

令和元年6月3日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11521

研究課題名（和文）標準治療抵抗性口腔扁平上皮癌における癌間質細胞を標的とした新規治療法の開発

研究課題名（英文）Development of novel treatment targeting cancer stromal cells in standard treatment-resistant oral squamous cell carcinoma

研究代表者

筋生田 整治（Asoda, Seiji）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師

研究者番号：80296706

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,700,000円

研究成果の概要（和文）：セツキシマブ耐性口腔扁平上皮癌の癌間質・間葉系細胞に着目し、CD44vと新規間質マーカーの発現プロファイルの構築による個別化治療を目的とした。臨床検体より未分化なセツキシマブ耐性口腔扁平上皮癌（SpCC）の解析を行ったところ、上皮マーカー：EpCAMと間葉系マーカー：PDGFR を発現する細胞が存在した。いずれにもがん幹細胞マーカーCD44vが存在することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SpCCの検体を用いて間質特異的細胞表面マーカーやその細胞特性評価を行い、病理診断のみでは予測できない細胞の性質や機能を明らかにした。その上で、効果的薬剤が定まっていないSpCCに対するイマチニブによる新規治療の可能性を見出した。

研究成果の概要（英文）：Our group focused on cancer-associated mesenchymal / stromal cells of cetuximab-resistant oral squamous cell carcinoma. We aimed at personalized treatment by constructing expression profiles of CD44v and novel mesenchymal markers. Analysis of cetuximab-resistant undifferentiated oral squamous cell carcinoma using tissue sample revealed that tissue-derived cells expressed both epithelial marker, EpCAM and mesenchymal marker, PDGFR. The cancer stem cell marker CD44v-positive cells were identified in both cell fractions.

研究分野：口腔がん

キーワード：CD44v 口腔扁平上皮癌 SpCC

1. 研究開始当初の背景

EGFR 阻害剤であるセツキシマブは、2013 年から頭頸部がんの使用可能となった現時点で唯一の分子標的薬である。再発・転移頭頸部癌における殺細胞性抗がん剤（プラチナ系など）との併用、および局所進行頭頸部癌における放射線照射との併用にて、シスプラチン以来 30 年ぶりに全生存期間の延長が示されており、承認からわずかな期間で NCCN や国内のガイドラインにおいて切除不能症例の標準治療となった。しかし、プロトコールでは腫瘍の進行・増悪を認めた時点でセツキシマブ投与を終了するとされており、ある時期に腫瘍がセツキシマブに対する抵抗性を獲得すると考えられる。実際の臨床においても、腫瘍を縮小することはできるが根治させることは難しいのが現状で、セツキシマブを補完できる薬剤や治療法の開発が望まれる。このような命題に対して、申請者らは癌の悪性度及び治療抵抗性を規定する重要な現象である上皮間葉転換 (epithelial mesenchymal transition: EMT) および幹細胞様性質 (stem cell-like characteristics) に着目し、これら 2 つの現象に関わる CD44v の口腔扁平上皮癌における機能的役割の解析を進めてきた。これまでにわれわれの研究グループは、癌細胞表面の CD44v がシスチントランスポーターの発現を安定化させることでグルタチオン合成を高め、活性酸素を腫瘍の増大や治療抵抗性に寄与することを明らかにし、CD44v が高発現している口腔扁平上皮癌細胞株では、従来の抗癌剤 (シスプラチン: CDDP) 感受性が低く、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投与が効果的であることを見出してきた (Yoshikawa M, Asoda S, Saya H, et al. Cancer Research 2013)。これらの研究結果を基に、既にスルファサラジンを用いた進行胃癌における臨床試験を開始しており、今後頭頸部癌・肺癌でも開始する予定である。また、高分化な口腔扁平上皮癌細胞を移植した担癌マウスにセツキシマブを投与したところ、実臨床と同様に腫瘍は著しく縮小するがセツキシマブ耐性となった腫瘍が残存することが確認された。さらに、この組織は CD44v 陽性細胞からなる未分化な腫瘍となっていることが判明し、セツキシマブ耐性腫瘍において EMT が出現している可能性が高いことが示唆された。一方で CD44 は間葉系幹細胞マーカーとしても報告されており (Sackstein R, et al. Nature Medicine 2008)、EMT の観点からは癌間質・間葉系細胞の役割の解析も不可欠である。研究分担者の森川らは、これまでにフローサイトメーターによる細胞分離技術を活用した間葉系幹細胞分離に関する研究を精力的に行ってきたおり、これら培養を経ずに間葉系細胞分画を直接生体から分離する技術を確認した (Morikawa S, et al. JEM 2009)。

そこで本研究は、組織からの生細胞単離技術と免疫染色を用いて、セツキシマブ療法後に残存する癌間質から治療耐性の鍵となる新規マーカーを見出し、切除不能口腔癌に対する治療戦略や、CD44v と新規マーカーの発現プロファイル構築による薬剤耐性の有無に合わせた個別化治療への足がかりとしたいと考えている。

2. 研究の目的

セツキシマブは頭頸部がんに適応される最新かつ唯一の分子標的薬で、切除不能口腔癌の標準治療として用いられている。しかし、著効例においてもある時期に抵抗性を獲得すると考えられ、腫瘍の根治は困難であることから、これらを補完できる治療法の開発が望まれる。われわれはこれまでに、セツキシマブ耐性腫瘍において上皮間葉転換 (EMT) マーカーである CD44v が高発現していることを解明してきた。そこで本研究では、セツキシマブ耐性口腔扁平上皮癌の癌間質・間葉系細胞に着目し、新たな治療標的の探索や特異的分子標的治療薬開発を目的とする。本研究によって、口腔癌の新規治療法のみならず、CD44v と新規間質マーカーの発現プロファイルの構築による薬剤耐性や悪性度に合わせた個別化治療が可能になると考える。

3. 研究の方法

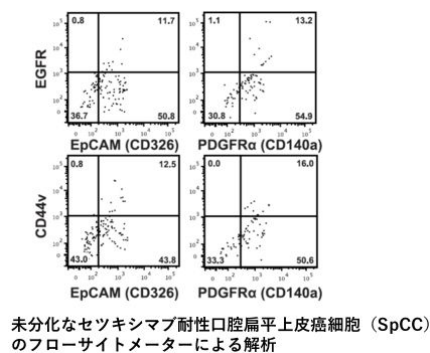
本研究では EMT 能を有する可能性が高いセツキシマブ耐性腫瘍の癌間質・間葉系細胞に着目し、新たな治療標的の探索や特異的分子標的治療薬開発の基盤となる研究を行う。

- (1) セツキシマブ耐性腫瘍を用いた EMT 関連癌間質細胞特異的マーカーの探索および発現解析
- (2) CD44v と新規間質マーカーによる標準治療耐性機構の解明
- (3) CD44v と新規間質マーカーをターゲットとした薬剤の探索

4. 研究成果

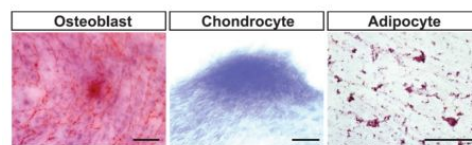
- (1) セツキシマブ耐性腫瘍を用いた EMT 関連癌間質細胞特異的マーカーの探索および発現解析

セツキシマブ投与後のヒト臨床検体において、間葉細胞の培養方法の確立に成功した。これは舌に生じたセツキシマブ投与後に再発をきたした希少癌であり超難治性低分化扁平上皮癌の亜型である紡錘細胞癌(Spindle Cell Carcinoma: SpCC)より樹立したものである。この臨床サンプルより、コラゲナーゼ処理後、フローサイトメーターを用いて細胞表面マーカーの解析を実施した。上皮マーカー：CD326 (Epithelial cell adhesion molecule; EpCAM) と、間葉マーカー：CD140a (Platelet-Derived Growth Factor Receptor alpha; PDGFR) を用いて解析を実施した。EpCAM 陽性細胞、および PDGFR 陽性細胞中のいずれにおいても EGFR 陽性細胞が存在したが、それらはそれぞれ 10% 台の陽性率であった。過去の報告では頭頸部扁平上皮癌における EGFR 陽性率は 80-90%とされており、本結果はセツキシマブ耐性の性質を保持した何かしらの腫瘍関連細胞、特に異常増殖能を示す幹細胞性質を強く保持している細胞が存在する可能性が考えられた。EpCAM 陽性細胞/PDGFR 陽性細胞のいずれにおいてもがん幹細胞マーカーCD44v が存在することが確認できた。



(2) CD44v と新規間質マーカーによる標準治療耐性機構の解明

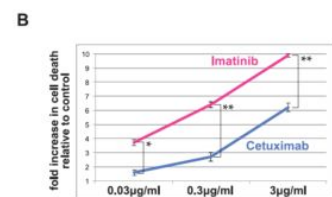
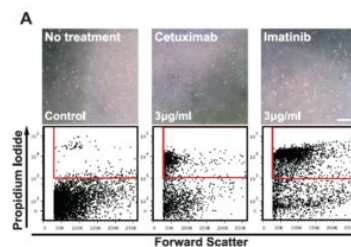
樹立した SpCC の細胞株の機能解析を行った結果、間葉細胞培養条件で著明な増殖能を示した。また、培養によって得られた間葉細胞が幹細胞性質を保持しているかを確認するため、コロニー形成能や倍加時間、および遊走能を解析したところ、いずれもその特徴を示した。また、間葉系幹細胞の特徴である骨・軟骨・脂肪への分化能を示した。つまり、この SpCC は間葉系幹細胞の特徴を有するため、従来の抗がん剤に抵抗性を示す可能性が示唆された。



紡錘細胞癌の間葉細胞の骨・軟骨・脂肪への分化能

(3) CD44v と新規間質マーカーをターゲットとした薬剤の探索

セツキシマブ投与後に再発をきたした SpCC に対して *in vitro* において薬剤感受性試験を行ったところ、従来の頭頸部領域適応薬剤の代表である EGFR 阻害薬であるセツキシマブには抵抗性を示し、PDGFR 阻害薬であるイマチニブ投与で高い細胞致死効果を得た。イマチニブは消化管間質腫瘍に用いられる薬剤であるが、臓器特異性の概念を超えた間質を主体とする腫瘍に効果を示したのは非常に興味深い点である。



紡錘細胞癌に対するイマチニブの治療効果

以上のように、われわれは SpCC の検体を用いて間質特異的細胞表面マーカーやその細胞特性評価を行い、病理診断のみでは予測できない細胞の性質や機能を明らかにしてきた。その上で、効果的薬剤が定まっていない SpCC に対するイマチニブによる新規治療の可能性を見出した (Ouchi, Morikawa, Yoshikawa, Asoda, et al. Journal of Dental Research 2018)。

また、SpCC は扁平上皮癌の亜型の 1 つであるが、間葉系細胞、特に高い増殖能を保持した間葉系幹細胞から構成されることを明らかにした。しかしながら、樹立した SpCC 由来間葉細胞が生体内において単独で悪性度を示すのか、正常・腫瘍上皮細胞と何らかの相互作用により悪性度を維持しているかどうかはまだ明らかにされていないため、現在さらなる解析を進めているところである。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Ouchi T, **Morikawa S**, Shibata S, Takahashi M, **Yoshikawa M**, Soma T, Miyashita H, Muraoka W, Kameyama K, Kawana H, Arima Y, Saya H, Okano H, Nakagawa T, **Asoda S**. Recurrent Spindle Cell Carcinoma Shows Features of Mesenchymal Stem Cells. Journal of Dental Research. 査読有 2018 Jul;97(7):779-786. doi:

10.1177/0022034518759278.

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：吉川 桃子

ローマ字氏名：YOSHIKAWA, Momoko

所属研究機関名：慶應義塾大学

部局名：医学部

職名：研究員

研究者番号 (8 桁): 50570967

研究分担者氏名：森川 暁

ローマ字氏名：MORIKAWA, Satoru

所属研究機関名：慶應義塾大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号 (8 桁): 00424169