

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11284

研究課題名(和文) In vitro口腔発がんモデルを用いた新規分子標的治療法の開発

研究課題名(英文) Development of new molecular target chemotherapy using in vitro oral carcinogenesis model

研究代表者

頭司 雄介 (Zushi, Yusuke)

兵庫医科大学・医学部・研究生(研究員)

研究者番号：80581206

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者らが樹立したヒト正常舌角化細胞(Human Tongue Keratinocyte: HTK)を用いたin vitro口腔発癌モデルを利用して転移関連遺伝子・がん幹細胞関連遺伝子を探索し、これらをターゲットにした新規分子標的薬開発の端緒をつけた。その結果、ヒトパピローマウイルス由来の口腔癌細胞やin vitro発癌モデルでは現状の化学療法に対する耐性は獲得できず、Non-human papilloma virus由来の悪性腫瘍にのみ耐性が生じ、それがAKTやPI3Kによるものであることを明らかにした。今後はAKTやPI3Kに対する標的治療は重要であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We try to develop new molecular target chemotherapy against metastasis related gene and/or cancer stem cell related gene using in vitro oral carcinogenesis model with immortalized human tongue keratinocyte transfected cell lines.
At first, we established anti-cancer drug resistant cell line of CDDP or Cetuximab, that was used for oral cancer chemotherapy. As results, human papilloma virus (HPV) related oral cancer cell line, and immortalized human tongue keratinocyte transfected cell lines did not develop to anti-cancer resistance. Non-HPV related oral cancer cell lines, for example, SCCKN, and HSC-3, got resistant for CDDP and Cetuximab.
We analyzed gene mutation between parental and resistant cell lines by next generation sequencer. We indicate there is no relation of gene mutation and copy number of ABC transporter proteins or EGFR. Most important point together resistance for anti-cancer drugs is gene mutation of AKT or PI3K.

研究分野：口腔癌

キーワード：in vitro 発癌 病態モデル がん化学療法 分子標的薬 薬剤耐性

1. 研究開始当初の背景

口腔扁平上皮癌は口腔癌の約 90%を占め、希少がんではあるものの本邦でも年間 7000 人程度の患者が罹患している。口腔癌は標準治療として手術を優先するが、高齢の癌患者が多い昨今では、必ずしもすべての患者に手術適応があるわけではなく、根治的・緩和的な化学放射線療法が行われるケースも珍しくない。このような中で、抗癌剤による有害事象は患者を死に到らしめることもあり、特に高齢者に使用する場合には慎重な投与が求められる。

現在、頭頸部がんの癌化学療法において key drug として使用されているのはシスプラチン(CDDP)と EGFR に対する分子標的薬であるセツキシマブ(Cmab)である。シスプラチンの登場で口腔扁平上皮癌に対する化学療法は大きく変化し、劇的な治療成績の向上をもたらした。しかしながら、その後いくつかの抗癌剤が開発されたにもかかわらず、現在までシスプラチンを超えるものはなく、使用開始から 30 年を経過しても key drug であることに変わりはない。

近年、癌細胞に対する分子生物学的解析が進み、いわゆる分子標的薬と呼ばれる薬剤が登場した。これらにより GIST など新たに「治るがん」と考えられる疾患も増えたが、有効性には一定の限界があることも明らかになっている。口腔扁平上皮癌においてもセツキシマブ(Cmab)は腫瘍の縮小には寄与するものの根治率は 10%代であり、長期投与により「癌細胞の獲得耐性」が生じることが明らかになりつつある。

最近、口腔を含む扁平上皮癌の発癌に従来の喫煙・飲酒に加え、ヒトパピローマウイルス(Human papilloma virus : HPV)の関与が明らかになってきた。また分子遺伝学レベルの解析では HPV 感染によるがんと喫煙・飲酒によって生じるがんは遺伝子レベルで明らかに別の変化が生じており、扁平上皮癌として一括りにできないことが明らかになってきている(Nature Rev Cancer 2018)。さらに HPV 陽性癌細胞は放射線および化学療法に対し感受性が良好であるとの報告が散見されている。

2. 研究の目的

頭頸部がんにおいて key drug として使用されているシスプラチン(CDDP)と分子標的薬であるセツキシマブ(Cmab)に対し、HPV 由来の癌細胞が抗癌剤耐性を示すか否かを、以前より我々が作成してきた HPV 陽性および陰性 in vitro 口腔発がんモデルを用いて解析しようと試みた。

さらにすでに樹立されている口腔扁平上

皮癌培養細胞を同様の方法で耐性獲得のメカニズムを検討した。

3. 研究の方法

文書により同意を得た非舌癌患者より採取したヒト舌角化細胞 HTK(Human Tongue Keratinocyte)に対しレトロウイルスベクターを用いて HPV の E6 と E7 を遺伝子導入し、不死化細胞である HTK-E6E7 細胞株(HTK-HPV 陽性モデル)を作製した。同様の手法を用いて、同じ HTK に CDK4, cyclinD1, hTERT, dominant negative p53 を遺伝子導入して、HTK-CDK4/cyclinD1/hTERT/DNp53 細胞株(HTK-HPV 陰性モデル)を作製した。

さらに子宮頸癌の先行研究と同様にこれらの HTK-HPV 陽性モデルおよび陰性モデルに Hras と c-myc を追加で導入したがん幹細胞の性質をもつ細胞株もそれぞれ作製した。

これら人為的に作成した 4 細胞株に加えて従来、口腔癌培養細胞株として研究に用いている SCC25, SCCKN, HSC-2, HSC-3, OSC-19(これらすべては先行研究により HPV 陰性)および UPCI-SCC090(ピッツバーグ大学がんセンターより惠与 HPV 陽性舌癌培養細胞)の計 10 細胞株に対し、口腔扁平上皮癌の key drug であるシスプラチン(CDDP)と EGFR に対する分子標的薬であるセツキシマブ(Cmab)を dose escalation method を用いて、約 2 年間継代培養し、耐性株を作製した。

得られた耐性株と親株を遺伝子レベル・蛋白レベルで比較検討することにより耐性機序の解析を行った。

4. 研究成果

(1)化学療法耐性株の作成について

上記 10 細胞株に対し、CDDP および Cmab を作用させたところ、CDDP に対して耐性を獲得したのは SCCKN, HSC-3, OSC-19 の 3 株、Cmab で耐性を獲得したのは SCCKN であった。われわれは当初の予想では、HTK-HPV 陰性モデルに Hras や c-myc を遺伝子導入した人工的ながん幹細胞株では CDDP 耐性を獲得するであろうと思っていたが、意に反して全く耐性を示さなかった。この結果は全く作用機序が異なる EGFR モノクローナル抗体である Cmab でも同様の結果を示した。

これらの結果は我々が作製した in vitro 口腔発がんモデルに限定されるものか否かは、現段階では不明であり、今後、他領域における同様の試みを待つところであるが、我々の見解ではもともと培養細胞が持つ heterogeneity (不均一性)に関わるのではないかと考えている。すなわち、培養細胞株で

ありながら CD44 や CD133 の表面マーカーを用いた stem cell 検出の試みは知られているところであるが、培養細胞でもこのような stem cell を頂点としたヒエラルキーは維持されており、抗癌剤を作用させた際に、このような heterogeneity を維持するメカニズムが耐性獲得に有利に働くのではないかと考えた。

一方、in vitro 口腔がんモデルは遺伝子導入により作製した培養株であり、従来より報告されているような耐性に関する遺伝子は存在していないし、遺伝子導入により運動した変化は確認されていない。このような均一な細胞集団であるが故に、癌化学療法に対しては全く耐性を示さなかったのではないかと考察している。

(2) CDDP 耐性獲得機序について

CDDP に対して耐性を獲得した SCCKN, HSC-3, OSC-19 の 3 株に対してそのメカニズムの解析を行った。(図 1)

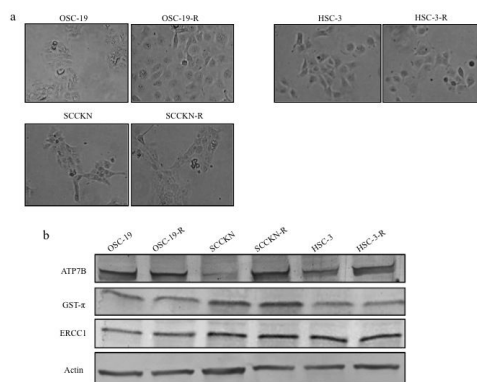
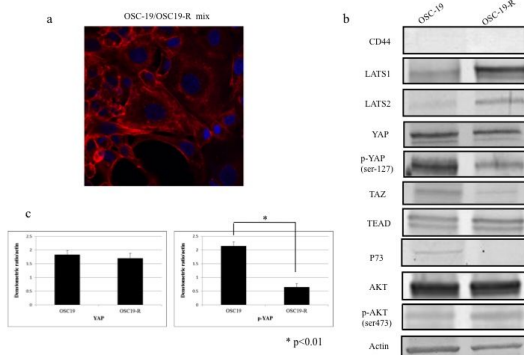


図 1 に示すように、3 株中 2 株において従来報告されていた ATP7B の関与が明らかになった。

しかしながら、図 2 に示すように OSC-19 は ATP7B の関与はなく、この原因を検索したところ、Hippo pathway の YAP の関与が明らかとなった。

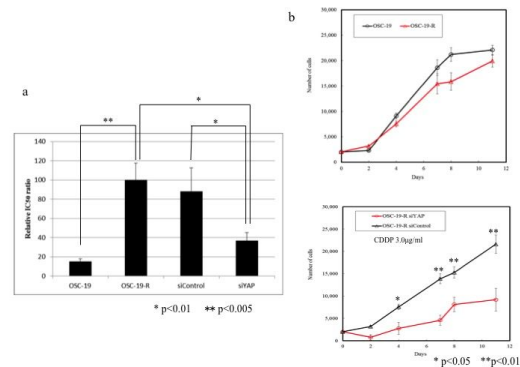
(図 2)



また、図 3 に示すように YAP のリン酸化を

siRNA を用いて抑制すると、明らかに CDDP の殺細胞効果が回復することから、一部の扁平上皮癌では CDDP の耐性獲得に Hippo pathway が関与していることを明らかにした。

(図 3)

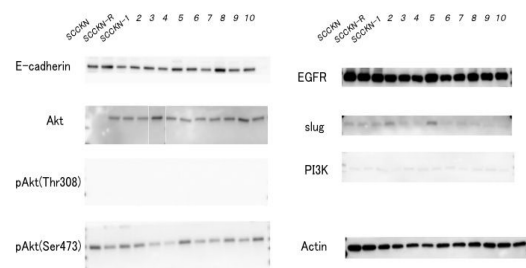


(3) Cmap に対する耐性獲得機序について

CDDP と同様の方法で Cmap に対して耐性細胞株を作製した。その結果、Cmap に対しては SCCKN のみが耐性を獲得した。事前にすべての細胞株に対して次世代シーケンサー (MiSeq, Illumina 社) にて TruSeq Amplicon-Cancer Panel を用いた EGFR の遺伝子変異を確認したところ、ほぼすべての細胞株で遺伝子変異を複数認められた。EGFR は頭頸部扁平上皮癌においてもっとも遺伝子変異が多いことで知られるが、Cmap による耐性が誘導されなかったことにより、EGFR の遺伝子変異は Cmap の効果には影響しないことが確認された。

その上で、得られた Cmap 耐性株を single cell cloning を行い、EGFR-Ras-Raf-MEK-ERK 経路や PI3K-AKT-mTOR 経路、EMT 関連タンパクの発現を検討した。

(図 4)



その結果、図 4 に示すように Akt のリン酸化に差があることを認め、現在、この点について更なる解析を進めている。

(4)SCCKN における遺伝子変異の性状

すべての細胞株に対して次世代シーケンサー (MiSeq, Illumina 社) にて TruSeq Amplicon-Cancer Panel を用いた癌遺伝子の解析を行ったところ、CDDP および Cmap に耐性を獲得した SCCKN は *PIK3CA* の E542K に変異があることを確認した。これは *PIK3CA* の Helical domain に位置しており、この末端にある Kinase domain は常に kinase 活性を有していることが分かる。これが SCCKN が CDDP および Cmap に容易に耐性を獲得する原因ではないかと考えた。口腔扁平上皮癌における *PIK3CA* の変異は、16%以下の頻度で存在が確認されている。このような腫瘍に対し CDDP や Cmap の投与は無効であるだけでなく悪性度の高い腫瘍と変化する可能性があると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

荒木華子、野口一馬、上田美帆、川邊睦記、吉川恭平、高岡一樹、岸本裕充「口腔扁平上皮癌培養細胞における VEGF-A/VEGFR の発現」第 54 回日本口腔組織培養学会学術大会・総会 2017 年 11 月 4 日 盛岡

野口一馬、荒木華子、首藤敦史、川邊睦記、森寺邦康、高岡一樹、岸本裕充

「次世代シーケンサーによる遺伝子診断を活用した口腔癌治療の 1 例」第 70 回日本口腔科学会学術集会 2016 年 4 月 福岡

荒木華子、野口一馬、高岡一樹、岸本裕充「セツキシマブ耐性口腔扁平上皮癌培養細胞の作成と耐性機構の解析」第 34 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会 2016 年 1 月 21 日 横浜

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

頭司 雄介 (Zushi, Yusuke)
兵庫医科大学・医学部・研究生 (研究員)
研究者番号：80581206

(2)研究分担者

岸本 裕充 (Kishimoto, Hiromitsu)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号：30291818

野口 一馬 (Noguchi, Kazuma)
兵庫医科大学・医学部・准教授
研究者番号：50309473

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()