

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 4 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861579

研究課題名(和文) セツキシマブ耐性口腔扁平上皮癌幹細胞を標的とした治療法の開発

研究課題名(英文) Development of the therapy for cetuximab-resistant oral squamous cell carcinoma cells

研究代表者

吉川 桃子 (Yoshikawa, Momoko)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・共同研究員

研究者番号：50570967

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：癌幹細胞マーカーであるCD44v陽性口腔扁平上皮癌細胞を用いて、EGFR 標的治療薬セツキシマブに耐性を有する細胞を作製し、耐性化に伴う癌幹細胞の性質の変化を解析した。セツキシマブ耐性細胞では親株に比べてCD44v 陽性の未分化な腫瘍を形成する細胞と遺伝子発現が類似しており、実際にセツキシマブ耐性細胞からできた腫瘍組織はCD44v 陽性の未分化な腫瘍となることから、より癌幹細胞としての性質が強いことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Using cancer stem cell marker of CD44v positive oral squamous cell carcinoma cells, we prepared cetuximab-resistant oral squamous cell carcinoma cells. We analyzed changes in the characteristics of cancer stem cells associated with cetuximab resistance. In cetuximab-resistant cells, gene expression was similar to cells forming undifferentiated tumors with CD44v positivity as compared with the parent cells. Tumor tissues formed from cetuximab-resistant cells were undifferentiated tumors and were mostly CD44v positive cells. Consequently, it can be concluded that cetuximab-resistant cells display stronger characteristics of cancer stem cells than parent cells.

研究分野：口腔癌

キーワード：CD44v 口腔扁平上皮癌 セツキシマブ

### 1. 研究開始当初の背景

口腔扁平上皮癌の腫瘍組織は、階層性を有する不均一な細胞集団より構成されることが分かっており、癌幹細胞マーカーである CD44v 陽性の癌幹細胞が存在することが知られている。実際に抗癌剤の治療前後の臨床検体を用いて CD44v の発現量を比較すると、抗癌剤治療後に CD44v 陽性領域が著明に増加することが分かった。このことから CD44v 陽性の癌幹細胞は、陰性細胞と比較して従来の抗癌剤に対する抵抗性を有していることが示唆された。よって、効果的な癌治療を行うためには、CD44v 陽性癌幹細胞を選択的に死滅させる治療法の開発が求められる。

これまでに我々の研究グループは、癌細胞表面の CD44v が xCT シスチントランスポーターを安定化し、抗酸化物質である還元型グルタチオンの産生を高めることで、酸化ストレス抵抗性を促進し、腫瘍の増大や治療抵抗性に寄与することを明らかにしてきた。さらに、xCT シスチントランスポーターの特異的阻害剤であるスルファサラジンを用いた治療実験では、CD44v 陽性の未分化な癌細胞において選択的に細胞死を誘導することを見出した。これらの研究結果は、癌幹細胞を特異的にターゲットとする新しい治療法開発の可能性を示唆している (Yoshikawa et al. Cancer Research 2013)。

一方、口腔扁平上皮癌では EGFR の遺伝子増幅が頻繁に認められることから、抗 EGFR 抗体薬であるセツキシマブの臨床応用が開始されている。我々が、口腔扁平上皮癌におけるスルファサラジンとセツキシマブに対する感受性を調べたところ、同じ CD44v 陽性癌細胞であっても、セツキシマブ感受性の低いものの方が、セツキシマブ感受性の高いものよりスルファサラジンに対する感受性が高いことが明らかとなった。つまり、スルファサラジンは、CD44v 陰性癌細胞より CD44v 陽性癌細胞に対して高い増殖阻害効果を有するが、CD44v 陽性癌細胞のなかでも EGFR に対する依存性によって効果が異なることを見出した。そこで、EGFR 高発現でセツキシマブ感受性を有する CD44v 陽性口腔扁平上皮癌細胞を用いて、セツキシマブ耐性細胞を樹立し、解析を行うこととした。セツキシマブ感受性の異なる CD44v 陽性癌細胞における細胞内代謝やシグナルの違いを明らかにすることによって、口腔扁平上皮癌におけるセツキシマブ治療に対して、非常に有用な情報をもたらすと考えられる。

### 2. 研究の目的

癌治療における治療抵抗性には、様々なストレスに対して高い抵抗性を有する癌幹細胞と呼ばれる少数の癌細胞が重要な役割を担っていることが分かってきた。また、治療抵抗性に関わる喫緊の課題として、分子標的治療薬に対する耐性化が挙げられるが、これまで耐性化に伴い癌幹細胞の性質がどのよ

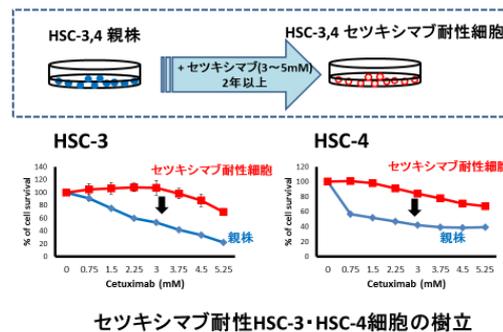
うに変化するのかは明らかにされていない。そこで本研究では、癌幹細胞マーカーである CD44v 陽性癌細胞を用いて、EGFR 標的治療薬セツキシマブに耐性を有する細胞を作製し、各細胞の代謝やシグナルの違いを明らかにすることにより、セツキシマブ耐性に関わる癌幹細胞特異的なマーカーを見出す。さらに、EGFR 依存性の異なる癌幹細胞を標的とした薬剤による新規治療法を開発することを目的とする。

### 3. 研究の方法

- (1) CD44v 陽性口腔扁平上皮癌細胞を用いてセツキシマブ耐性細胞の樹立。
- (2) セツキシマブ耐性細胞・親株細胞を用いて遺伝子発現解析を行い、癌幹細胞特異的なマーカーの探索。また、セツキシマブ耐性細胞の癌幹細胞特性についての解析。
- (3) セツキシマブ耐性細胞・親株細胞それぞれの細胞内代謝の違いを解析するために、メタボローム解析を行い、代謝変化特異的なマーカーとなりうる分子の探索。
- (4) セツキシマブ感受性および耐性細胞を用いた薬剤スクリーニング。
- (5) 担癌マウスモデルを用いた効果検討。

### 4. 研究成果

- (1) EGFR 高発現でセツキシマブ感受性を有する CD44v 陽性口腔扁平上皮癌 HSC-3・HSC-4 細胞を用いて、セツキシマブ耐性細胞を樹立することに成功した。



- (2) マイクロアレイによる遺伝子発現解析結果から、セツキシマブ耐性細胞は CD44v 陽性の未分化な腫瘍を形成する細胞と遺伝子発現が類似しており、実際にセツキシマブ治療後の腫瘍組織は CD44v 陽性の未分化な腫瘍となることから、セツキシマブ耐性細胞は親株と比べて、より癌幹細胞としての性質が強いことが示唆された。また、樹立したセツキシマブ耐性細胞を免疫不全マウスの背部皮下に移植し、できた腫瘍を免疫染色にて解析すると、主に CD44v 陽性細胞からなる未分化な腫瘍を形成することがわかった。このことから、セツキシマブ耐性細胞は親株より未分化性を維持する能力が高いことが示唆された。

- (3) 細胞内代謝を解析するために、メタボローム解析を行ったところ、親株は解糖系を

使用し、セツキシマブ耐性細胞は、TCA 回路の代謝物質を多く含むことから、ミトコンドリアにおける酸化リン酸化を使用する傾向があることが分かった。

(4) セツキシマブ耐性を獲得した細胞では、有意にスルファサラジンに対する感受性が亢進しており、xCT シスチントランスポーターに依存性が高くなることが分かった。また、抗酸化物質グルタチオンの合成阻害剤である BSO は、セツキシマブ耐性細胞において高い増殖抑制効果を示し、著明な細胞内 ROS の蓄積を誘導することが分かった。

(5) 口腔扁平上皮癌細胞株を免疫不全マウスの背部皮下に移植した担癌マウスモデルを用いて、EGFR 標的治療と xCT シスチントランスポーターの特異的阻害剤スルファサラジンの併用実験を行った。また、セツキシマブ耐性細胞を移植した担癌マウスにおけるスルファサラジンでの治療実験も行い、現在も解析中である。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件)

1: Wang M, Miura Y, Tsuchihashi K, Miyano K, Nagano O, Yoshikawa M, Tanabe A, Makino J, Mochida Y, Nishiyama N, Saya H, Cabral H, Kataoka K.

Eradication of CD44-variant positive population in head and neck tumors through controlled intracellular navigation of cisplatin-loaded nanomedicines.

J Control Release.

2016 May 28;230:26-33. (査読有)

2: Tsuchihashi K, Okazaki S, Ohmura M, Ishikawa M, Sampetean O, Onishi N, Wakimoto H, Yoshikawa M, Seishima R, Iwasaki Y, Morikawa T, Abe S, Takao A, Shimizu M, Masuko T, Nagane M, Furnari FB, Akiyama T, Suematsu M, Baba E, Akashi K, Saya H, Nagano O.

The EGF Receptor Promotes the Malignant Potential of Glioma by Regulating Amino Acid Transport System xc(-).

Cancer Res.

2016 May 15;76(10):2954-63. (査読有)

3: Miyashita H, Asoda S, Horie N, Usuda S, Kato S, Muraoka W, Yamada Y, Yoshikawa M, Hasegawa T, Onizawa K, Tanaka I, Yazawa M, Ogata H, Kishi K, Tomita T, Nakagawa T, Kawana H.

A titanium screw-retaining temporary denture on the raw surfacemuscular flap for the immediate maxillary reconstruction.

Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology.

2016 Jan ;28(1):8-12. (査読有)

4: Seishima R, Wada T, Tsuchihashi K, Okazaki S, Yoshikawa M, Oshima H, Oshima M, Sato T, Hasegawa H, Kitagawa Y, Goldenring JR, Saya H, Nagano O.

Ink4a/Arf-Dependent Loss of Parietal Cells Induced by Oxidative Stress Promotes CD44-Dependent Gastric Tumorigenesis. Cancer Prev Res (Phila).

2015 Jun;8(6):492-501. (査読有)

5: Ishimoto T, Sugihara H, Watanabe M, Sawayama H, Iwatsuki M, Baba Y, Okabe H, Hidaka K, Yokoyama N, Miyake K, Yoshikawa M, Nagano O, Komohara Y, Takeya M, Saya H, Baba H.

Macrophage-derived reactive oxygen species suppress miR-328 targeting CD44 in cancer cells and promote redox adaptation. Carcinogenesis.

2014 May;35(5):1003-11. (査読有)

[学会発表](計 4 件)

1. 岡崎章悟, 土橋賢司, 吉川桃子, 佐谷秀行, 永野修

xCT の阻害は CD44v 発現グルタミン依存性口腔扁平上皮癌細胞におけるレドックスホメオスタシスを破綻させる

第 75 回日本癌学会学術総会

2016.10.8

パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

2. 土橋賢司, 岡崎章悟, 大村光代, サンペトラ オルテア, 大西伸幸, 吉川桃子, 清島亮, 益子高, 末松誠, 馬場英司, 赤司浩一, 佐谷秀行, 永野修

EGFR はアミノ酸トランスポーター-xCT を介して脳腫瘍の悪性化を促進する

第 75 回日本癌学会学術総会

2016.10.7

パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

3. 吉川桃子, 筋生田整治, 森川暁, 臼田慎, 宮下英高, 河奈裕正, 中川種昭, 佐谷秀行, 永野修

セツキシマブ耐性口腔扁平上皮癌細胞に対する治療の可能性

第 33 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会

2015.1.30

奈良県新公会堂 (奈良県奈良市)

4. Tsuchihashi K, Nagano O, Yae T, Ishimoto T, Motohara T, Yoshikawa M, Yoshida G, Wada T, Masuko T, Mogushi K, Tanaka H, Osawa T, Kanki Y, Minami T, Aburatani H, Ohmura M, Kubo A, Suematsu M, Takahashi K, Baba E, Akashi K, and Saya H.

ESRP1 regulated alternative splicing of CD44mRNA enhances lung colonization of metastatic cancer cell.

AACR(American Association of Cancer

Research) Annual Meeting,  
April 5 - 9, 2014  
San Diego (USA)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

吉川桃子 (YOSHIKAWA, Momoko)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号: 50570967