

令和 3 年 6 月 6 日現在

機関番号：17401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K24125

研究課題名(和文) 口腔扁平上皮癌のOsteopontin発現と放射線耐性に関する検討

研究課題名(英文) Osteopontin-CD44 pathway confers radioresistance on oral squamous cell carcinoma cells.

研究代表者

中嶋 光 (Nakashima, Hikaru)

熊本大学・病院・非常勤診療医師

研究者番号：20849103

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：Osteopontin(OPN)が口腔扁平上皮癌(OSCC)組織中で化学放射線療法に対する耐性機構獲得に寄与している可能性を示した。またOSCC培養細胞にOPN添加した放射線照射の感受性試験を行い、OPN添加が放射線耐性を向上させること、添加したOPNがCD44の経路を介してROSを制御しOSCC細胞の放射線耐性獲得に寄与していること、OPNがCD44と結合し、さらにシスチントランスポーターのサブユニットであるxCTと結合することでシスチンの取り込みを活性化し、GSHの生成を促進すること示した。これによりxCT阻害薬であるスファサラジンがOSCCにおいて有効な治療薬となる可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

OSCCにおける放射線治療は有効な治療法の一つだが、放射線抵抗性を示す細胞の存在が患者予後を極めて不良にするため、そのメカニズム解明は急務である。今回われわれの研究成果によって、OSCCにおけるOPN-CD44経路を介した放射線耐性機構の解明によって、新たな治療法の開発に繋がる可能性を示した。またその候補としてxCT阻害薬スファサラジンが挙がるが、同剤は関節リウマチなどに既に承認され高い治療効果を示しており、ドラッグリポジショニングの観点からも臨床応用に期待ができる。したがって同剤を併用した治療法開発は放射線抵抗性OSCCを有する患者へ有望かつ創造性に富む治療法の候補となりうる。

研究成果の概要(英文)：The frequency of OPN-high patients was significantly higher among the cases who showed poor pathological response to preoperative chemoradiotherapy. OPN play an important role in radioresistance of OSCC cells. Therefore, we examined the mechanism of radioresistance via OPN signaling making use of inhibition representative receptors. Our results showed that radioresistance was canceled by blockade of CD44, and this ability was brought by reducing DNA damage or by defending from ROS. And GSH concentration was significantly increased in OSCC cells after irradiation, which were added OPN. Furthermore, addition of OPN promoted complex formation of CD44-xCT after irradiation. Thus, it is also suggested that targeting OPN signaling could be a new approach (Sulfasalazine: xCT inhibitor) to overcome radioresistance of OSCC patients.

研究分野：口腔扁平上皮癌

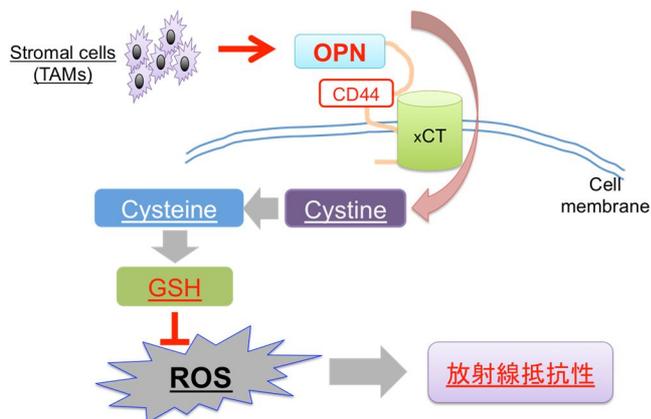
キーワード：Osteopontin 口腔扁平上皮癌 放射線耐性 CD44

1. 研究開始当初の背景

OSCC において、放射線治療は重要な治療戦略の一つであるが、放射線治療へ抵抗性を示す癌の存在が患者の生命予後を不良としている。放射線治療は放射線と水が反応して生じる活性酸素 (Reactive oxygen species : ROS) により DNA 損傷を引き起こし癌細胞を効果的に死滅させるが(Crit. Rev. Oncol. Hematol. 2013)、申請者らはこれまで、**OSCC 細胞が抗酸化経路を活性化することで ROS レベルを低下させ、放射線耐性能を獲得することを示してきた。**

また近年、癌幹細胞の悪性形質獲得・維持には腫瘍細胞自身の形質変化だけでなく、腫瘍細胞を取り巻く腫瘍微小環境が重要であることが見出され、**腫瘍微小環境の理解が難治性癌克服に不可欠**であることが明らかとなってきた(Nat Rev Cancer 2015)。これらの知見から、**高度悪性形質を有する OSCC の成立・維持に関わる腫瘍微小環境調節の分子メカニズムの解明は OSCC の予後改善に重要であると考えられる。**

OPN は分泌型のリン酸化糖タンパクで、代表的な腫瘍微小環境の調整に関わる分子の一つで、ヘパリン結合ドメインを介して CD44 と結合し様々な生理活性を示す(Matrix Biology. 2014)。過去の報告で **CD44 が xCT と結合し、グルタチオン(GSH)生成を促進することで ROS の蓄積を抑制し、酸化ストレスに対する抵抗性を示す**ことが分かっている(Cancer cell. 2011)。つまり、**OPN が CD44 を介した ROS 産生制御を通じて放射線抵抗性に寄与している可能性が考えられる。**以上の知見から、OSCC において **OPN-CD44 経路が GSH 生成を促進させ ROS を抑制的に制御している可能性があり、OSCC の放射線抵抗性に重要な役割を果たしている可能性があることが示唆された。**また、本経路を阻害することで、**放射線治療に対して抵抗性を示す OSCC 患者の治療効果改善及び予後向上につながる可能性**があり、今後更なる検討が必要であると考えた。



2. 研究の目的

上述のような学術的背景のもとに、本研究では、**放射線抵抗性を示す OSCC を標的とした新たな治療法を開発すること、及び OPN-CD44 経路が OSCC の放射線抵抗性に与える生物学的影響を解明すること**を目的とする。現在 OSCC において OPN-CD44 経路を標的とした治療法開発の研究は皆無である。そのため OPN が CD44 を介して放射線抵抗性を獲得すると仮定すると、本経路を標的とする新規治療法の開発は意義深い。さらに従来の放射線治療に **OPN-CD44 シグナルを標的とする治療法を併用することは OSCC 患者の放射線耐性を克服するための新たなアプローチとなる可能性**を示唆している。また xCT 阻害薬スルファサラジンは関節リウマチなどに既に承認されており、高い治療効果を示している。従ってスルファサラジンを用いた治療実験においてその有用性が示された場合、**同剤を併用した治療法開発は放射線抵抗性 OSCC を有する患者へ有望かつ創造性に富む治療法の候補となりうる。**

3. 研究の方法

・OSCCにおけるOPN発現状況及びOPN-CD44経路を介する放射線抵抗性機構の検討

本研究では腫瘍組織中のOPN発現がOSCC患者の治療効果を反映するか検討するため、術前化学放射線療法施行後のOSCC患者検体を用いて、OPNの免疫組織学的染色で発現解析を行い、各種臨床項目との関連性について統計学的に解析した。またOSCC培養細胞を用いて、放射線照射時に recombinant OPN (rOPN)およびCD44中和抗体を添加し、OSCC細胞にどのような形質変化が起こるかを、ELISA法、ウエスタンブロッティング法、放射線感受性試験などを用いて検討した。これにより **OPNによるCD44を介したROS制御が放射線抵抗性メカニズムに重要な役割を果たしている可能性を検討した。**

4. 研究成果

本研究で、我々は意義のある2つの知見を明らかにした。**一つ目は、腫瘍組織にけるOPN発現がOSCC患者の化学放射線治療に対する抵抗性と相関し、治療効果予測のバイオマーカーとなりうる点である。二つ目はOPNの供給源が腫瘍微小環境であり、分泌されたOPNはOSCCに酸化ストレス回避を介して放射線抵抗性をもたらす点である。**OPNと放射線耐性についての知見についての報告は少なく、特にOSCCにおける報告は散見されないため、OSCCにおいてOPNの発現について報告した今回の検討は有用なバイオマーカーとしてだけでなく新規治療法開発においても意義深いものであると言える。

OPNは多くの癌種において悪性形質獲得に寄与している。Albeldaらは悪性黒色種においてOPNが細胞遊走を促進し浸潤転移に関与していることを (*Cancer Res.* 1990)、グリオーマにおいてOPNが幹細胞性の獲得をLamourらが (*Int. J. Cancer.* 2015)、放射線耐性に寄与していることをHenryらが (*Oncotarget.* 2016) 報告している。今回の我々の結果からも腫瘍組織におけるOPN高発現と放射線化学療法の治療効果と相関しており (表1)、過去の報告と一致していた。しかしながらOPN発現と患者予後との間に有意差は認められなかった。Bramwelらは乳癌において (*Clin. Cancer Res.* 2006)、Rudらは非小細胞肺癌においてOPN高発現が不良な患者予後と相関していることを報告している (*BMC Cancer.* 2013)が、Limらの頭頸部扁平上皮癌の報告ではOPN発現と予後との間に有意な相関関係は認められなかったことを報告している (*Clin. Cancer Res.* 2012)。まとめるとOPN発現が癌種によっては必ずしも不良な患者予後と相関しないことを示しており、OSCCを含む頭頸部扁平上皮癌でその傾向が見られたことも、今回の結果を支持するものであった。また今回の患者群は術前CRT施行後に根治的切除を行っているため、OPN発現以外にも多くの因子が予後に関わっていると考えられるため、OPN発現のみでの議論は難しい側面があると言える。

表1. Correlation between the OPN expression and clinicopathological factors in 75 OSCC patients

Characteristics	Total	Tumor OPN expression			Stromal OPN expression		
		High	Low	p-value	High	Low	p-value
Pathological response							
Grade ≤ IIb (poor ~ partial response)	18	15(83.3)	3(16.7)	0.003**	16(88.9)	2(12.1)	0.004**
Grade ≥ III (complete response)	57	25(43.9)	32(56.1)		37(64.9)	20(35.1)	

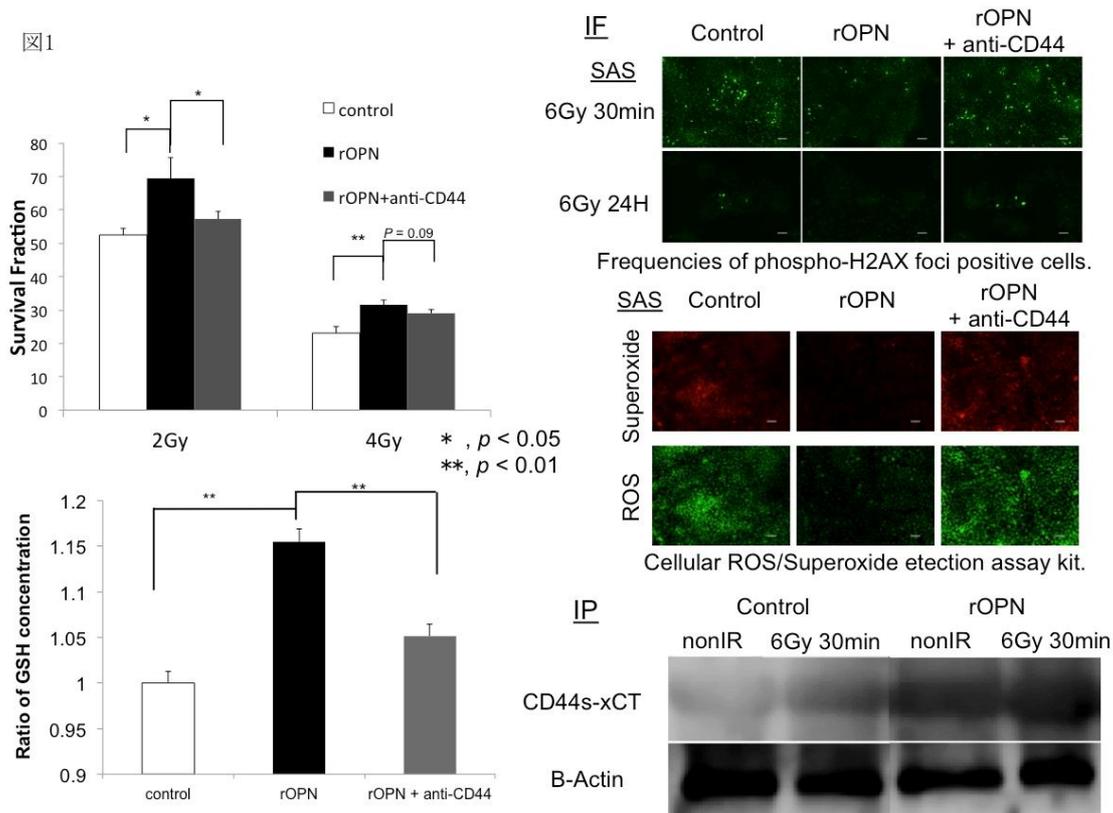
Abbreviation: OSCC oral squamous cell carcinoma.

The chi-square test was used to examine the relationships between OPN expression and clinicopathologic factors. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

また in vitro においてOPNのOSCC細胞株における発現比較を行った検討では、OSCC細胞株で細胞中のOPN発現並びにOPNの代表的な受容体の発現に差がなく、すべての細胞で培養上清へのOPNの分泌を認めなかった。OSCC細胞株においてオートクラインによるOPNの供給の経路は成立しない可能性が示された。さらに腫瘍組織及び細胞株において、腫瘍微小環境、特にTAMsがOPNの分泌を行っている可能性を示した。これらの結果からOPNの供給源を腫瘍細胞よりも間質組織、特にTAMsを含めた腫瘍微小環境が担っている可能性を示しており、直腸結

腸癌において、TAMsによって分泌されたOPNが腫瘍細胞に幹細胞性を付与するというRaoらの報告 (*Clin. Cancer Res.* 2013)と一致していた。

またOSCC細胞株にOPN添加を行うことで放射線抵抗性を示し、OPNの代表的な受容体を阻害することで、獲得した耐性能をキャンセルできることを示した。これらの反応はOPN添加が、ROSやスーパーオキシドを除去することで酸化ストレスを減弱させ、結果的にDNA損傷が回避されるため放射線耐性を発揮することを示唆している。また放射線照射後のOSCC細胞株でOPN添加を行った細胞ではGSH濃度が有意に上昇しており(図1)、この結果はCD44がxCTと複合体を形成し、GSHを活性化させることでROSの蓄積を抑制するというIshio *ら* (*Cancer cell.* 2011)が報告した一連の経路を介した放射線抵抗メカニズムを支持するものであり、OPNがCD44と複合体を形成することが、反応のトリガーとなりうる可能性が示された。



今回の我々の結果は、術前の生検標本のOPN発現が術前CRTの治療効果を反映しており、OSCC患者の治療決定の有用なバイオマーカーとなりうる可能性を示した。またOPN添加によって得られた放射線耐性能を、CD44およびインテグリンの阻害によりキャンセルされることからOPNシグナリングを標的とすることがOSCC患者の放射線耐性を克服する新たなアプローチになる可能性も示唆された。しかしながら新型コロナウイルス感染拡大による社会情勢のため、予定していた実験計画の遂行に影響がありin vivoの実験系で十分な成果を出すことができなかった。今後さらなる研究によって、従来の放射線治療に加えてOPNシグナリングを標的とした併用療法の効果を確認する必要があると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中嶋 光
2. 発表標題 OPNはCD44抗酸化経路を介して口腔扁平上皮癌に放射線耐性を賦与する
3. 学会等名 第64回日本口腔外科会総会
4. 発表年 2019年～2020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
---------------------------	-----------------------	----

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