

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K10084

研究課題名（和文）EphA4活性化により生じる高分化型口腔癌メトロノーム化学療法耐性機構の解明

研究課題名（英文）Investigation of the mechanism for metronomic chemotherapy resistance in well-differentiated oral cancer driven by EphA4 activation

研究代表者

喜名 振一郎 (Kina, Shinichiro)

群馬大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：40422422

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：メトロノーム化学療法は、低容量頻回投与で行われる化学療法である。高分化型扁平上皮癌の抗腫瘍効果は、有意に低くなっていた。我々は、高分化型頭頸部扁平上皮癌と低中分化型扁平上皮癌の遺伝子発現の相違を、TCGA (The Cancer Genome Atlas) を用いて解析した。その結果、高分化型において、EphA4 の活性化並びにT細胞活性化に關与する経路の不活性化が観察された。CD8 や形質細胞様樹状細胞は、低中分化型腫瘍周囲で集積していた。さらに、EphA4 ブロッキングペプチドは、抗がん剤と併用することにより、相乗的な癌細胞死を誘導した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は、bleomycin 併用S-1 による術前メトロノーム化学療法のphase I/II 試験の結果を学術誌上にて報告した (Kina S, et al. Eur J Pharmacol. 2023)。上記化学療法による重篤な副作用は観察されなかった。約半数の患者で、組織学的に腫瘍が完全に消失しており、そのような患者集団では、外科切除を最初に行った患者群と比較して生存率が有意に高くなっていた。高分化型腫瘍は、抗がん剤耐性を示した。高分化型腫瘍周囲では、免疫細胞が枯渇しており、EphA4 が活性化していた。メトロノーム化学療法は、腫瘍免疫に関して働きかけていることが強く示唆された。

研究成果の概要（英文）：Metronomic chemotherapy is defined as a high-frequency low-dose schedule of chemotherapy drug administration. The response rate of well-differentiated OSCC to metronomic chemotherapy was significantly lower. We investigated differences in molecular profiles between poorly or moderately differentiated head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) and well-differentiated HNSCC from patients with HNSCC TCGA data. An upstream regulator analysis correlated with EphA4 expression identified pathways associated with decreased mTORC1 signaling and T cell activation, including TCR, CD3, CD28, and CD40LG. Plasmacytoid dendritic cell and CD8+ T cell numbers were higher in the microenvironment of poorly or moderately differentiated HNSCC than in that of well-differentiated HNSCC. Moreover, KYL used with chemotherapeutic drugs synergistically increased cancer cell death.

研究分野：腫瘍薬理学

キーワード：口腔癌 術前化学療法 メトロノーム化学療法

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

メトロノーム化学療法は、低容量頻回投与で行われる化学療法である。臨床現場で幅広く使用されている化学療法であるが、その耐性機構に関しては不明のままである。

2. 研究の目的

申請者は、これまでに口腔扁平上皮癌患者に対して、bleomycin と S-1 による術前メトロノーム化学療法を行うと、外科切除と最初に行った場合と比較して、後発転移を抑制し、生存率が有意に改善することを報告していた。本研究では、bleomycin と S-1 による術前化学療法耐性な患者集団を特定し、その耐性機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

1) 対象患者

2008 年から 2013 年にかけて琉球大学口腔外科を受診した口腔扁平上皮癌患者を対象とした。妊娠中の女性は除外した。本研究は、琉球大学倫理審査委員会で承認を得ている。

2) 術前化学療法

術前化学療法では、S-1(100mg)を毎日、計3週間内服した。Bleomycin は 15mg/body を1週間に2回、計3週間投与した。外科切除後の切片に対して、生存癌細胞が無い場合を、pathological complete response (pCR) と判断した。

3) 細胞培養

癌細胞は、JCRB から購入した。

4) in vitro による細胞傷害アッセイ

癌細胞は、96 ウェルプレートで培養した。37 度 5%CO₂ 条件下で、抗がん剤および EphA4 ブロッキングペプチド暴露後 72 時間後に MTT assay を行った。抗がん剤は、methotrexate を用いた。

5) ウェスタンブロット

細胞は、PBS で wash した後、Laemmli buffer にて溶解し、98 度で 5 分間ボイルをした。SDS-PAGE で電気泳動後 PVDF メンブレンにトランスファーし、5%スキムミルクでブロッキングを行い、一次抗体で一晩浸した。一次抗体は、EphA4 (1:300 dilution, Invitrogen, 37-1600), cleaved caspase 3 (1:1000 dilution, Cell Signaling, 9661), p-MAPK (1:1000 dilution, Sigma-Aldrich, M8159), MAPK (1:1000 dilution, Sigma-Aldrich, M5670), p-p70S6K (1:1000 dilution, Cell Signaling, #9205S), and β -actin (1:5000 dilution, Sigma-Aldrich, A5441) の条件で使用した。

6) 口腔扁平上皮癌組織に対する免疫染色

生検で採取した組織を、10%ホルマリン溶液で固定し、ブロックを作成した。その後、EphA4 抗体を用いて、免疫染色を行った。

7) RNA シークエンス解析

RNA シークエンスのデータは、cBioPortal から入手した。P<0.0001 である場合を相関ありと判定した。

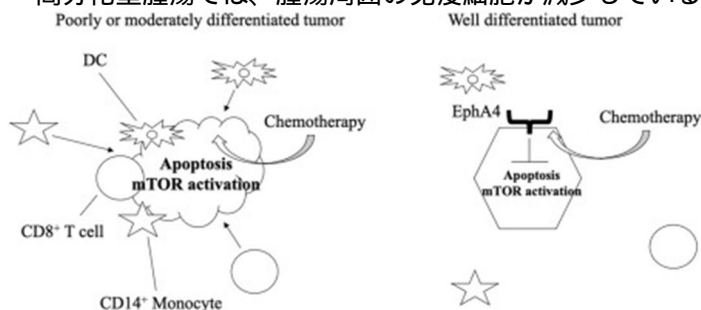
8) 統計解析

生存率等の比較では、ログランク検定を用いた。解析は、EZR で行った。P 値の算出は、全て両側検定で行った。

4. 研究成果

本研究において、以下のことが明らかになった

- ・ 高分化型腫瘍は、メトロノーム化学療法耐性である。
- ・ 高分化型頭頸部扁平上皮癌では、受容体チロシンキナーゼ EphA4 が高発現している。
- ・ EphA4 は、口腔扁平上皮癌細胞株において mTOR を不活化している。
- ・ EphA4 高発現腫瘍では、腫瘍周囲の免疫細胞が減少している。
- ・ 高分化型腫瘍では、腫瘍周囲の免疫細胞が減少している。



1) 患者背景

解析した患者の年齢の中央値は 66 歳であり、患者数は 40 人であった。術前メトロノーム化学療法

法による、グレード3以上の有害事象は観察されなかった。

2) 抗がん剤感受性および、術前メトロノーム化学療法が生存率に与える影響

40名の患者のうち、19名がbleomycin併用S-1による術前化学療法後、腫瘍が組織学的に消失していた。低分化型の方が、高分化型と比較して腫瘍が有意に消失していた。一方GDSCのデータベースを用いた解析では、腫瘍の分化度と5-FUの抗がん剤感受性との間に相関関係は観察されなかった。このことより腫瘍の分化度依存的な抗癌剤感受性の違いは、腫瘍そのものの抗癌剤感受性のみならず、腫瘍周囲の微小環境が大きく影響していることが判明した。術前メトロノーム化学療法群では、外科切除先行群と比較して遠隔転移を有意に抑制し、生存率が改善していた。

3) 腫瘍の組織学的分化度の違いに基づく受容体型チロシンキナーゼ発現量の相違

メトロノーム化学療法耐性に関与する分子の候補として、受容体型チロシンキナーゼに着目し、その発現を分化度依存的に検討した。EphA4, A1, B3は高分化型において有意に発現が高くなっていった。EphA4に関して、口腔癌細胞株においても同様な傾向が観察されるかウェスタンブロットを用いて検討した。その結果、細胞株においてもEphA4は高分化型において高発現していることが判明した。免疫組織染色を用いた実験においても、EphA4は高分化型において、発現が高くなっていった。

4) 高分化型腫瘍周囲では、免疫細胞の浸潤が抑制されている

EphA4の発現と相関する遺伝子を、IPAにより解析した。その結果、T細胞の活性化に関与する因子が減弱していることが判明した。EphA4ブロックペプチドKYLを用いて口腔癌細胞株を処理したところ、mTORC1のターゲットであるp70S6Kの活性化が観察された。EphA4の発現と腫瘍周囲の免疫環境にどのような相関があるか線形回帰分析を行うことで検討した。CD8やCD123(形質細胞様樹状細胞マーカー)の発現は、EphA4の発現が低下するほど増大し、かつこれらのマーカーは低分化型腫瘍周囲において発現が高くなっていった。

5) EphA4の発現は、IL-6の発現と負の相関を示している

高分化型腫瘍周囲では、免疫細胞の浸潤が抑制されていることをふまえて、その原因となる因子に関して検討を行なった。IL-6は唾液を用いた研究から腫瘍の組織学的分化度と相関があることが報告されている。TCGAを用いた解析からIL-6は腫瘍組織中においても、低分化型腫瘍において高発現していることが判明した。このことが、単球や形質細胞様樹状細胞が低分化型腫瘍に集積していることの一因として考えられた。

6) EphA4は抗癌剤暴露後、プロテアソームによる分解される

我々はこれまでに、子宮頸がん細胞株において、抗がん剤暴露後EphA4が分解されることを報告している。メトトレキサートは、口腔癌細胞株に対して暴露後EphA4の発現を低下させた。プロテアソーム阻害剤を加えると、EphA4の発現上昇が観察された。

7) 高分化型腫瘍の抗癌剤耐性は、EphA4により制御されている

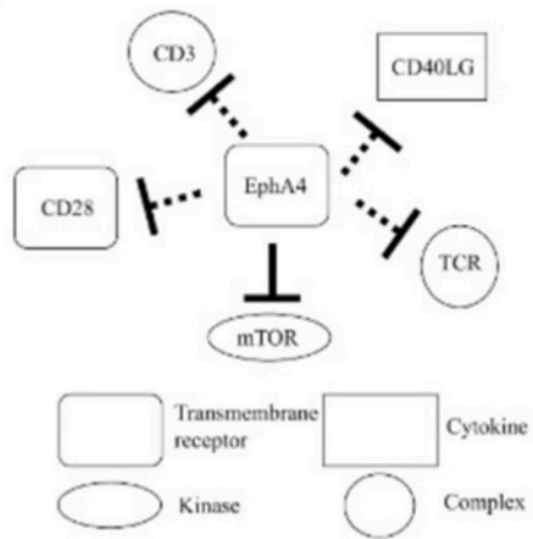
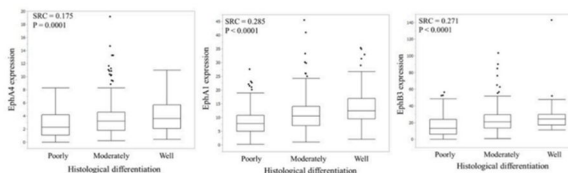
高分化型腫瘍が有する抗がん剤耐性に関して、EphA4が関与しているか検討するために、EphA4

High frequency of pathological complete response (pCR) of poorly or moderately differentiated OSCCs as compared with well-differentiated OSCCs.

Variable	Patients with pCR (N = 19)	P-value
Study group - no./total no. (%)		
Age - no./total no. (%)		0.52
≥60	8/20 (40)	
<60	11/20 (55)	
Sex - no./total no. (%)		0.74
Male	10/23 (43)	
Female	9/17 (53)	
Pathological differentiation - no./total no. (%)		0.03
Well	10/28 (36)	
Poorly or moderately	9/12 (75)	
T-stage - no./total no. (%)		0.74
T1	11/25 (44)	
T2	8/15 (53)	

IC50 values for 5-FU on the HNSCC cell lines as reported in the GDSC database.

HNSCC Cell line	IC50 (μM)	histological differentiation
PCI-15A	335	poorly
HSC-2	289	well
KOSC-2	167	moderately
OSC-19	158	well
HSC-3	131	poorly
OSC-20	42	well
BHY	33	well
HO-1-tt-1	29	poorly
CA9-22	24	well
SAS	20	poorly
CAL-33	7	moderately
CAL-27	1	poorly

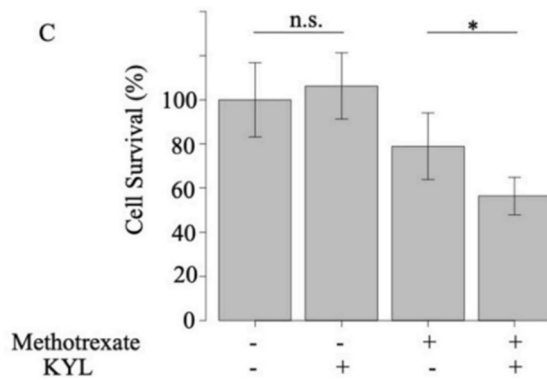


ブロッキングペプチドを用いて、高分化型口腔癌細胞株 HSC2 を用いて MTT アッセイを行った。メトトレキサートと KYL を共に口腔癌細胞株に対して加えた際に、相乗的に癌細胞死が誘導されることを観察した。このような相乗効果が低分化型口腔扁平上皮癌細胞株では観察されなかった。

8) リボソーム mRNA は高分化型腫瘍において抑制されている

IPA を用いた解析から、EphA4 が関与しているシグナル経路を検討した。EphA4 の発現が低下すると、蛋白合成に關与する EIF2 シグナルおよび酸化リン酸化のシグナル経路が増大していた。

EphA4 ブロッキングペプチドを高分化型口腔扁平上皮癌細胞株に加えると、mTOR および Erk の経路が活性化された。リボソーム mRNA の発現が高分化型で有意に低くなっていた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kina Shinichiro, Kawabata-Iwakawa Reika, Miyamoto Sho, Kato Tomoki, Kina-Tanada Mika, Arasaki Akira	4. 巻 945
2. 論文標題 EphA4 signaling is involved in the phenotype of well-differentiated oral squamous cell carcinoma with decreased tumor immunity	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 European Journal of Pharmacology	6. 最初と最後の頁 175611 ~ 175611
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejphar.2023.175611	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 Sugisawa Akiyuki, Toyoda Zensei, Tanabe Yasuka, Uehara Karina, Oshiro Aya, Yamazato Reo, Sakamoto Chiharu, Yogi Shohei, Kurima Kiyoto, Kina Shinichiro, Sakiyama Michiyo, Kinjo Takao	4. 巻 30
2. 論文標題 Cytological characteristics of premalignant cervical epithelial lesions in postmenopausal women based on endocrine indices and parakeratosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Menopause	6. 最初と最後の頁 193 ~ 200
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/GME.0000000000002125	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 Uehara K, Tanabe Y, Hirota S, Higa S, Toyoda Z, Kurima K, Kina S, Nakasone T, Arasaki A, Kinjo T.	4. 巻 21
2. 論文標題 Co-expression of low-risk HPV E6/E7 and EBV LMP-1 leads to precancerous lesions by DNA damage	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12885-021-08397-0.	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 Kina S, Kawabata-Iwakawa R, Miyamoto S, Arasaki A, Sunakawa H, Kinjo T.	4. 巻 29
2. 論文標題 A molecular signature of well-differentiated oral squamous cell carcinoma reveals a resistance mechanism to metronomic chemotherapy and novel therapeutic candidates	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Drug Target .	6. 最初と最後の頁 1118-1127
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/1061186X.2021.1929256.	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 Shinichiro Kina, Sho Miyamoto, Reika Kawabata-Iwakawa, Mika Kina-Tanada, Masaru Ogawa, Satoshi Yokoo	4. 巻 14
2. 論文標題 Higher overall survival rates of oral squamous cell carcinoma treated with metronomic neoadjuvant chemotherapy	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 American Journal of Cancer Research	6. 最初と最後の頁 1033 ~ 1051
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.62347/EYNT8387	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1件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 喜名振一郎、宮本昇、加藤大貴
2. 発表標題 高分化型口腔扁平上皮癌が有するメトロノーム化学療法耐性機構の解明
3. 学会等名 第40回口腔腫瘍学会
4. 発表年 2022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	金城 貴夫 (Kinjo Takao) (30284962)	琉球大学・医学部・教授 (18001)	
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)	
研究分担者	宮本 昇 (Miyamoto Sho) (80749565)	札幌医科大学・医学部・助教 (20101)	

6. 研究組織（つづき）

	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	川端 麗香 (Kawabata Reika) (90721928)	群馬大学・未来先端研究機構・講師 (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