

令和 6 年 4 月 6 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K17145

研究課題名（和文）がん糖代謝が制御する口腔扁平上皮癌のNrf2抗酸化経路を介した放射線耐性機序解明

研究課題名（英文）Elucidation of the radioresistance mechanism via Nrf2 antioxidant pathway in oral squamous cell carcinoma controlled by cancer metabolism

研究代表者

松岡 祐一郎（Matsuoka, Yuichiro）

熊本大学・大学院生命科学研究部（医）・特定研究員

研究者番号：10802100

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）：口腔扁平上皮癌（OSCC）におけるNrf2抗酸化経路が放射線抵抗性に与える生物学的影響、および、がん糖代謝においてNrf2依存的な放射線耐性機序を解明することを目的とし研究を推進した。Nrf2は、*in vitro*および*in vivo*において臨床的放射線耐性細胞で発現上昇し、Nrf2発現上昇は放射線抵抗性と関連した。Nrf2依存的な解糖亢進が放射線抵抗性の発現に参与した。また、リン酸化Nrf2発現は化学放射線療法に対する組織学的治療効果と関連し、その発現は進行OSCC患者の不良な予後と相関した。この結果は、Nrf2が代謝調節を伴うOSCCの放射線抵抗性に重要な役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

継続的放射線照射によって耐性を獲得した臨床的放射線耐性細胞（CRR細胞）は、標準的な放射線治療線量である2GyのX線を毎日照射しても安定して生存し続けることから、放射線耐性機序を解析するための臨床的なモデルがん細胞として非常に有用な資材であり、学術的独自性が高いと考えられる。そのため、CRR細胞を用いて放射線耐性におけるNrf2依存的な代謝経路を解析し、Nrf2の代謝調節を標的とした放射線抵抗性口腔扁平上皮癌に対する治療戦略は新規治療の開発の観点で意義が深い。

研究成果の概要（英文）：Our research aimed to elucidate the biological effects of tNrf2 anti-oxidant pathway on radioresistance in oral squamous cell carcinoma (OSCC) and Nrf2-dependent radioresistance mechanism in cancer glucose metabolism. Nrf2 was upregulated in clinical radioresistant cells in *in vitro* and *in vivo* experiments, and increased Nrf2 expression was associated with radioresistance. In addition, Nrf2-dependent glycolysis was involved in the development of radioresistance. Furthermore, phosphorylated Nrf2 expression was associated with histopathological response to chemoradiotherapy, and its expression correlated with poor prognosis in patients with advanced OSCC. These results suggested that Nrf2 plays an important role in OSCC radioresistance accompanied with metabolic modulation.

研究分野：口腔がん

キーワード：口腔癌 放射線耐性 Nrf2 がん糖代謝

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

O SCCを含む頭頸部癌において、放射線治療は重要な治療戦略の一つであるため、治療法として選択される場面が多く、頭頸部癌患者のうち、放射線治療を受ける患者の割合は約78%と高い(Cancer. 103:2216-27, 2005)。一般的に、放射線治療は、放射線と水が反応して生じる活性酸素(Reactive oxygen species: ROS)の発生を通してDNA損傷を引き起こすことによって癌細胞を効果的に死滅させる(Crit. Rev. Oncol. Hematol. 88:706-15, 2013)。しかし、抗酸化能力の高い癌細胞はROSスカベンジャーにより放射線障害から逃避することで抵抗性を獲得している(Nature 458:780-3, 2009)。従って、放射線抵抗性を解明することがOSCC患者の予後の改善に大きく貢献すると考えられるが、未だ詳細なメカニズムは不明な点が多い。

Keap1-Nrf2システムは酸化ストレスや様々な毒物に対する生体内の防御反応として重要な役割を果たしている(Genes. Cells. 16:123-40, 2011)。活性化したNrf2は、Nrf2抗酸化経路を介してがん細胞のROSレベルを低くすることでROSの解毒の調節に関与しており、放射線に対する抵抗性を増加させる(Nature 475:106-9, 2011)。また、Nrf2を制御することで放射線感受性が向上、促進するという基礎的研究が報告されている(Free Radic Res. 46(12):1446-57, 2012)。申請者らはこれまでに、がん微小環境においてIL-6がNrf2抗酸化経路を介して酸化ストレスを調節することでOSCCの放射線抵抗性に影響を与えることを明らかにした(Br. J. Cancer. 8;115(10):1234-1244, 2016)。

がん細胞における特徴的な代謝様式一つとして、好気的な条件下でも解糖系が活性化しているワールブルグ効果がある。近年、がん細胞では特異的な代謝経路の存在が次々と明らかにされており(Nat. Genet. 43, 869-874, 2011)、細胞内の代謝が改変され(代謝リプログラミング)細胞の増殖、治療抵抗性に有利な代謝様式が実現している(Cell Metab. 7, 11-20, 2008)。また、多くのがん細胞においてNrf2が恒常的に安定化していることが見出され(Genes Cells 16, 123-140, 2011)、Nrf2陽性の症例では予後不良であることが報告されている(Genes Cells 16, 123-140, 2011)。こうしたNrf2の安定化はグルコースやグルタミンの代謝を変化させ同化反応を促進させることが報告され(Cancer Cell 22, 66-79, 2012)、さらに、Nrf2とPI3K-Aktシグナル伝達経路とが相互の活性を増強しあい(Cancer Cell 22, 66-79, 2012)、がん細胞においてNrf2は、ストレス応答能の増強に加え、代謝リプログラミングにより同化反応を促進し、増殖シグナルの増強をもたらすことでがんの悪性化の駆動力となっているものと考えられる。

これまでの申請者らが明らかにしてきたIL-6とNrf2抗酸化経路との間の相互作用の知見を利用し、Nrf2の代謝リプログラミングを標的とした放射線抵抗性口腔扁平上皮癌に対する治療戦略は新規治療の開発の観点で意義が深いと考え、研究へ着手した。

2. 研究の目的

本研究では、臨床的放射線耐性(clinically relevant radioresistant, CRR)細胞を用いてNrf2抗酸化経路がOSCCの放射線抵抗性に与える生物学的影響を解明すること、および、代謝リプログラミングに着目し、がん糖代謝においてNrf2依存的な放射線耐性機序を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

*in vitro*にてOSCC細胞とそのCRR細胞におけるNrf2およびリン酸化(活性化した)Nrf2の発現解析をリアルタイムPCR、ウエスタンブロット法を用いて行った。

次に、OSCCの放射線感受性におけるNrf2の機能解析を行った。まず、siRNAを用いてNrf2ノックダウンを行いNrf2の放射線感受性への影響を検討した。

続いて、複数のOSCC細胞とそのCRR細胞株を用いて、細胞の主要なエネルギー代謝経路である解糖、ミトコンドリアによる好気呼吸の状態を経時的に測定した。具体的には解糖系で産生される乳酸をターゲットとし、代謝経路の解糖系への依存を代謝アナライザーを用いることで検討した。また、CRR細胞においてNrf2依存的な代謝経路に注目し、ペントースリン酸経路の酸化的経路と非酸化的経路やグルタミンの代謝を触媒する酵素群の発現を検討した。さらに、グルタミン代謝の産物で抗酸化物質であるグルタチオンや抗酸化能を評価するため活性酸素種を測定した。

最後に、OSCC患者110症例の生検標本を用いたリン酸化Nrf2の免疫組織化学的染色で発現解析を行った。そして、各種臨床病理学的項目との関連性を統計学的に解析した。

4. 研究成果

放射線耐性であるSAS-R細胞では、細胞質および核内にNrf2およびリン酸化Nrf2(p-Nrf2)タンパク質のレベルが有意に高かったが、SAS-R細胞のNrf2のmRNAレベルは親細胞よりも低かった。対照的に、HSC2-R細胞では、HSC2細胞と比較して、mRNAレベルとタンパク質レベルの両方でNrf2およびp-Nrf2の過剰発現が観察された(図1)。

まず、OSCC細胞およびCRR細胞におけるNrf2発現に対するsiRNAの抑制効果を確認し

た(図 2A, B)。そして、modified-HDS アッセイを行うことで、Nrf2 の下方制御が放射線照射を受けた OSCC 細胞および CRR 細胞の生存を大幅に減少させ、放射線感受性を高めることが明らかとなった(図 2C)。

非機能的 TP53 変異を有する HSC2 細胞とその CRR 細胞株 HSC2-R では、HSC2 細胞よりも HSC2-R 細胞の方が解糖活性が高かった。そして、siRNA による Nrf2 抑制によりいずれの細胞も解糖が減少した(図 3A)。機能的 TP53 変異を持つ SAS 細胞とその CRR 細胞株 SAS-R では、HSC2 細胞とは異なり SAS-R 細胞の解糖活性が低かった。Nrf2 抑制条件下では、SAS 細胞および SAS-R 細胞の解糖活性の変化は HSC2 細胞と比較して小さかった(図 3B)。SAS 細胞と HSC2 細胞の間で、TP53 変異の状態に応じて Nrf2 依存性の代謝変化に違いがあることが示唆された。

OSCC 臨床検体および情報を利用して、術前化学放射線療法施行後の OSCC 患者術後検体においてリン酸化 Nrf2 の発現と組織学的治療効果との間に関連性があること、および、全生存期間と無病生存期間における不良な患者予後に相関する結果を得た(図 4、表 1)。また、Cox 比例ハザードモデルを用いた多変量解析により、本検討の患者群において化学放射線療法に対する治療効果とともに、p-Nrf2 の発現が OSCC 患者の予後予測因子であることが明らかとなった(表 2)。

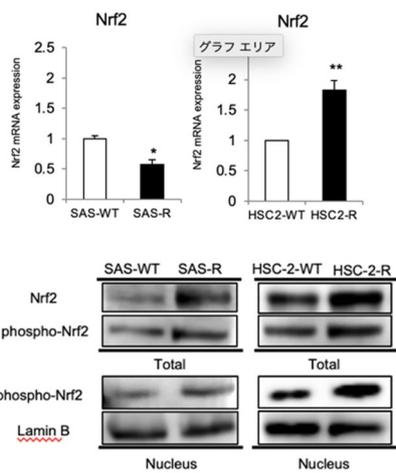


図 1. OSCC 細胞および臨床的放射線耐性細胞における p-Nrf2 の発現

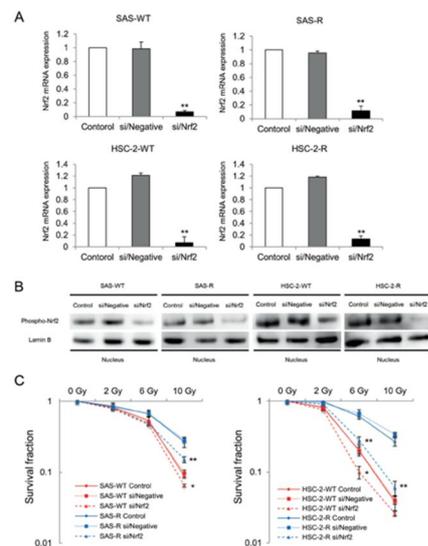


図 2. Nrf2 の抑制は OSCC 細胞と臨床的放射線耐性細胞の放射線感受性を高めた

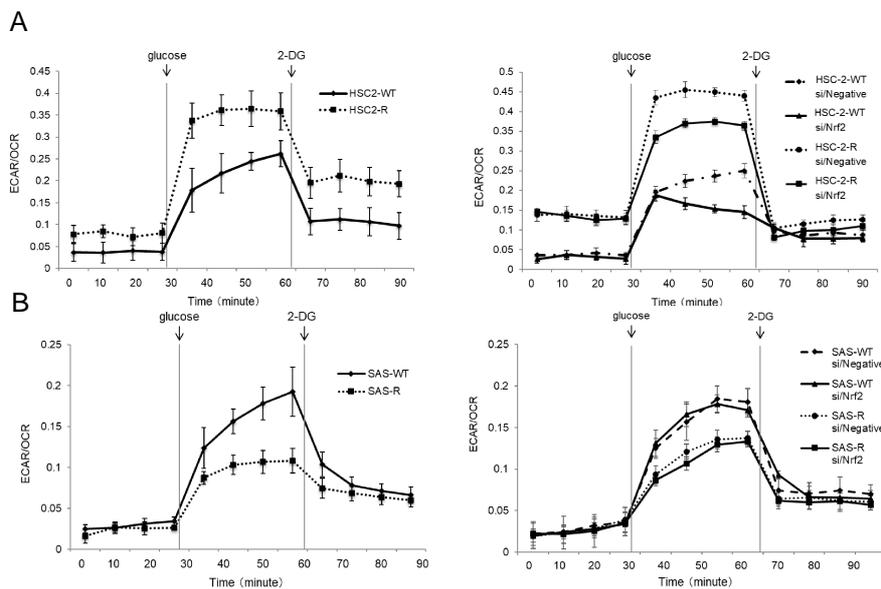


図 3. Nrf2 は放射線耐性口腔扁平上皮癌細胞の解糖代謝に関与した

Table 1. Clinical characteristics of patients (n = 110) categorized according to the p-Nrf2 expression level

Characteristics	Total	p-Nrf2 status		p - value
		Low n (%)	High n (%)	
	110	64 (58.2)	46 (41.8)	
Age, years				
Median	67.0	67.4	66.5	
Range	30-87	30-85	33-87	
≤ 65	45	25 (55.6)	20 (44.4)	0.642
> 65	65	39 (60.0)	26 (40.0)	
Sex				0.528
Male	66	40 (60.6)	26 (39.4)	
Female	44	24 (54.5)	20 (45.5)	
Primary site				0.742
Tongue	34	17 (50.0)	17 (50.0)	
Mandible	25	16 (64.0)	9 (36.0)	
Maxilla	22	13 (59.1)	9 (40.9)	
Oral floor	13	9 (69.2)	4 (30.8)	
Buccal mucosa	16	9 (56.3)	7 (43.7)	
pT-stage				0.951
T1, T2	42	24 (57.1)	18 (42.9)	
T3	28	17 (60.7)	11 (39.3)	
T4	40	23 (57.5)	17 (42.5)	
pN-stage				0.977
N = 0	62	36 (58.1)	26 (41.9)	
N ≥ 1	48	28 (58.3)	20 (41.7)	
Clinical stage				0.541
II	13	7 (53.8)	6 (46.2)	
III	30	20 (66.7)	10 (33.3)	
IV	67	37 (55.2)	30 (44.8)	
Differentiation				0.549
Well	89	53 (59.6)	36 (40.4)	
Moderate	21	11 (52.4)	10 (47.6)	
Mode of invasion				0.967
Grade I	2	2 (100.0)	0 (0.0)	
Grade II	18	10 (55.6)	8 (44.4)	
Grade III	62	35 (56.5)	27 (43.5)	
Grade IVc, N/d	28	17 (60.7)	11 (39.3)	
Pathological response				0.010*
Grade = 0, I, IIa	21	7 (33.3)	14 (66.7)	
Grade ≥ IIb	89	57 (64.0)	32 (36.0)	

The chi-square test was used to examine the relationship between the p-Nrf2 expression and the clinicopathological factors. *, p < 0.05

Table 2. Multivariate Cox proportional hazards regression analysis of overall and disease-free survival in patients with oral squamous cell carcinoma (n = 110)

Variables	Assigned score	OS		DFS	
		Hazard ratio (95% CI)	p - value	Hazard ratio (95% CI)	p - value
Age, years					
≤ 65	0	0.852 (0.354-2.024)	0.716	1.200 (0.556-2.614)	0.642
> 65	1				
Sex					
Male	0	0.792 (0.352-1.747)	0.564	0.873 (0.419-1.791)	0.712
Female	1				
Primary site					
Tongue	1	0.922 (0.710-1.181)	0.527	1.065 (0.421-2.614)	0.892
Mandible	2				
Maxilla	3				
Oral floor	4				
Buccal mucosa	5				
pT-stage					
T1, T2	1	1.098 (0.716-1.700)	0.668	2.263 (0.710-7.492)	0.168
T3	2				
T4	3				
pN-stage					
N = 0	0	3.526 (1.643-8.030)	0.001**	2.822 (1.421-5.781)	0.003**
N ≥ 1	1				
Differentiation					
Well	0	1.015 (0.424-2.250)	0.923	1.035 (0.445-2.194)	0.933
Moderate	1				
Pathological response					
Grade = 0, I, IIa	0	0.284 (0.123-0.659)	0.004**	0.331 (0.158-0.711)	0.005**
Grade ≥ IIb	1				
p-Nrf2 status					
Low	0	2.224 (1.070-4.747)	0.032*	2.039 (1.041-4.041)	0.038*
High	1				

CI, confidence interval; OS, overall survival; DFS, disease-free survival; *, p < 0.05, **, p < 0.01

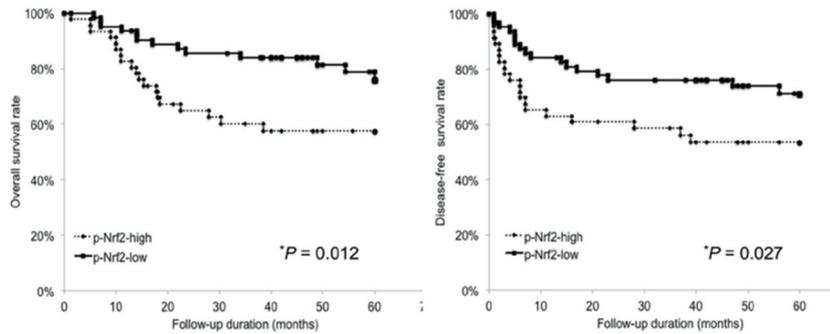


図4. リン酸化 Nrf2 の高発現は、OSCC 患者の全生存期間と無病生存期間に関連した

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Yuichiro Matsuoka, Ryoji Yoshida, Kenta Kawahara, Junki Sakata, Hidetaka Arita, Hikaru Nkashima, Nozomu Takahashi, Masatoshi Hirayama, Masashi Nagata, Akiyuki Hirotsue, Yoshikazu Kuwahara, Manabu Fukumoto, Ryo Toya, Ryuji Murakami, and Hideki Nakayama	4. 巻 8
2. 論文標題 The antioxidative stress regulator Nrf2 potentiates radioresistance of oral squamous cell carcinoma accompanied with metabolic modulation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Laboratory Investigation	6. 最初と最後の頁 896-907
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41374-022-00776-w	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 Gohara S, Shinohara K, Yoshida R, Kariya R, Tazawa H, Hashimoto M, Inoue J, Kubo R, Nakashima H, Arita H, Kawaguchi S, Yamana K, Nagao Y, Iwamoto A, Sakata J, Matsuoka Y, Takeshita H, Hirayama M, Kawahara K, Nagata M, Hirotsue A, Kuwahara Y, Fukumoto M, Okada S, Urata Y, Fujiwara T, Nakayama H.	4. 巻 27
2. 論文標題 An oncolytic virus as a promising candidate for the treatment of radioresistant oral squamous cell carcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Therapy Oncolytics	6. 最初と最後の頁 141-156
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.omto.2022.10.001.	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 Takeshita H, Yoshida R, Inoue J, Ishikawa K, Shinohara K, Hirayama M, Oyama T, Kubo R, Yamana Y, Nagao Y, Gohara S, Sakata J, Nakashima H, Matsuoka Y, Nakamoto M, Hirayama M, Kawahara K, Takahashi N, Hirotsue A, Kuwahara Y, Fukumoto M, Toya R, Murakami R, Nakayama H	4. 巻 5
2. 論文標題 FOXO1-Mediated Regulation of Reactive Oxygen Species and Radioresistance in Oral Squamous Cell Carcinoma Cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Laboratory Investigation	6. 最初と最後の頁 10060
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.labinv.2022.100060.	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 Nozomu Takahashi, Akimitsu Hiraki, Kenta Kawahara, Masashi Nagata, Ryoji Yoshida, Yuichiro Matsuoka, Takuya Tanaka, Yuko Obayashi, Junki Sakata, Hikaru Nakashima, Hidetaka Arita, Masanori Shinohara, Hideki Nakayama	4. 巻 14
2. 論文標題 Postoperative delirium in patients undergoing tumor resection with reconstructive surgery for oral cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular and Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 60
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/mco.2021.2222	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 Kenta Kawahara, Akimitsu Hiraki, Hidetaka Arita, Hisashi Takeshita, Akiyuki Hirose, Yuichiro Matsuoka, Junki Sakata, Yuko Obayashi, Hikaru Nakashima, Mayumi Hirayama, Masashi Nagata, Ryoji Yoshida, Masanori Shinohara, Hideki Nakayama	4. 巻 27
2. 論文標題 Role of serum amylase and salivary cytokines in oral complications during chemoradiotherapy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oral Diseases	6. 最初と最後の頁 1564-1571
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/odi.13686	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 Keisuke Yamana, Junki Inoue, Ryoji Yoshida, Junki Sakata, Hikaru Nakashima, Hidetaka Arita, Sho Kawaguchi, Shunsuke Gohara, Yuka Nagao, Hisashi Takeshita, Manabu Maeshiro, Rin Liu, Yuichiro Matsuoka, Masatoshi Hirayama, Kenta Kawahara, Masashi Nagata, Akiyuki Hirose, Ryo Toya, Ryuji Murakami, Yoshikazu Kuwahara, Manabu Fukumoto	4. 巻 10
2. 論文標題 Extracellular vesicles derived from radioresistant oral squamous cell carcinoma cells contribute to the acquisition of radioresistance via the miR-503-3p-BAK axis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Extracellular Vesicles	6. 最初と最後の頁 e12169
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jev2.12169	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 Kenta Kawahara, Masashi Nagata, Ryoji Yoshida, Akiyuki Hirose, Takuya Tanaka, Yuichiro Matsuoka, Hidetaka Arita, Hikaru Nakashima, Junki Sakata, Keisuke Yamana, Sho Kawaguchi, Shunsuke Gohara, Yuka Nagao, Masatoshi Hirayama, Nozomu Takahashi, Mayumi Hirayama, Hideki Nakayama	4. 巻 21
2. 論文標題 miR-30a attenuates drug sensitivity to 5-FU by modulating cell proliferation possibly by downregulating cyclin E2 in oral squamous cell carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 101114
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2021.101114	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
--	---------------------------	-----------------------	----

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