

令和 3 年 5 月 12 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16900

研究課題名(和文) 薬剤耐性頭頸部扁平上皮癌における放射線耐性の検討と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Novel therapy for drug-resistant head and neck squamous cell carcinoma

研究代表者

波多野 芳美 (Hatano, Yoshimi)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・研究員

研究者番号：90792672

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：悪性腫瘍が再発する機序の一つとして、化学療法の繰り返しにより、抗癌剤に耐性な腫瘍細胞が残存し、増殖して再発腫瘍を形成すると考えられている。薬剤耐性獲得の機構を検討することにより、再発腫瘍を対象とした新規治療法の開発が可能となると考えられる。また、腫瘍溶解ウイルスは従来の化学療法と異なる機序で抗腫瘍効果を示すため、新規治療薬の選択肢となる可能性が考えられる。本研究ではシスプラチン、5-FU耐性株を作成し、その機序と腫瘍溶解ウイルスHF10の抗腫瘍効果を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では再発腫瘍が薬剤耐性を獲得する機序の解明と、再発腫瘍の新規治療薬の開発を目的とした。腫瘍溶解ウイルス療法が新規治療の候補として考えられたため、薬剤耐性株を作成し、薬剤耐性株への腫瘍溶解ウイルスの抗腫瘍効果につき検討した。薬剤耐性株は親株と比べて腫瘍造性能が強くなっていたが、腫瘍溶解ウイルスHF10は抗腫瘍効果を示した。以上の結果から、薬剤耐性となった腫瘍にも腫瘍溶解ウイルス療法が有力な治療候補として挙げられる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：One of the mechanisms of recurrence of malignant tumors is thought to be that tumor cells resistant to anticancer drugs remain after repeated chemotherapy and proliferate to form recurrent tumors. By investigating the mechanism of drug resistance, it will be possible to develop new therapies for recurrent tumors. In addition, tumor lysing virus may be a new therapeutic option because it shows anti-tumor effects through a mechanism different from conventional chemotherapy. In this study, we generated cisplatin- and 5-FU-resistant strains and showed the mechanism and the antitumor effect of tumor lysis virus HF10.

研究分野：耳鼻咽喉・頭頸部外科

キーワード：頭頸部扁平上皮癌 薬剤耐性 腫瘍溶解ウイルス療法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

頭頸部悪性腫瘍の約 90%を占める扁平上皮癌は、手術療法、化学療法、放射線療法を組み合わせた集学的治療や、各々の治療の進歩により予後が劇的に改善してきた。しかし、5年生存率はまだ 40%程度と高くはない。その理由の一つとして、大半が進行癌で見つかり、進行癌の大半が局所再発、遠隔転移しやすいことが挙げられる。再発した腫瘍は、従来の治療に抵抗性を示すことが多く、有効な治療選択肢が限られているのが現状である。

近年のウイルスの機能解析や遺伝子工学技術の進歩により、ウイルスの正常組織に対する病原性を排除し、癌細胞で特異的に増殖し、破壊するような治療が可能になってきた。共同研究先である名古屋大学医学部ウイルス学講座では、自然発生型の弱毒型単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV-1) HF 株から HF10 をクローニングし、HF10 が多くの癌細胞株で増殖性が非常に高く、担癌モデルマウスにも優れた抗腫瘍性を示すことを報告してきた。現在では再発頭頸部癌などを対象として、米国と本邦で第 I/II 相試験が行われている。

悪性腫瘍が再発する機序の一つとして、化学療法の繰り返しにより、抗癌剤に耐性な腫瘍細胞が残存し、増殖して再発腫瘍を形成すると考えられている。シスプラチンはプラチナを架橋して DNA 損傷を誘導する薬剤だが、放射線照射も DNA 損傷を誘発するため、両者の交差耐性も指摘されている。薬剤耐性獲得の機構を検討することにより、再発腫瘍を対象とした新規治療法の開発が可能となると考えられる。また、腫瘍溶解ウイルスは従来の化学療法と異なる機序で抗腫瘍効果を示すため、新規治療薬の選択肢となる可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究では再発腫瘍が薬剤耐性を獲得する機序の解明と、再発腫瘍の新規治療薬の開発を目的とした。そのために 薬剤耐性株の作成とその機序の解明、腫瘍溶解ウイルス HF10 の薬剤耐性株への抗腫瘍効果、の 2 点につき検討した。

3. 研究の方法

(1) 薬剤耐性細胞株の作成と薬剤耐性の確認

頭頸部扁平上皮癌細胞株からシスプラチン耐性株、5-FU 耐性株を誘導する。ヒト由来頭頸部扁平上皮癌 UM-SCC-23 (以下 23 親株) を、低濃度のシスプラチン、5-FU を段階的に濃くしながら培養し、シスプラチン耐性株 (UM-SCC-23/CR、以下 23CR 株)、5-FU 耐性株 (UM-SCC-23/WR、以下 23WR 株) を得た。各細胞を 96 well プレートにまき、翌日に濃度を変化させてシスプラチン、5-FU を投与して 48 時間培養し、細胞生存率を MTS assay にて検討した。

その後各細胞を培養して経時的に細胞数を測定し、細胞増殖能を検討した。また、エタノールで固定後 PI で染色し、細胞周期を測定した。

(2) 放射線治療耐性化の機序

各細胞を 35mm dish にまいて放射線を照射し、照射後の細胞を 5000 個ずつ well にまいた。120 時間培養して、生存する細胞数を数えて比較した。

(3) 薬剤耐性細胞株の腫瘍形成能

各細胞株をマウス皮下に接種して、腫瘍形成能を確認した。細胞数を変えて、各細胞株の腫瘍型性能を比較検討した。

(4) HF10 の抗腫瘍効果 (in vitro)

in vitro での抗腫瘍効果を調べるために、各細胞を 96 well plate にまいて、翌日に HF10 を様々なウイルス力価 (MOI) で感染させて 72 時間後の生存細胞率を測定し、HF10 の抗腫瘍効果を検討した。

(5) HF10 の抗腫瘍効果 (in vivo)

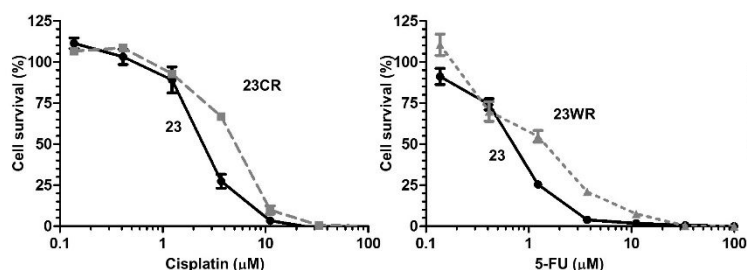
シスプラチン耐性株をマウス皮下に接種して、皮下腫瘍の形成を確認後、HF10 を 2 日おき 2 回接種した。腫瘍の大きさを経時的に観察し、体重減少、副作用がないか確認した。腫瘍径が 1.5cm を超えた時点で sacrifice し、マウスの生存期間を比較検討した。次に、5-FU 耐性株をマウス皮下に接種し、同様に HF10 の抗腫瘍効果を検討した。

最後に、HF10 による効果を病理学的に確認するため、同様のプロトコールで HF10 を 2 回接種し、最終接種の 24 時間後にマウスの皮下腫瘍を接種し、パラフィン切片をヘマトキシリンエオジン染色し、連続切片を抗 HSV 抗体で免疫組織染色を行い、HF10 接種による病理学的影響と HF10 の播種した範囲を病理学的に確認した。

4. 研究成果

(1) 薬剤耐性細胞株の作成と薬剤耐性の確認

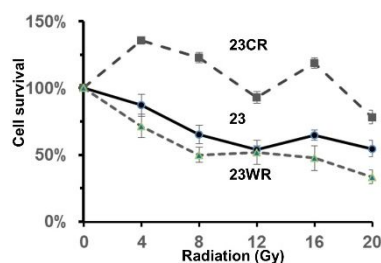
薬剤の耐性を確認するため、各薬剤耐性株を各薬剤存在下で培養した。23CR 株ではシスプラチンの耐性が、23WR 株では 5-FU への耐性が認められた。



次に細胞増殖能を検討したところ、23CR 株、23WR 株で最も良好な細胞増殖能を認めた。細胞周期を検討したところ、23CR 株、23WR 株では G2/M 期、G1 期の細胞の割合が高く、細胞増殖能が盛んであった。

(2) 放射線治療耐性化の機序

放射線照射後の細胞を培養して生存する細胞数を検討したところ、23CR 株のみ放射線治療への耐性が認められた。



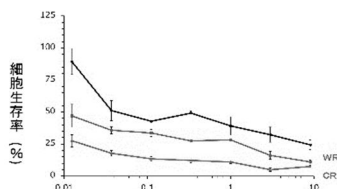
(3) 薬剤耐性細胞株の腫瘍形成能

各細胞株をマウス皮下に接種して、腫瘍形成能を確認したところ、全ての細胞株が皮下腫瘍の形成を認めた。23 株と比較して 23WR 株が、23WR 株より 23CR 株が少ない細胞数での腫瘍形成を認め、腫瘍形成能が亢進していると考えられた。



(4) HF10 の抗腫瘍効果 (in vitro)

in vitro での抗腫瘍効果を調べたところ、HF10 の殺細胞効果は CR 株で最も顕著に認められた。



(5) HF10 の抗腫瘍効果 (in vivo)

シスプラチン耐性株、5-FU 耐性株の両細胞株とも、HF10 の腫瘍内接種により腫瘍の成長が抑制され、生存の延長が認められた。

組織学的に検討を行ったところ、HF10 が感染した領域に一致して核が消失した領域が認められ、HF10 により腫瘍細胞が壊死したと考えられた。

(6) 将来展望

HF10 はシスプラチン耐性株、5-FU 耐性株の両者に抗腫瘍効果を認めた。現在、本研究で得られた所見をまとめて欧文誌に投稿中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yoshimi Hatano
2. 発表標題 Oncolytic activity of HF10 for drug-resistant head and neck squamous cell carcinoma
3. 学会等名 12th International Oncolytic Virus Conference (国際学会)
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------