

令和 3 年 6 月 28 日現在

機関番号：81303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2020

課題番号：17K11414

研究課題名（和文）下咽頭がん増殖制御因子CDKN1CのCD271による制御機構の解明

研究課題名（英文）Role of CDKN1C in hypopharyngeal cancer

研究代表者

今井 隆之（Imai, Takayuki）

地方独立行政法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター（研究所）・がん幹細胞研究部・特任研究員

研究者番号：80408583

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：頭頸部がんは、近年罹患率の上昇が認められている極めて悪性度の高いがんである。私たちは、下咽頭癌におけるCD271-CDKN1C経路を探索する中で、これを治療標的とするために抗CD271抗体を作成した。作成した抗CD271抗体は、ADCC活性を持ち、*in vivo*で腫瘍縮小効果が得られた。これらの結果から、CD271を標的とした抗体治療が可能であることが実証できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

私たちは頭頸部がんの新規治療法確立のために、がん幹細胞マーカーであるCD271に対する抗体を作成し、治療できるか検討した。その結果、担癌マウスにおいて抗体投与群では腫瘍縮小効果を得られた。今後はさらに改善を行い、実用化を目指す。

研究成果の概要（英文）：Head and neck cancer is a common cancer worldwide and its incidence is slowly increasing in Japan. Previously we investigated the CD271-CDKN1C pathway in hypopharyngeal cancer, and in this study we newly established an anti-CD271 antibody for treatment. The antibody exerts ADCC activity and shows a tumor-reducing effect *in vivo*. These results demonstrate the feasibility of antibody treatment targeting CD271.

研究分野：腫瘍学

キーワード：頭頸部がん

## 1. 研究開始当初の背景

頭頸部がんは、近年罹患率の上昇が認められている極めて悪性度の高いがんである。診断時既に進行がん(ステージ、)である症例が60%を占め、シスプラチン・5-FUを用いた化学放射線療法でも治療効果の改善に乏しい。近年、セツキシマブが頭頸部がん治療に認可されたが、満足のいく奏功率は得られておらず、頭頸部がん特異的な標的分子の探索は必須である。

申請者らは、頭頸部がんの中でも予後・QOLの悪い下咽頭がんに焦点を当て、有効な治療標的となり得る増殖因子受容体のスクリーニングを行ってきた。下咽頭がん臨床検体を用いて免疫不全マウスへの腫瘍形成能を検討した結果、神経成長因子(NGF)の受容体であるCD271陽性細胞の造腫瘍能が高いことが判明した。さらに、CD271の発現は患者予後とも相関しており(図1)、CD271は下咽頭がん造腫瘍能マーカーであることを世界に先駆けて見出した(PLOS ONE (2013)、頭頸部癌基礎研究会優秀英語論文に選出(2014))。

引き続き申請者らは、CD271が下咽頭がんの悪性化に寄与する可能性を検討した。下咽頭がん細胞株のCD271ノックダウンにより、RhoAを介した細胞遊走能が減少することが確認された。さらに、*in vitro*における増殖・マウスにおける造腫瘍能はいずれもほぼ完全に失われた。細胞周期を解析すると、CD271ノックダウン細胞は大部分がG0期で停止していた。増殖制御の分子機序に着目し、ノックダウン細胞における下流増殖シグナル解析を行ったところ、Akt・NFκB・ERKの変動は軽微であった。このことから、申請者は既知の増殖シグナル以外の分子が下咽頭がんの増殖を制御すると考え、マイクロアレイによる網羅的解析を行った。その結果、G0期(静止期)維持に重要な分子であり、がん抑制遺伝子として知られるCDKN1Cが著明に増加していた(図3)。さらに、CD271抑制によるG0期停止がCDKN1Cのノックダウンにより解除されることが判明した。以上の結果から、下咽頭がんの増殖はCD271-CDKN1Cのシグナル経路にほぼ依存しており、この経路は有望な治療標的の足りえるところと考えられた(Scientific Reports (2016))。

治療標的とするために、まず抗CD271抗体を作成して、抗体治療を試みることにした。これによって、そもそも標的治療が可能なのかどうかを実証する必要があると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、CD271を標的とした治療が可能かどうかを実証するために、担癌マウスを用いて抗体治療が可能かどうかを検討する。

## 3. 研究の方法

まず、CD271抗原をバキュロウイルスの系を用いて単離精製した。マウスに免疫し、SP2/0細胞と融合させハイブリドーマを作成した。下咽頭癌細胞株HPCM2細胞に強制発現させたCD271に対する反応性をもってスクリーニングし、複数のクローンを得た。得られたクローンのうち、親和性の高いものを選び、ヒト化を行った。同ヒト化抗体を用いて、まず特異性をさまざまなアプリケーションで確認し、その後、ADCC (antibody-dependent cellular cytotoxicity) 活性を*in vitro/in vivo*で検討した。*In vitro* ADCC活性は、effector細胞としてヒトNK細胞を用いた。*In vivo* ADCC活性は、NOGマウス皮下にtarget細胞を移植した後に、抗体を腹腔投与し、NK細胞あるいはヒト末梢血単核球(PBMC)細胞を経静脈的あるいは腫瘍床に移植した。

## 4. 研究成果

得られたクローンは、Kd値=1.697×10<sup>-9</sup>Mであり、良好な親和性だと考えられた。認識ドメインはCRD1 (cysteine-rich domain 1)であり、所有している市販抗体5種類いずれとも違う認識部位であった。この抗体は、flow cytometry, western blotting, ELISAに使用可能であった。特にflow cytometryでは、内因性のCD271タンパクをよく認識した。*In vitro*におけるADCC活性を検討したところ、Effector:Target ratio依存性に、また抗体濃度依存性にADCC活性が増強した。CDC活性はみられなかった。*In vivo*でのADCC活性を検討したところ、CD271強制発現SP2/0細胞株・メラノーマ細胞株・下咽頭癌細胞株において、抗体投与群で有意に腫瘍体積が縮小した。治療後の腫瘍を免疫染色してみると、治療群ではCD271陽性細胞が明らかに減少していた。未治療群ではCD271陽性細胞は約9%であり、比較的少数の集団であるCD271陽性細胞を標的としても、腫瘍全体の縮小効果が得られることが判明した。

以上のことから、CD271陽性癌幹細胞を標的とした抗体治療が可能であることがわかった。今

後は、CD271 の詳細な下流経路を同定して、より有効な治療標的を探索する。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Imai Takayuki, Kurosawa Koreyuki, Yamaguchi Kayo, Satake Naoko, Asada Yukinori, Matsumoto Ko, Morita Sinkichi, Saijo Satoshi, Aoi Jiro, Fujii Keitaro, Kishimoto Kazuhiro, Goto Takahiro, Matsuura Kazuto	4. 巻 138
2. 論文標題 Enhanced Recovery After Surgery program with dexamethasone administration for major head and neck surgery with free tissue transfer reconstruction: initial institutional experience	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Acta Oto-Laryngologica	6. 最初と最後の頁 664 ~ 669
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/00016489.2018.1429651	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 Imai Takayuki, Ito Shigemi, Oikawa Tomoyuki, Asada Yukinori, Matsumoto Ko, Miyazaki Takefumi, Yamazaki Tomoko, Satoh Ikuro, Noguchi Tetsuya, Matsuura Kazuto	4. 巻 46
2. 論文標題 Risk factors for cervical lymph node metastasis in endoscopically resected superficial hypopharyngeal cancers	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Auris Nasus Larynx	6. 最初と最後の頁 424 ~ 430
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.anl.2018.09.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Imai Takayuki, Kurosawa Koreyuki, Yamaguchi Kayo, Satake Naoko, Asada Yukinori, Matsumoto Ko, Morita Sinkichi, Saijo Satoshi, Aoi Jiro, Fujii Keitaro, Kishimoto Kazuhiro, Goto Takahiro, Matsuura Kazuto	4. 巻 Epub ahead of print
2. 論文標題 Enhanced Recovery After Surgery program with dexamethasone administration for major head and neck surgery with free tissue transfer reconstruction: initial institutional experience	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Acta Otolaryngol.	6. 最初と最後の頁 1 ~ 6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/00016489.2018.1429651	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Asada Yukinori, Kurosawa Koreyuki, Matsumoto Ko, Goto Takahiro, Katoh Kengo, Imai Takayuki, Saijo Shigeru, Matsuura Kazuto	4. 巻 45
2. 論文標題 Laryngeal function-preserving operation for T4a laryngeal cancer with vocal cord paralysis ? A case report	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Auris Nasus Larynx.	6. 最初と最後の頁 194 ~ 199
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.anl.2017.03.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kurosawa, K. Asada, Y. Matsumoto, K. Imai, T. Matsuura, K. Goto, T.	4. 巻 5
2. 論文標題 A Novel Funnel-Shaped Flap for Reconstruction Surgery after Total Laryngopharyngectomy with Total Glossectomy	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Plast Reconstr Surg Glob Open	6. 最初と最後の頁 e1504
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/GOX.0000000000001504.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 今井隆之, 望月麻衣, 森田真吉, 西條聡, 玉井恵一, 松浦一登	4. 巻 43
2. 論文標題 下咽頭癌における癌幹細胞表面マーカーの同定とその機能解析	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 頭頸部癌	6. 最初と最後の頁 339-344
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 今井隆之, 松浦一登	4. 巻 34(4)
2. 論文標題 唾液腺腫瘍の治療方針	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 JHONS	6. 最初と最後の頁 437-440
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Morita Shinkichi, Mochizuki Mai, Wada Kouichi, Shibuya Rie, Nakamura Mao, Yamaguchi Kazunori, Yamazaki Tomoko, Imai Takayuki, Asada Yukinori, Matsuura Kazuto, Sugamura Kazuo, Katori Yukio, Satoh Kennichi, Tamai Keiichi	4. 巻 461
2. 論文標題 Humanized anti-CD271 monoclonal antibody exerts an anti-tumor effect by depleting cancer stem cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Letters	6. 最初と最後の頁 144 ~ 152
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.canlet.2019.07.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	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
研究 分 担 者	望月 麻衣  (Mochizuki Mai)  (40726303)	地方独立行政法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター (研究所)・がん幹細胞研究部・研究員   (81303)	

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