

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05510

研究課題名(和文) ナノ磁性複合分子によるDDSを用いた新規細胞周期制御法の確立と癌治療への応用

研究課題名(英文) Establishment of novel cell cycle control method using DDS with nanomagnetic composite molecule and application to cancer treatment

研究代表者

森田 圭一 (Morita, Keiichi)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師

研究者番号：10396971

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：口腔扁平上皮癌220例の体細胞変異を評価したところ、TP53、CDKN2Aの遺伝子変異がそれぞれ79人(35.9%)、35人(15.9%)に認められた。TP53変異あり+受容体チロシンキナーゼ増幅群で、累積5年生存率が41.6%と予後不良であった。また、免疫組織化学染色で評価したところ、EGFRとMETの両方が高発現している患者の生存率は22.0%と非常に悪かった。さらに、酸化鉄ナノ粒子と多糖ナノゲルで構成される磁気ナノゲルを使用して、磁気誘導による細胞や組織への抗がんタンパク質導入が可能であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果により、TP53やCDKN2Aの変異が口腔がんにおいて多く認められることが示され、細胞周期制御関連分子を標的とした抗がん薬物療法開発の重要性が示唆された。また、EGFRとMETの共発現が予後不良予測因子であることが示されたため、今まで効果が少ないと言われていたMETの抗体薬をEGFRの抗体薬に重ねて使用することにより、予後不良な症例に効果が認められる可能性が示され、単剤では効果が無かった薬剤を組み合わせる治療を今後検討していくことが重要である。

研究成果の概要(英文)：We evaluated somatic mutations from 220 cases of oral squamous cell carcinoma, genes carrying mutations included TP53 and CDKN2A in 79 (35.9%) and 35 (15.9%), respectively. We identified significantly poorer prognosis in the TP53 mutation/receptor tyrosine kinase amplification group, for which the cumulative 5-year survival rate was 41.6%. We evaluated immunohistochemistry data, the survival rate of patients with high co-expression of both EGFR and MET was very poor (22.0%). Moreover, we demonstrated that anticancer proteins can be delivered to cells and tissues using magnetic nanogel chaperone (MC) composed of iron oxide nanoparticles and a polysaccharide nanogel.

研究分野：がんゲノム解析

キーワード：口腔がん 分子標的治療薬 細胞周期 ナノゲル

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年のがんゲノム研究は、次世代シーケンサー(NGS)を用いた大規模がんゲノムプロジェクトによりがんゲノム異常の全体像が明らかとなってきた。このようながんゲノム解析データの蓄積と分子標的治療薬の開発により、がん治療は発生臓器や組織型、病期で決定されてきた治療法から遺伝子変異別の治療法へとシフトしつつある。

口腔がん(OSCC)は全世界で年間約300,000人が罹患し、治療技術の進歩にも関わらず、5年生存率は60%にとどまっている。頭頸部扁平上皮癌(HNSCC)においてもNGSを用いた網羅的な遺伝子変異解析が行われ、HNSCCにおけるゲノム異常に関する多くの情報がもたらされた。しかし、ゲノム異常を基にした層別化による治療を推し進めていくためのエビデンスは乏しい。また、HNSCCに適応のある分子標的治療薬はEGFRの抗体薬であるセツキシマブのみで、他臓器で使用されている薬剤のdrug repositioningが検討されるべきである。

一方、分子標的治療薬は標的となる分子経路に異常を生じていない症例では効果が期待できない。頭頸部がんでは特にTP53およびCDKN2Aの遺伝子変異が高率に生じており、細胞周期制御の重要性があらためて注目されている。

### 2. 研究の目的

#### (1) 細胞周期関連細胞死制御分子の同定

口腔がんの化学/放射線療法抵抗性予測分子を中心に、その下流分子を含めた新規細胞周期制御分子の機能を解析するとともに、口腔がん体細胞変異解析結果から同定された細胞周期関連遺伝子の機能回復をも視野に入れた新しい細胞周期関連細胞死制御分子を同定することを目的とした。

#### (2) ナノ磁性複合分子によるドラッグデリバリーシステム(DDS)の検討

色素ナノ磁性ハイブリッド分子の動態を*in vitro*および*in vivo*で明らかにし、*in vivo*で殺細胞性古典的抗がん剤、セツキシマブなどの抗体薬を含むタンパク、mRNAを含む核酸に対応できる創薬解析基盤を形成することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 細胞周期関連細胞死制御分子の同定

これまでの研究で、口腔がんの化学/放射線療法抵抗性予測分子Galectin-7が細胞周期制御に関連していることを見出しているため、Galectin-7 強制発現アデノウイルスベクターを用いて培養がん細胞におけるGalectin-7の下流分子を探索した。

また、口腔がんにおける細胞周期関連細胞死制御分子を同定するために、次世代シーケンサーを用いて、口腔がん組織の体細胞変異を網羅的に検出した。対象は東京医科歯科大学口腔外科外来を2001年から2015年に受診し、OSCCと診断された220例とした。病変のgDNAはFFPE組織より抽出し、臨床病理学的な情報は医療記録より収集した。なお、本研究は東京医科歯科大学歯学部倫理審査委員会の承認を得ている(No. 1087)。ライブラリー調整は、2800以上のCOSMIC変異を含むがん関連50遺伝子のパネルであるThermo Fisher Scientific社のCancer Hotspot Panel v2を用い、シーケンスはIon Protonを用いて行った。データはTorrent Suite Software v4.2.191およびIon Reporter Software v4.6で解析を行い、体細胞変異(SM)のカットオフ値を変異アレル頻度4.0%未満とした。また、本研究では病変に対応する正常組織のシーケンスを行っていないため、公共データベース(1000 genome projectおよび5000 exomes project)を利用して可能性のある生殖細胞変異を除外した。コピー数変異(CNA)はBiomedical Genomics Workbench 2.5を用い、9例の非癌組織をコントロールとし解析を行った。増幅および欠失の判定基準はコントロールに対するlog<sub>2</sub> ratioで、2以上のものを増幅、-2以下のものを欠失とした。臨床病理学的な因子と遺伝子変異に関する比較はカイ二乗検定またはフィッシャー正確検定、予後と臨床病理学的または遺伝子変異に関する因子の単変量および多変量解析はCox比例ハザードモデルを、生存曲線はカプランマイヤー法を用いた。すべての統計計算はPASW Statistics, version 18を用い、またSMに関する統計学的解析はすべてnon-synonymous変異を対象に行った。さらに、この220例のうち、組織標本が利用できる208例について免疫組織化学染色(IHC)を用いて解析した。そのうちレセプター型チロシンキナーゼ(RTK)遺伝子増幅または遠隔転移が認められた63例に関して予備的にEGFR、ERBB2、FGFR1、ERBB4、MET、FLT3のIHCを施行した。さらに残り145例についてEGFR、METのIHCを施行した。染色スコアはHER2の評価に関する論文を基に、スコア0:染色されず、1+:弱く染まる、2+:中等度染まる、3+:強く染まるの4段階とした。EGFRではIHC Score3+を高発現、METでは2+3+を高発現と定義した。さらにRTK発現と50種のがん関連遺伝子の変異・増幅・欠失に関するシーケンスデータとの関連も解析した。OSCC208症例のmRNA発現データは取得できないため、the Cancer Genome Atlas (TCGA)のレポジトリから生存分析を行うオンラインデータベースであるKaplan-Meier plotter (www.kmplot.com)を用いてEGFRおよびMETのmRNA発現の意義を評価した。

#### (2) ナノ磁性複合分子によるDDSの検討

ナノゲル-酸化鉄ハイブリッドに蛍光色素等でラベルした溶液を用意し、色素ナノ磁性ハイブリッド分子の動態を*in vitro*および*in vivo*で検討した。殺細胞性古典的抗がん剤を含むナノゲル-酸化鉄ハイブリッドを作成し、*in vivo*における抗がん効果を観察した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 細胞周期関連細胞死制御分子の同定

口腔がんの化学/放射線療法抵抗性予測分子 Galectin-7 がサイクリン依存性キナーゼ2(CDK2)を通じて細胞周期制御に関連していることを見出した。Galectin-7 強制発現アデノウイルスベクターを用いて Galectin-7 の下流分子をさらに探索している。

一方、次世代シーケンサー解析の結果、体細胞変異 (SM) は 311 変異検出され、synonymous 変異が 68 変異、non-synonymous 変異が 243 変異であった。遺伝子別では、TP53 が 79 例 (35.9%)、CDKN2A が 35 例 (15.9%)、PIK3CA が 19 例 (8.6%)、NOTCH1 が 9 例 (4.1%)、HRAS が 4 例 (1.8%)、RB1 が 3 例 (1.4%) などであった。(図 1)

CNA については、欠失は CDKN2A が 25 例 (11.4%)、NOTCH1 が 8 例 (3.6%)、SMAD4 が 3 例 (1.4%) などで認められ、増幅は PIK3CA が 38 例 (17.3%)、AKT1 が 11 例 (5.0%)、HRAS が 8 例 (3.6%) などであった。RTK の増幅は 37 例 (16.8%) 認められ、遺伝子別では EGFR が 17 例 (7.7%)、ERBB2 が 7 例 (3.2%)、FGFR1 が 7 例 (3.2%)、FGFR3 が 6 例 (2.7%)、ERBB4 が 3 例 (1.4%)、MET が 3 例 (1.4%)、FLT3 が 2 例 (0.9%)、KIT が 1 例 (0.5%)、PDGFRA が 1 例 (0.5%) であった。RTK、CDKN2A、PIK3CA ではそれぞれの遺伝子で SM と CNA は排他的傾向を認め、遺伝子間では、CDKN2A の欠失は TP53 の SM と排他的である一方、PIK3CA の増幅は TP53 の SM と協調的であった。(図 2)

PIK3CA の SM は Stage III, IV に有意に多く認められ ( $p = 0.023$ )、増幅は Stage I, II に有意に多く認められた ( $p = 0.007$ )。T 因子、N 因子を別々に検討してみると、T3,4 症例で PIK3CA の SM が ( $p = 0.015$ )、N0 症例で PIK3CA の増幅が ( $p = 0.028$ ) それぞれ有意に多く認められた。

RTK 増幅の 37 例中 9 例 (24%) に遠隔転移を認め、これは全遠隔転移 21 例の 43%を占めていた。

また、220 例中、pN0 症例で治療後に遠隔転移を認めた 3 例はいずれも RTK の増幅を認めた。単変量解析において遺伝子変異の有無で有意差を認めたものは、RTK 増幅と CDKN2A 欠失で、累積 5 年生存率はそれぞれ 64.6%、63.7%であった。多変量解析では、RTK 増幅と CDKN2A 欠失に、年齢、組織化学的分化度、Stage の因子を加えて検討すると、RTK の増幅が唯一独立した予後因子であった。TP53 の SM では OS に関し有意差は認めなかったが、TP53 の変異と RTK の増幅の有無の 4 群で比較すると、TP53 変異/RTK 増幅の群が有意に予後不良の結果となり、累積 5 年生存率は 41.6%であった。(図 3)

本研究から RTK の増幅は OSCC の遠隔転移に対する予測因子であることが示された。更に RTK 増幅と TP53 の SM を両方有する群では他の群と比較し有意に予後不良であることが示され、これは TP53 の機能喪失が RTK の増幅による腫瘍活性化を推し進め、遠隔転移を有意に引き起こす結果となったと考えられた。HNSCC における分子標的治療薬は抗 EGFR 抗体であるセツキシマブのみ臨床適応が認められている。他にも様々な RTK に対する臨床試験が行われてきたが、未だセツキシマブのような効果は認められていない。これまで行われてきた臨床試験

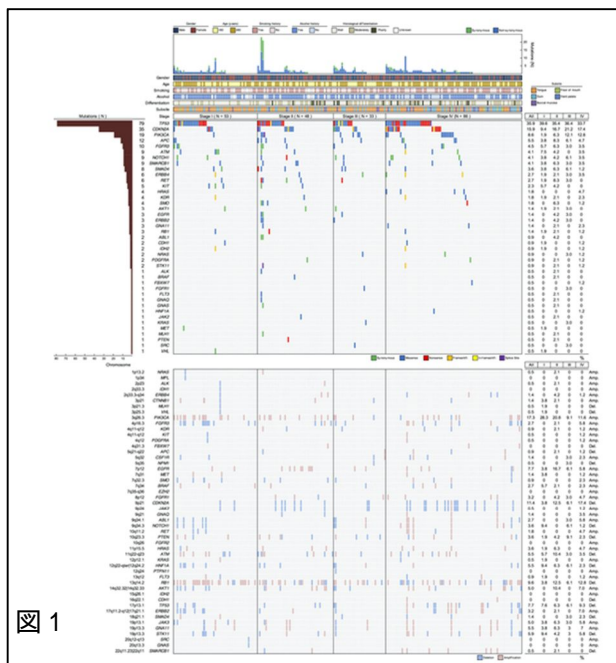


図 1

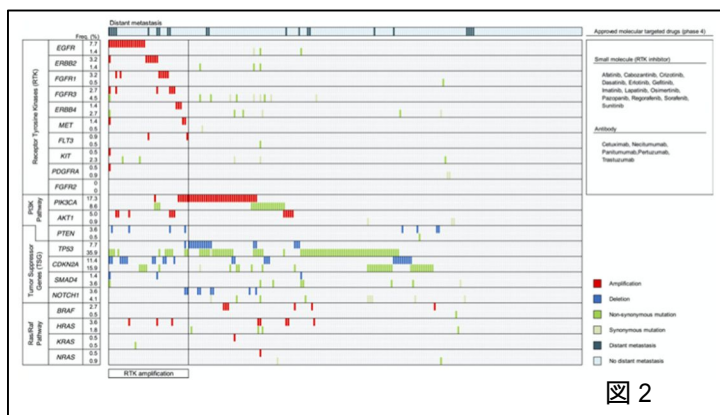


図 2

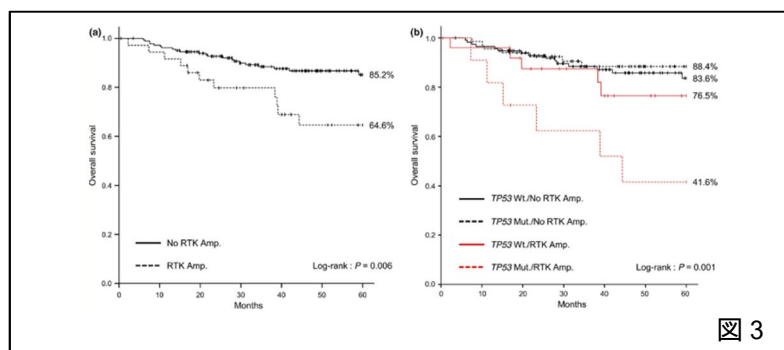


図 3



の多くは再発転移症例が対象であったが、RTK 増幅を認めるなどのハイリスク群に対して補助療法として使用することにより治療成績の改善の余地があるものと考えられた。*PIK3CA* の SM と Stage に関して、Kozaki らは OSCC において Stage I- と比較し Stage で有意に認められたと報告しており、今回の結果もほぼ同様の結果となった。一方、*PIK3CA* の増幅については、pN0 症例で有意に多いことから腫瘍の初期状態を反映しているものと考えられた。喫煙は口腔がんにおけるリスク因子としてこれまで数多くの報告がされてきた。また、一般的に喫煙により C>A 変異が増加し、C>T 変異が減少することが知られている。今回の研究においては喫煙と非喫煙による遺伝子変異の差は認められず、塩基置換パターンに関しても両群に差は認められなかった。このことは、喫煙は口腔がんの発癌過程において遺伝子異常への影響は少ないものと考えられた。本研究に用いたパネルは、これまで HNSCC に関して報告されてきた *CASP8* や *FAT1* 遺伝子が含まれていない。また、*TP53* は本研究でもっとも多くの変異が検出された(36%)が、TCGA では72%、Vettore らは38%、COSMIC では42%と報告によってばらつきがあり、変異の検出方法の違いや民族差の影響が考えられた。今後はこれらの問題を解決することでさらなる有用な知見が得られるものと思われる。今回の研究結果から癌組織の FFPE 検体と NGS を用いることにより、RTK の増幅が OSCC の遠隔転移に対する予後予測因子であることが示され、NGS を用いたクリニカルシークエンスの有用性が示唆された。

続いて、63 例の予備的な免疫組織化学染色 (IHC) を施行した結果、EGFR、ERBB4、MET を除く RTK で陽性の染色結果を示した症例はほとんどなく、また染色スコアと ERBB4 の予後に相関はなかったため、EGFR と MET に対して残り 145 例の IHC を施行した。EGFR の IHC の結果はスコア 0: 23 例、1+: 46 例、2+: 79 例、3+: 60 例であった。(図 4)

EGFR のゲノム増幅が認められた症例はすべて IHC スコア 2+ または 3+ で、それぞれその中の 7.6%、15% であり、EGFR の遺伝子増幅とタンパク発現に相関が認められた ( $P=0.024$ )。遠隔転移は IHC スコア 3+ の症例で 13.3.% と最も多かった。MET の IHC の結果はスコア 0: 75 例、1+: 92 例、2+: 32 例、3+: 9 例であった。MET のゲノム増幅は 3 例と少数であったため、IHC スコアとの関連は認められなかった。スコア 2+、3+ では、20% を超える症例で遠隔転移を認めた ( $P=0.026$ )。MET 高発現 41 例中 9 例 (22.0%)、EGFR および MET の両方が高発現の 15 例中 6 例 (40.0%) で遠隔転移を認め、統計的に有意差を認めた ( $P=0.003$ 、 $P=3.41 \times 10^{-5}$ )。(図 5)

EGFR および MET の高発現、低発現の累積 5 年生存率は、ともに約 65% と 85% であった。

(図 6(A), (B))

本研究で用いた OSCC208 症例の mRNA 発現データは取得できないため、Kaplan-Meier plotter を用いて EGFR および MET の mRNA 発現の意義を評価した。TCGA の HNSCC 症例において、EGFR mRNA 高発現は有意に予後不良であった。また MET mRNA 高発現も予後不良と関連していた。一方、EGFR または MET 高発現に加えて TP53 変異を伴う症例において、TP53 変異の相加効果としての生存率の減少は認めなかった。さらに EGFR および MET の両方が高発現している症例は 15 例と少ないながら、5 年累積生存率は 22.0% と、その他の症例 85.8% より有意に低かった ( $P < 1.0 \times 10^{-9}$ )。

(図 6(C))

多変量解析では EGFR と MET の IHC スコアが独立した予後予測因子であることが示された。

RTK は細胞増殖、分化、生存、代謝、運動性などの制御に関わる膜貫通タンパクで、RTK 機能の調節不全は細胞

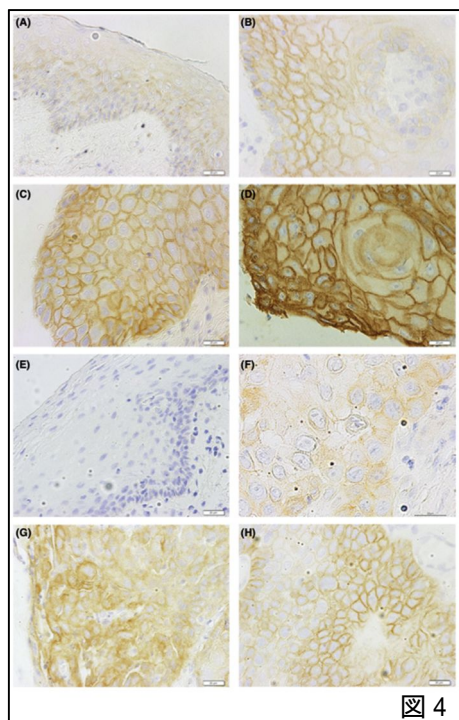


図 4

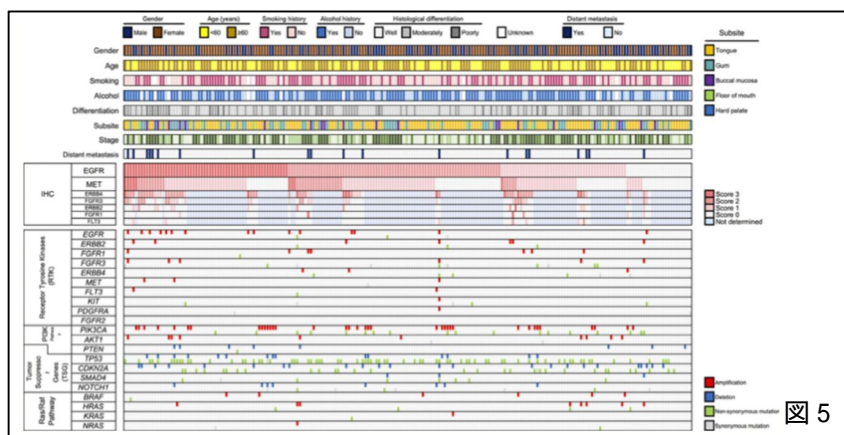


図 5

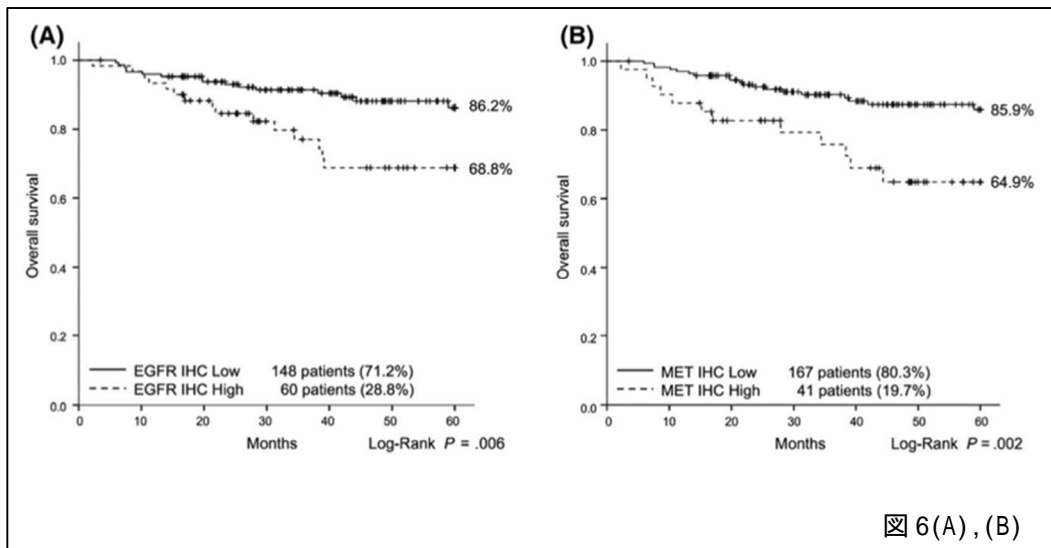


図 6(A), (B)

間および細胞内シグナル伝達を乱すことが知られており、HNSCCの多くでEGFRが過剰発現している。局所進展例に対するセツキシマブ併用放射線療法と再発転移例に対するFirst lineとしてのプラチナ製剤化学療法によって、奏効率と生存率は有意に上昇した。その一方でプラチナ耐性の再発転移例に対するSecond lineとしてのセツキシマブ単剤投与は奏効率が低かった。舌癌症例の57.3%、54.1%がそれぞれHGF、MET染色が陽性となり、OSCCでのMET高発現は、HGF-METオートクリン活性によるとの報告がある。本研究ではMET高発現症例の20%以上と、EGFRおよびMET両強発現症例の40%に遠隔転移が認められた。これらはEGFRとMETがEMT誘導因子であることで説明がつく可能性がある。c-SRC発現細胞株に対し、EGFR阻害剤エルロチニブとMET

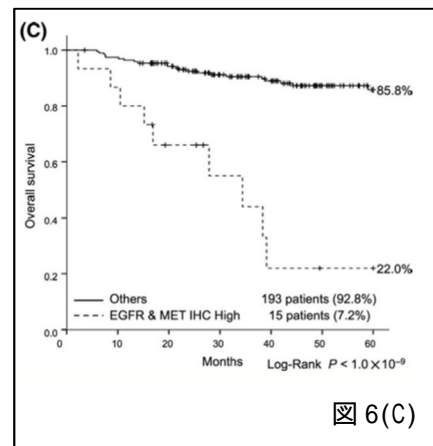


図 6(C)

阻害剤 PF04217903 の 2 剤を作用させたところ、細胞の生存率が低下し腫瘍体積が減少したとの報告がある。これらのことより、EGFR と MET の相互作用は、HNSCC 細胞の抗 EGFR 抗体への耐性につながる可能性が考えられる。がんの進行は複数経路の複数遺伝子からのシグナルに依存しているため、すべての経路がブロックできなければ進行を制御できない。本研究において EGFR と MET 両高発現症例の予後は著しく不良であった。したがって、OSCC 患者において EGFR および MET の IHC スクリーニング後に EGFR および MET の阻害剤の併用療法を検討する可能性が示された。

## (2) ナノ磁性複合分子による DDS の検討

本研究では、酸化鉄ナノ粒子と多糖ナノゲル、タンパク質キャリアで構成される磁気ナノゲルシャペロン (MC) を使用して、磁気誘導による生体へのタンパク質導入が可能であることを示した。MC システムは、抗がんタンパク質の培養腫瘍細胞への効率的導入を可能にし、主にアポトーシスを介して細胞増殖を抑制した。静脈内全身投与による磁気を利用したタンパク質導入で MC は磁場なしに比べて 3 倍以上の腫瘍組織に蓄積した。皮下注射した抗がんタンパク MC は組織の細胞質内に磁氣的に誘導されることが示された。口腔がんモデルでは、抗がんタンパク MC は、全身状態への影響が少ない状態で腫瘍体積のみを減少させ、腫瘍消失後 3 か月で腫瘍の再発は認めなかった。

## <引用文献>

1. Oikawa Y, Morita KI, Kayamori K, Tanimoto K, Sakamoto K, Katoh H, Ishikawa S, Inazawa J, Harada H: Receptor tyrosine kinase amplification is predictive of distant metastasis in patients with oral squamous cell carcinoma. *Cancer Science* 108(2):256-266, 2017. doi: 10.1111/cas.13126.
2. Yokokawa M, Morita KI, Oikawa Y, Kayamori K, Sakamoto K, Ikeda T, Harada H: Co-expression of EGFR and MET has a synergistic effect on the prognosis of patients with oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 49(3):235-242, 2020. doi: 10.1111/jop.12977.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Oikawa Y, Morita KI, Kayamori K, Tanimoto K, Sakamoto K, Katoh H, Ishikawa S, Inazawa J, Harada H	4. 巻 108(2)
2. 論文標題 Receptor tyrosine kinase amplification is predictive of distant metastasis in patients with oral squamous cell carcinoma.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 256-266
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.13126	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 Yokokawa M, Morita KI, Oikawa Y, Kayamori K, Sakamoto K, Ikeda T, Harada H	4. 巻 49(3)
2. 論文標題 Co-expression of EGFR and MET has a synergistic effect on the prognosis of patients with oral squamous cell carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Oral Pathology & Medicine	6. 最初と最後の頁 235-242
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jop.12977	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6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 森田 圭一, 横川 美咲, 及川 悠, 栢森 高, 坂本 啓, 池田 通, 原田 浩之
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌患者における遠隔転移予測因子の検討
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第62回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 河崎 陸, 佐々木 善浩, 西村 智貴, 関根 由莉奈, 森田 圭一, 丸川 恵理子, 澤田 晋一, 向井 貞篤, 秋吉 一成
2. 発表標題 磁性ナノゲルシャペロンによるタンパク質デリバリー
3. 学会等名 第33回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 及川 悠, 森田 圭一, 栢森 高, 坂本 啓, 谷本 幸介, 加藤 洋人, 石川 俊平, 稲澤 譲治, 原田 浩之
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌における遠隔転移予測因子としてのチロシンキナーゼ受容体
3. 学会等名 第35回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 及川 悠, 森田 圭一, 栢森 高, 坂本 啓, 谷本 幸介, 石川 俊平, 稲澤 譲治, 原田 浩之
2. 発表標題 ワークショップ 頭頸部癌の集学的治療 口腔がんにおけるがん関連遺伝子変異のターゲットリサーチ
3. 学会等名 第54回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 及川 悠, 森田 圭一, 栢森 高, 坂本 啓, 石川 俊平, 稲澤 譲治, 原田 浩之
2. 発表標題 口腔がんにおけるcell-free DNAの臨床応用
3. 学会等名 第75回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 横川 美咲, 森田 圭一, 及川 悠, 栢森 高, 坂本 啓, 池田 通, 原田 浩之
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌患者におけるEGFRおよびMET発現の検証
3. 学会等名 第37回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会
4. 発表年 2019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	坂本 啓  (Sakamoto Kei)  (00302886)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師   (12602)	
研究 分担者	佐々木 善浩  (Sasaki Yoshihiro)  (90314541)	京都大学・工学研究科・准教授   (14301)	