

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：18001
 研究種目：基盤研究(C) (一般)
 研究期間：2018～2020
 課題番号：18K09729
 研究課題名(和文) 抗癌剤耐性高分化型口腔癌に対するEphA4を標的とした分子生学的メカニズムの解明

研究課題名(英文) Clarification of molecular biological mechanism targeting EphA4 against the anticancer drug resistance well-differentiated oral squamous cell carcinoma

研究代表者
 仲宗根 敏幸 (Nakasone, Toshiyuki)
 琉球大学・病院・講師

研究者番号：40381214
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：高分化型腫瘍は、抗癌剤耐性である。受容体型チロシンキナーゼEphA4は、子宮頸がんにおいて高分化型由来細胞株においてのみ発現していた。我々は、活性酸素-SFK-EphA4の経路は抗癌剤耐性を打破しうる有力なターゲットとなる可能性を示した。術前にS-1が投与された舌癌患者集団においては、術前にUFTが投与された患者集団と比較して、pCRの割合が有意に高くなっていた。さらに術前にS-1を使用したメトロノーム化学療法を行うと、disease-free survivalが有意に改善された。このことから、術前メトロノーム化学療法においては、薬剤の選択が重要であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義
 低容量頻回投与で化学療法を行うメトロノーム化学療法において、高分化型腫瘍が低分化型腫瘍と比較して、耐性であることを報告した。高分化型腫瘍においてはEphA4が高発現していた。EphA4は抗癌剤耐性に関与している可能性が示唆された。メトロノーム化学療法では、抗癌剤感受性が良好なレジメを使用することで、早期舌癌患者のdisease-free-survivalが改善していた。これにより、高分化型腫瘍の抗癌剤耐性を担っているEphA4をターゲットとすることで、さらなる予後の改善が期待できることが示された。

研究成果の概要(英文)：Well-differentiated tumors are intrinsically chemotherapy resistant. Receptor tyrosine kinase erythropoietin-producing human hepatocellular receptor A4 (EphA4) protein is highly expressed in the well-differentiated tumor-derived cervical cancer cell line. Reactive oxygen species-SFK-EphA4 axis is shown to be new potential drug targets for chemotherapy resistance. Patients who received S-1 were more likely than those who received UFT to have pathological complete response. Neoadjuvant S-1 significantly improved disease-free survival as compared with up-front surgery. A choice of drugs for neoadjuvant metronomic chemotherapy is needed.

研究分野：口腔腫瘍外科学

キーワード：メトロノーム化学療法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々は、外科療法前に 5-FU 系の経口抗がん剤 (UFT or S-1) を低用量頻回投与する (metronomic chemotherapy) と、舌癌患者の生存率が上昇することを報告していた。同様に Fujii 等も、頭頸部腫瘍患者の術後に S-1 を投与することで生存率が有意に改善することを報告していた。化学療法を外科療法や放射線療法の術前に使用する際に、抗腫瘍効果が顕著であった場合に予後が良好であることが明らかになっていた。

抗癌剤感受性が、腫瘍のどのような特徴に関与しているのか検討するために琉球大学病院歯科口腔外科で行われた術前化学療法後の患者の腫瘍切除物における残存腫瘍の有無を病理学的に判定した。その結果、腫瘍が完全に消失した pathological complete response (pCR) の割合が、高分化型腫瘍では低分化型腫瘍と比較して、有意に低くなっていることが判明した。

2. 研究の目的

抗癌剤耐性には、抗癌剤曝露後に生じる活性酸素が関与している。この活性酸素が受容体型チロシンキナーゼを活性化することが、抗癌剤耐性機構の一つの重要な経路である。受容体型チロシンキナーゼは、様々な分子標的薬のターゲット分子となっており、これらの標的薬と化学療法を併用することで、劇的な抗腫瘍効果や生存率の改善が達成されている。

EphA4 (Erythropoietin-Producing Hepatocellular A4) は、EphA ファミリーに属する受容体型チロシンキナーゼである。そのリガンドとしては、ephrin A1 や ephrin A5 などが知られており神経軸索の反発因子として研究が盛んである。癌研究の分野においては、肺線癌や口腔癌において高分化型腫瘍で発現が高いことが知られている。口腔癌においては、放射線耐性癌細胞株において発現が高くなっており、放射線照射後、発現量が増大する。我々は、現在 EphA4 が子宮頸がん細胞株においても、高分化型細胞株において高発現していることをウェスタンブロットにより確認している。これまでのところ、EphA4 が抗癌剤耐性に関与しているとする報告はなされていない。本研究では、EphA4 が高分化型腫瘍の抗癌剤耐性に関与しているか検討することを目的とした。

3. 研究の方法

抗癌剤曝露依存的な EphA4 の下流では、具体的にどのような現象が生じているのか、その経路を確認する。

4. 研究成果

(1) 高分化型口腔癌はメトロノーム化学療法耐性である

術前に bleomycin を用いたメトロノーム化学療法が行われた口腔癌患者の外科切除組織に対して、組織学的抗腫瘍効果を分化度別に比較したところ、高分化型腫瘍は、低分化型腫瘍と比較して、pCR (pathological Complete Response) の割合が有意に低くなっていた (22% versus 53%)。この結果より、高分化型腫瘍はメトロノーム化学療法耐性であることが判明した。

(2) EphA4 は高分化型腫瘍特的に高発現し、シスプラチン曝露により活性化される

TCGA (The Cancer Genome Atlas) を用いた解析の結果、受容体型チロシンキナーゼ EphA4 が、頭頸部腫瘍において、高分化型で高発現していることが確認された。さらに子宮頸がん細胞株においても、高分化型由来の細胞株においてのみ発現していることをウェスタンブロットにより確認した。これらのことより、EphA4 は高分化型で高発現している受容体型チロシンキナーゼであることが示唆された。さらに免疫共沈実験により、EphA4 はシスプラチン曝露後にチロシンリン酸化レベルが上昇していることも確認できた。過酸化水素刺激によっても同様にチロシンリン酸化レベルの上昇が確認されたことから、シスプラチンによる活性化は過酸化水素を介して生じていることが予測された。

(3) EphA4 は IL24 の発現を減弱させ、TNF- α の発現を増大させる

シスプラチン曝露依存的に活性化される EphA4 の下流のシグナルを探索すべく、高分化型子宮頸がん由来細胞株である Caski 細胞に対して、シスプラチン単独曝露、EphA4 阻害剤処理後にシスプラチン曝露を行い、RNA を抽出した。その後、マイクロアレイを用いた解析を行い、どのような因子が EphA4 阻害依存的に活性化、あるいは不活性化されているかを検討した。その結果、TNF が EphA4 阻害依存的に抑制され、IL24 が逆に増大していることが判明し、リアルタイム PCR を用いた実験によっても同様の現象が観察された。

(4) 術前メトロノーム化学療法が disease-free survival に与える影響

5-FU 系プロドラッグを用いた術前メトロノーム化学療法は、外科切除単独と比較して早期舌癌の disease-free survival を改善しなかった (72 and 54%, respectively; hazard ratio for recurrence or death, 0.54; 95% confidence interval [CI], 0.28 to 1.03; P = 0.06)。そこで、5-FU プロドラッグのうち、UFT および S-1 を使用した患者群に分けて、pCR を比較した

ところ、UFT 使用群と比較して、S-1 使用群の方が pCR の割合が有意に高くなっていた (P = 0.007)。

(5) 術前メトロノーム化学療法のレジユメの違いが disease-free survival に与える影響
 UFT を用いた術前メトロノーム化学療法では、外科切除単独と比較して、disease-free survival の改善は認められなかった (67 and 54%; hazard ratio, 0.66; 95% CI, 0.31 to 1.33; P = 0.24)。しかしながら、S-1 を用いた術前メトロノーム化学療法では、disease-free survival が有意に改善していた (79% vs. 54%; hazard ratio, 0.41; 95% CI, 0.15 to 0.98; P = 0.04) (図 1)。

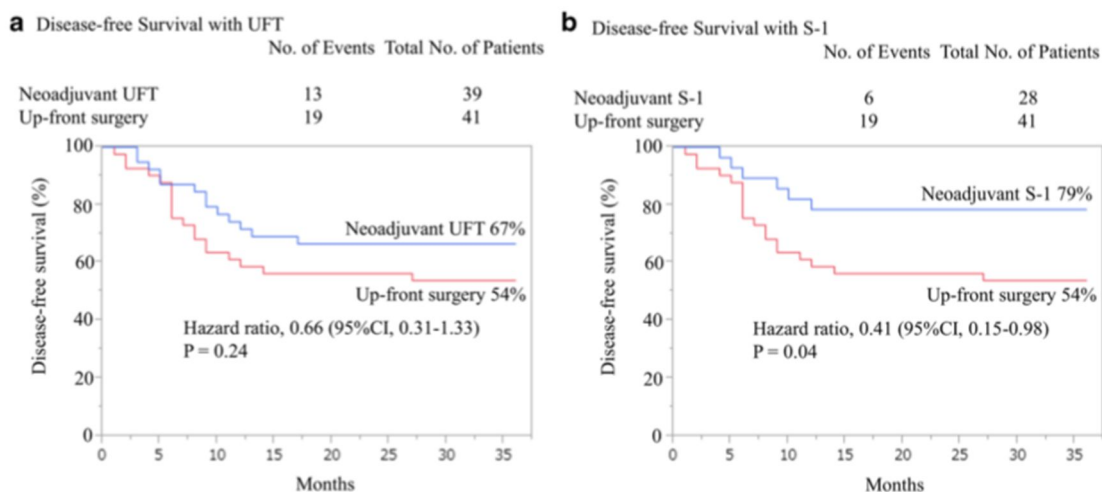


図 1

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 0件）

1. 著者名 Phanthavong Somphone, Nonaka Daisuke, Phonaphone Thongsavanh, Kanda Kyoko, Sombouaphan Phouphachanh, Wake Norie, Sayavong Sangvane, Nakasone Toshiyuki, Phongsavath Khampe, Arasaki Akira	4. 巻 14
2. 論文標題 Oral health behavior of children and guardians' beliefs about children's dental caries in Vientiane, Lao People's Democratic Republic (Lao PDR)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 1~10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0211257	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 Kina Shinichiro, Nakasone Toshiyuki, Kinjo Takao, Nimura Fumikazu, Sunagawa Nao, Arasaki Akira	4. 巻 -
2. 論文標題 Outcomes after up-front surgery and metronomic neoadjuvant chemotherapy with S-1 or UFT for early tongue squamous cell carcinoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clinical Oral Investigations	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00784-018-2689-2	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 Kina Shinichiro, Kinjo Takao, Liang Feixin, Nakasone Toshiyuki, Yamamoto Hideyuki, Arasaki Akira	4. 巻 840
2. 論文標題 Targeting EphA4 abrogates intrinsic resistance to chemotherapy in well-differentiated cervical cancer cell line	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 European Journal of Pharmacology	6. 最初と最後の頁 70~78
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejphar.2018.09.031	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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	金城 貴夫 (Kinjo Takao) (30284962)	琉球大学・医学部・教授 (18001)	
研究分担者	喜名 振一郎 (Kina Shinichiro) (40422422)	群馬大学・大学院医学系研究科・講師 (12301)	
研究分担者	喜名 美香 (Kina Mika) (80578914)	群馬大学・医学部附属病院・医員 (12301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関