

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 5 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462930

研究課題名(和文) 機能的癌幹細胞マーカーCD44vの発現に基づく口腔扁平上皮癌の治療感受性評価

研究課題名(英文) Treatment sensitivity evaluation of oral squamous cell carcinoma based on the expression of a functional cancer stem cell marker CD44v

研究代表者

筋生田 整治 (Asoda, Seiji)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：80296706

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、CD44vの発現やグルタチオン量が臨床において有用であるかを確認するために、セツキシマブ耐性口腔扁平上皮癌細胞を樹立し、親株との性質の違いについて主に細胞内代謝に着目して検討した。

その結果、セツキシマブ耐性細胞では、抗酸化物質グルタチオンの産生を抑えるxCT阻害剤スルファサラジンに対する感受性が高まることが明らかとなった。このことから、スルファサラジンは、セツキシマブ耐性口腔扁平上皮癌細胞に対して高い効果を発揮すると考えられ、セツキシマブ不応症例に対する治療法の一つとなる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of the present study was to confirm the benefit of the appearance of CD44v and the amount of glutathione in clinical use, focusing on the intracellular metabolism, the nature of the parental strain was investigated by incubating cetuximab-resistant oral squamous carcinoma cells. According to the study, the cetuximab resistant cells sensitivity to xCT inhibitor sulfasalazine suppressing the production of antioxidants glutathione was increased. From this fact, sulfasalazine seems to be beneficial for cetuximab-resistant oral squamous carcinoma cells and might be considered as one of the treatments for cetuximab resistant cases.

研究分野：口腔がん

キーワード：口腔扁平上皮癌 CD44

1. 研究開始当初の背景

従来の口腔癌治療は、手術療法、化学療法、放射線療法の三者を単独あるいは併用することによって行われてきた。その中でも、手術療法は物理的に腫瘍組織を除去できることから、口腔癌診療ガイドラインにおいても主たる治療法として位置づけられている。一方で口腔癌の治療では、咀嚼、嚥下、構音機能の保持や審美的な側面から、臓器温存が強く求められる。近年、動注化学療法と放射線療法の併用により治療成績が著しく向上し、手術回避可能な症例が増えてきた。この方法の最大の利点は組織欠損を伴わないことで、患者の機能的、審美的側面はもとより心理的な面でも多大なアドバンテージを有し、当科でも積極的に実施している。しかしながら、この療法では再発時に有効な手段が少なく、すでに高線量の放射線治療が行われている場合、再度の照射や救済手術は難しいことが多い。口腔癌治療において、従来の臨床病理的アプローチのみでは十分な予後判定は困難であるが、術前に化学療法や放射線療法の感受性が判定できれば、感受性の低い腫瘍には手術療法を適用し、感受性の高い腫瘍には臓器温存可能な化学放射線療法を適用するといった個別化治療が可能となる。

そこでわれわれは、口腔癌において分子生物学的アプローチによる悪性度判定を実現させるために、上皮間葉転換および幹細胞様性質に着目してトランスレショナルリサーチを行うこととした。

2. 研究の目的

幹細胞様性質 (stem cell-like characteristics) および上皮間葉転換 (epithelial mesenchymal transition: EMT) 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。われわれは口腔扁平上皮癌において、これら2つの現象に関わる CD44v の機能的役割の解析を進めてきており、in vitro において、CD44v の発現量とそれに伴うグルタチオン (GSH) 合成量の違いで抗癌剤感受性が変わることを見出した。

今回は、これら CD44v の発現やグルタチオン量が臨床において有用であるかを確認するために、既に実臨床で用いられている抗 EGFR 抗体薬セツキシマブに着目した。セツキシマブの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ことが考えられるが、これに伴う癌細胞の性質変化についてはいまだ説明されていない。

そこで本研究では、セツキシマブ耐性口腔扁平上皮癌細胞を樹立し、親株との性質の違いについて主に細胞内代謝に着目して検討することにより、治療標的の探索を行うこととした。

3. 研究の方法

口腔癌細胞株と担癌マウスモデルを用いて、Western blotting、免疫染色、薬剤感受性試験を行い解析した。

(1) セツキシマブ耐性細胞の樹立。

分化型扁平上皮癌を形成する HSC-2 細胞 (口腔扁平上皮癌細胞) をマウスの背部皮下に移植 (1×10⁶ 個) し、セツキシマブを4日に1回 500 µg 腹腔投与し、4週間後に解剖した。同様に HSC-3・HSC-4 細胞 (口腔扁平上皮癌細胞) にてセツキシマブ耐性細胞を樹立した。親株と耐性細胞をマウスの背部皮下に移植 (1×10⁶ 個) し、できた腫瘍組織を観察した。

(2) 遺伝子発現解析・メタボローム解析から、癌幹細胞特異的なマーカーや代謝の違いを検索。

HSC-3・HSC-4 細胞の親株とセツキシマブ耐性細胞を用いてメタボローム解析を行った。

(3) HSC-3・HSC-4 細胞の親株とセツキシマブ耐性細胞における BSO 感受性と ROS の測定。

(4) HSC-3・HSC-4 細胞の親株とセツキシマブ耐性細胞におけるスルファサラジン感受性の測定。

4. 研究成果

(1) セツキシマブ治療によって、腫瘍は著明に縮小した。治療後に残存した腫瘍では、分化マーカーである Involucrin 陽性の腫瘍細胞よりも、癌幹細胞マーカー CD44v を高発現する未分化な腫瘍細胞が多く含まれていることが分かった (図1)。

セツキシマブ耐性細胞によって形成された皮下腫瘍は、主に CD44v 陽性の未分化な腫瘍細胞から成ることから、セツキシマブ耐性細胞は親株よりも、未分化性を維持する能力が高いことが示唆された。

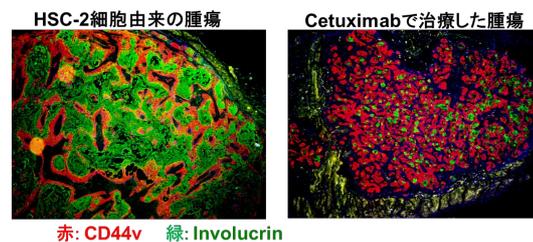


図1

(2) セツキシマブ耐性細胞は親株と比べて、TCA 回路の代謝物質を多く含むことからミトコンドリアにおける酸化的リン酸化を使用する傾向が有ることが分かった。

(3) 酸化物質グルタチオンの合成阻害剤である BSO は、セツキシマブ耐性細胞において高い増殖抑制効果を示し、著明な細胞内 ROS の蓄積を誘導する。このことから、セツキシマブ耐性細胞の維持には、親株と比較し

て、よりグルタチオンを合成する必要があることが分かった。

(4) セツキシマブ耐性細胞は、スルファサラジン感受性が亢進しており、グルタチオン合成を促進するシスチントランスポーター xCT に対しても依存性が高くなることが分かった。

(5) 結論

メタボローム解析により、EGFR を高発現している親株の口腔扁平上皮癌細胞では好氣的解糖経路が活性化し、酸化リン酸化経路を抑制することで活性酸素の産生を抑えていることがわかった。反対に、EGFR 発現の低いセツキシマブ耐性細胞ではミトコンドリアにおける酸化リン酸化の活性が上昇し、活性酸素の産生が亢進することが示された。このため、セツキシマブ耐性細胞では、抗酸化物質グルタチオンの産生を抑える xCT 阻害剤スルファサラジンに対する感受性が高まることが明らかとなった(図2)。

このことから、スルファサラジンは、セツキシマブ耐性口腔扁平上皮癌細胞に対して高い効果を発揮すると考えられ、セツキシマブ不応症例に対する治療法の一つとなる可能性が示唆された。

現在、国内では EGFR 阻害薬セツキシマブおよびスルファサラジンの臨床試験が開始されている。今後は、それぞれの薬剤に対する口腔癌細胞の感受性に関わるバイオマーカーの探索を行うとともに、口腔扁平上皮癌を対象にセツキシマブ・スルファサラジン併用療法の臨床試験を行っていきたいと考えている。

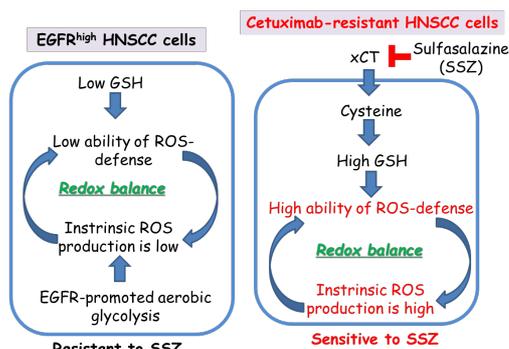


図2

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

(1) Yoshikawa M, Tsuchihashi K, Ishimoto T, Yae T, Motohara T, Sugihara E, Onishi N, Masuko T, Yoshizawa K, Kawashiri S, Mukai M, Asoda S, Kawana H, Nakagawa T, Saya H, Nagano O. xCT Inhibition Depletes CD44v-Expressing Tumor Cells That Are Resistant to EGFR-Targeted Therapy in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Res*, 査読有, 73(6): 2013, 1855-1866

DOI:10.1158/0008-5472.CAN-12-3609-T

〔学会発表〕(計3件)

(1) 佐谷秀行. 口腔扁平上皮癌を含めたがん幹細胞について基礎からトレンドまで. (公社)日本口腔外科学会第45回教育研究会. 2015.02.27. 鶴見大学記念館(神奈川県横浜市).

(2) 吉川桃子, 筋生田整治, 森川暁, 宮下英高, 臼田慎, 河奈裕正, 中川種昭, 佐谷秀行, 永野修. セツキシマブ耐性口腔扁平上皮癌細胞に対する治療の可能性. 第33回日本口腔腫瘍学会総会. 2015.1.30. 奈良県新公会堂(奈良県奈良市).

(3) 吉川桃子, 筋生田整治, 河奈裕正, 中川種昭, 佐谷秀行. xCT 標的治療は CD44v 陽性口腔扁平上皮癌細胞を選択的に死滅させる. 第58回(公社)日本口腔外科学会総会. 2013.10.11. 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡(福岡県福岡市).

(4) Yoshikawa M, Nagano O, Tsuchihashi K, Asoda S, Kawana H, Nakagawa T, Saya H. xCT inhibition depletes CD44v-expressing squamous cell carcinoma cells that are resistant to EGFR-targeted therapy. 第72回日本癌学会学術総会. 2013.10.3. 横浜国際平和会議場/パシフィコ横浜(神奈川県横浜市).

〔図書〕(計4件)

(1) 塚崎朝子, 筋生田整治. 講談社. 口腔がん. 慶應義塾大学病院の医師100人と学ぶ病気の予習帳. 2015.12.08. P.118-119

(2) 筋生田整治. 株式会社デンタルダイヤモンド社. 無痛な口腔がんの早期発見. 歯科の痛みを見極める 診断・治療50のQA. 2014.04.01. P.58-59.

(3) 筋生田整治, 中川種昭. 永末書店. 白血病性歯肉炎. ザ・ペリオドントロジー 第2版. 2014.03.18. P.240-241.

(4) 筋生田整治, 中川種昭. 永末書店. 良性腫瘍と悪性腫瘍との鑑別診断. ザ・ペリオドントロジー 第2版. 2014.03.18. P.238-239.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ

慶應義塾大学医学部歯科・口腔外科学教室

研究内容

<http://dent-os.med.keio.ac.jp/KEI0/classroom/research/index.html>

慶應義塾大学 医学部 先端医科学研究所 遺伝子制御研究部門 研究内容

http://www.genereg.jp/html/topics_report/topix_repo_010.html

6 . 研究組織

(1)研究代表者

筋生田 整治 (ASODA SEIJI)
慶應義塾大学・医学部・専任講師
研究者番号：80296706

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

佐谷 秀行 (SAYA HIDEYUKI)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号：80264282

栄長 泰明 (EINAGA YASUAKI)
慶應義塾大学・理工学部・教授
研究者番号：00322066

(4)研究協力者

吉川 桃子 (YOSHIKAWA MOMOKO)
慶應義塾大学・医学部・特任助教
研究者番号：50570967