

令和 2 年 6 月 24 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11880

研究課題名(和文) 臨床的放射線耐性口腔癌細胞を用いた放射線抵抗因子の解明

研究課題名(英文) Study of clinically radio-resistance factors using clinical radiation-resistant oral cancer cells

研究代表者

山本 哲彰 (YAMAMOTO, NORIAKI)

大分大学・医学部・講師

研究者番号：50397923

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：臨床的放射線耐性口腔扁平上皮癌細胞を樹立し、口腔癌の放射線耐性メカニズムを分析した。連日2 Gyの線照射を行っても安定して増殖し続ける臨床的放射線耐性細胞株を作成し、細胞形態、細胞増殖能、DNA修復能力を、親株と比較した。EMT関連タンパク質にの発現を評価した。結果：放射線耐性細胞株の細胞形態は紡錘形に変化し、増殖能は親株と比較して低下したが、線照射下でも増殖し続けた。DNA修復能は上昇しており、EMT関連タンパク質の発現変化を認めた。結論：放射線耐性口腔扁平上皮癌細胞株は、EMT関連タンパク質の発現変化を認め、活性酸素によるDNA損傷に対する耐性を持っていると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔扁平上皮癌における放射線抵抗因子の解析を、より実際の治療に即したものとするための、臨床的口腔扁平上皮癌細胞株を作成して口腔扁平上皮癌における放射線耐性の解析を行った。臨床的放射線耐性細胞株とは実際の放射線治療後に残存する細胞をモデルとした、連日2Gyの放射線照射を行っても増殖し続ける細胞である。本研究では放射線耐性を獲得した細胞に上皮間葉転換を示唆する変化を認めており、活性酸素によるDNA損傷に対する耐性を獲得している事を解明した。今後この細胞を用いてより実臨床に近いかたちで口腔癌における放射線耐性克服の研究を進める事が可能であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：To establish the clinically radio-resistant OSCC to analyze the molecular mechanisms of the radio-resistant OSCC associated with radiotherapy for oral cancers. We create radio-resistant cell lines that continued to grow stably after irradiation of 2Gy daily. Cell morphology, cell growth ability, DNA repair capacity were compared between the parent and radio-resistant cell lines. In addition, status of expression in EMT-related proteins was evaluated. The cell morphologies presented a fusiform shape. Growth abilities of radio-resistant cell lines were decreased, but were able to maintain undiminished cell growth under ray irradiation. DNA repair capacity were elevated. In addition, some EMT-related proteins were over- or under-expressed in respective. The radio-resistant oral squamous cell carcinoma cell lines were established through the resistance against DNA damage derived from the active oxygen species created by irradiation and alternative expression of some EMT-related proteins.

研究分野：口腔外科学

キーワード：口腔扁平上皮癌 放射線耐性

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

頭頸部癌に含まれる口腔癌(舌、歯肉、頬粘膜、口底)は、他の頭頸部癌とは異なった性質であり、いまだに切除手術が第一選択であるが(NCCN ガイドライン)、拡大切除手術はQOL を大きく落とすこととなる。放射線療法、化学療法も行われているが、他の頭頸部癌と比較して放射線感受性が低く第一選択とはなり得ていない。手術拒否例・不能例に対して放射線治療を行うことが多いが、十分な成績は得られておらず、また治療後に再発した症例のサルベージは困難である。

放射線抵抗性に対するほとんどの研究では異なる細胞株間での感受性の差、または阻害剤などによる処理を行う事で耐性を誘導しており、実際の臨床像とはかなり異なっているのが現状である。口腔癌における標準的な根治的放射線治療では1日2Gyで30回程度の照射を行っており、この治療を行ってなお残存する腫瘍細胞の性質を解明することが重要であると考えている。

本研究では口腔扁平上皮癌細胞株を用いて作成した臨床的放射線耐性細胞株を用いて行い、口腔扁平上皮癌の放射線耐性の克服、また周囲正常組織への副作用の軽減への標的となりうる分子の検索を行う。

### 2. 研究の目的

口腔癌における放射線抵抗因子の解析を、より実際の治療に即したものとするために口腔扁平上皮癌細胞株を用いて作成した臨床的放射線耐性細胞株を用いて行い、口腔扁平上皮癌の放射線耐性の克服、また周囲正常組織への副作用の軽減への標的となりうる分子の検索を行うことを目的として研究を行った。

臨床的放射線耐性細胞株とは実際の放射線治療後に残存する細胞をモデルとした、連日2Gy 照射を行っても増殖し続ける細胞である。現在、放射線抵抗性に対するほとんどの研究では異なる細胞株間での感受性の差、または阻害剤などによる処理を行う事で耐性を誘導しており、実際の臨床像とはかなり異なっているのが現状であるが、口腔癌における標準的な根治的放射線治療では1日2Gyで30回程度の照射を行っており、この治療を行ってなお残存する腫瘍細胞の性質を解明することが重要であると考えている。

本研究では口腔扁平上皮癌細胞株を用いて臨床的放射線耐性口腔扁平上皮癌細胞株を作成し、解析を行い、その結果を早期に実際の放射線治療の場への臨床応用が可能となる知見を得ることを目的としている。

### 3. 研究の方法

(1) 口腔扁平上皮癌細胞株を用いて作成した、臨床的放射線耐性細胞株を用いて、耐性化による癌細胞の形態、増殖能および放射線感受性がいかに変化するかを調べ、遅発性活性酸素と抗酸化酵素の亢進、またはDNA 二重鎖切断の修復効率との関連性を明らかにする。

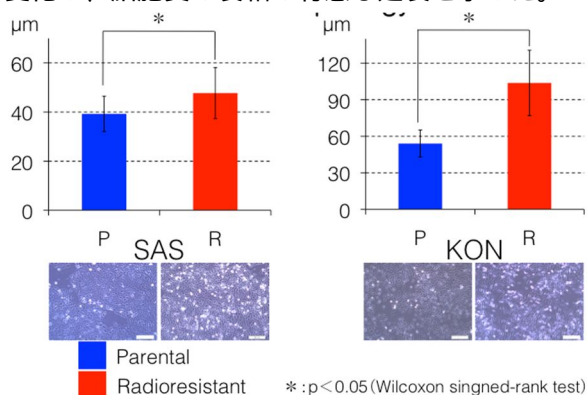
(2) 臨床的放射線耐性細胞株の網羅的解析を行い、放射線耐性に係わる分子をピックアップする。

### 4. 研究成果

口腔扁平上皮癌細胞株 KON、SAS を用いて臨床的放射線耐性細胞株を作成した。

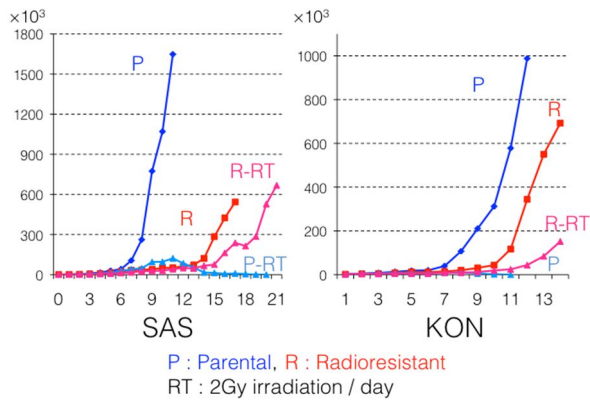
#### (1) 細胞の形態解析

放射線耐性となる前の KON、SAS 多面体形状であり、放射線耐性を獲得した KON、SAS は紡錘形に変化し、細胞質の長軸の有意な延長を示した。



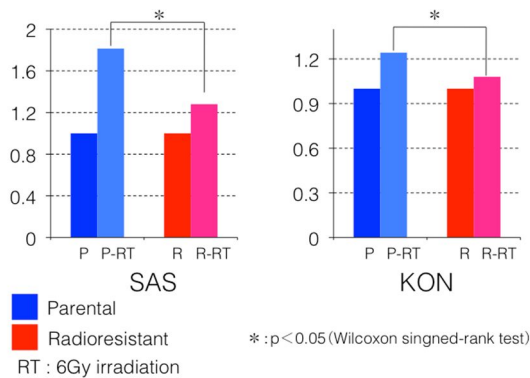
#### (2) 放射線耐性能の検討

KON, SAS 放射線抵抗性細胞の増殖能力は、対応する親細胞の増殖能力よりも低かったが、2.0Gy 照射と非照射の条件下では、放射線抵抗性細胞の増殖率に差はなかった。



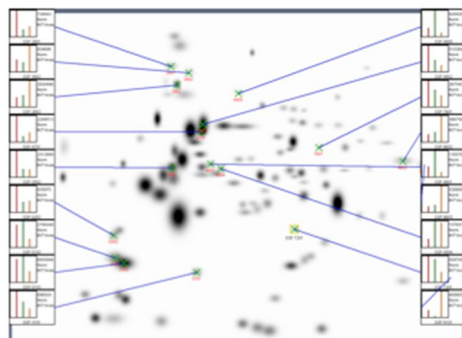
### (3) 細胞内活性酸素の検討

細胞内活性酸素種は、6.0Gyの単回照射直後の両放射線抵抗性細胞で有意に低かった。これは、放射線耐性細胞においてDNA修復能力が上昇したことを示していると考えられた。



### (4) 網羅的解析

KON細胞株も用いてプロテオーム解析を行ったところ、耐性細胞株で2倍以上の発現上昇を認めたスポットを6個(ビメンチン等)、1/2以下の発現低下を認めたスポットを12個(HSp-70等)認めた。

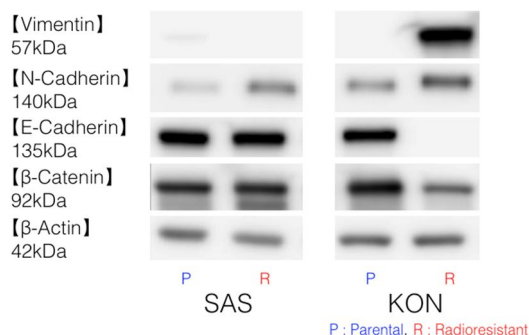


2倍以上、1/2以下の変動を認めたスポットを18個同定した。

- ・発現上昇: 6スポット
- ・発現低下: 12スポット

### (5) ENT 関連蛋白質の解析

細胞形態の変化やビメンチンの発現上昇を認めたため、EMTが誘導されていると考えられたため、EMT関連タンパク質の発現に関して検討を行ったところ、KONでは、ビメンチンのアップレギュレーションおよび照射後のE-カドヘリンおよびβ-カテニンのダウンレギュレーションを示し、SASではE-カドヘリンのダウンレギュレーションおよびN-カドヘリンのアップレギュレーションを示した。



以上の結果から放射線耐性細胞において、細胞内活性酸素を除去するための DNA 修復能力の増加によって線に対する耐性を獲得していると考えられた。さらに、形態学および EMT 関連タンパク質発現の変化は、線照射によって EMT 現象を誘発することを実証した。

#### (6) 今後の展望

網羅的解析にて得られた放射線耐性に関連が強いとされる分子を同定し、標的因子となり得るか、中和抗体等を用いて検討を行う。

細胞レベルで確認が取れた標的候補因子を、ヌードマウス移植腫瘍系を用いて、in vivo で評価する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 山本哲彰
2. 発表標題 Changes of DNA repair capacity and EMT-related protein expression by irradiation in oral squamous carcinoma cells
3. 学会等名 13th Asian Congress on Oral and Maxillofacial Surgery (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山本哲彰
2. 発表標題 臨床的放射線耐性口腔扁平上皮癌細胞の樹立とその解析
3. 学会等名 日本口腔腫瘍学会総会
4. 発表年 2017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	菓子野 元郎  (KASHINO GENROU)  (00437287)	奈良県立医科大学・医学部・准教授    (24601)	
研究分担者	小橋川 新子 (菓子野新子)  (KOBASHIKAWA SINKO)  (70637628)	京都大学・複合原子力科学研究所・研究員    (14301)	