi Yutaka, Kitahara Hiroko, Bou-Gharios George, Kawashiri Shuichi	4. 巻 52
2. 論文標題 Regulation of programmed-death ligand in the human head and neck squamous cell carcinoma microenvironment is mediated through matrix metalloproteinase-mediated proteolytic cleavage	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Oncology	6. 最初と最後の頁 379-388
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ijo.2017.4221	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Miyazawa H, Kato K, Kobayashi Y, Hirai M, Kitahara H, Nakamura H, Kawashiri S	4. 巻 25
2. 論文標題 Clinicopathological Significance of the ET Axis in Human Oral Squamous Cell Carcinoma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pctiology & Oncology Research	6. 最初と最後の頁 1083-1089
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12253-018-0514-5.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kobayashi Y, Kitahara H, Hirai M, Tanaka A, Jokaji R, Kobayashi K, George Bou-Gharios, Nakamura H, Kawashiri S	4. 巻 17
2. 論文標題 Selectively high efficacy of Eribulin against high-grade invasive recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 5064-5072
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2019.10165	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 R.Jyokaji, K.Ooi, K.Ide, M.Ishimiya, Y.Kobayashi, H.Kitahara, N.Noguchi, K. katoh, H.Nakamura, S.Takamichi, M.Nakata, K.Kasahara, S.Kawashiri
2. 発表標題 Perioperative Evaluation and Management of Obstructive Sleep Apnea after Mandibular Setback by Saggital Splitting Ramus Osteotomy
3. 学会等名 23rd International Conference on Oral and Maxillofacial Surgeon（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 加藤広祿、北原寛子、野口夏代、中村博幸、川尻秀一
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌細胞のIndadopodia形成と癌関連線維芽細胞(CAF)との関連
3. 学会等名 第41回頭頸部癌学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hirai M, Kitahara H, Kobayashi Y, Nakamura H, Kawashiri S
2. 発表標題 The role of PD-L1 in a high-grade invasive human oral squamous cell carcinoma microenvironment
3. 学会等名 European Society for Medical Oncology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kitahara H, Hirai M, Kobayashi Y, Nakamura H, Kawashiri S
2. 発表標題 Oral Squamous cell carcinoma cells were sensitized to cetuximab by Eribulin via induction of the mesenchymal-to-epithelial transition
3. 学会等名 European Society for Medical Oncology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 吉本泰祐、加藤広祿、本保敦志、北原寛子、大井一浩、中村博幸、川尻秀一
2. 発表標題 舌に発生した平滑筋腫の1例
3. 学会等名 第60回日本口腔科学会中部地方会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 北原寛子、加藤広禄、小林一彦、川尻秀一
2. 発表標題 下顎下縁の歯牙様硬組織に起因した外歯瘻の1例
3. 学会等名 第62回日本口腔外科学会総会学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kitahara H, Kobayashi Y, Hirai M, Nakamura H, Kawashiri S
2. 発表標題 Eribulin demonstrate selectively high sensitivity to recurrent and/or metastatic head and neck squamous cell carcinoma (R/M HNSCC) cellos and xenograft tumors
3. 学会等名 European Society for Medical Oncology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hirai M, Kobayashi Y, Hira-Miyazawa M, Kitahara H, Nakamura H, Kawashiri S
2. 発表標題 Matrix metalloproteinase-mediated regulation of programmed-death ligand in the human head and neck squamous cell carcinoma microenvironment
3. 学会等名 European Society for Medical Oncology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小林泰、中村博幸、北原寛子、川尻秀一
2. 発表標題 エリブリンの高浸潤性頭頸部癌に対する選択的高感受性の検討
3. 学会等名 第43回頭頸部癌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤広祿、宮澤広樹、小林久乃、北原寛子、野口夏代、大井一浩、川尻秀一
2. 発表標題 当科で治療を行った舌扁平上皮癌stage 、 症例における潜在的頸部リンパ節転移と病理組織学的因子との関係
3. 学会等名 第43回頭頸部癌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北原寛子、加藤広祿、宮澤広樹、小林久乃、野口夏代、大井一浩、川尻秀一
2. 発表標題 重症型血友病Bの幼児の上顎骨に生じた血友病性偽腫瘍の1例
3. 学会等名 第64回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北原寛子、加藤広祿、小林一彦、川尻秀一
2. 発表標題 重症型血友病Bの幼児の上顎骨に生じた血友病性偽腫瘍の1例
3. 学会等名 第31回日本小児口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	中村 博幸  (nakamura hiroyuki)  (30542253)	琉球大学・大学院医学研究科・教授    (18001)	