

令和元年6月14日現在

機関番号：32650

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11734

研究課題名(和文) デスマogleインを標的とした選択的な口腔癌および口腔扁平苔癬治療モデルの開発

研究課題名(英文) Oral cancer treatment by targeted drug delivery system with an anti-desmoglein monoclonal antibody

研究代表者

河野 通良 (Kouno, Michiyoshi)

東京歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：30403182

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)：当初の口腔扁平上皮癌(OSCC)に対するデスマogleイン3(Dsg3)を標的とした選択的治療研究において、Dsg3とEGFR(epidermal growth factor receptor)の発現に相関を見いだしたことから、抗EGFR抗体セツキシマブの効果とDsg3発現との相関について検討した。セツキシマブおよび高カルシウム条件により、OSCC細胞株でDsg3の発現が上昇し、両者の共存により効果が増強されたことから、セツキシマブの効果は、Dsg3の発現上昇をともなう上皮細胞の分化誘導で説明できる可能性があり、高カルシウム条件がセツキシマブによる治療を増強する可能性を示し得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

過去に天疱瘡を対象として、上皮細胞でのDsg3とEGFRの相関について多くの研究報告がある。一方、形質転換した上皮細胞である口腔癌細胞においてそれらを研究した報告はなく、本研究成果は今後の研究発展に資する学術的意義を持つ。セツキシマブは我が国における口腔癌治療において広く使用されているが、その治療耐性が問題となる。これまでに耐性を克服する研究がなされているが、他の生物学的製剤との併用などで、経済性、安全性に対する懸念がある。本研究成果ではカルシウム併用という比較的安価で安全な手段で効果増強が望める可能性があり、口腔癌治療の発展に寄与する可能性があり社会的意義のあるものと思われる。

研究成果の概要(英文)：Desmoglein (DSG) 3 is overexpressed in oral squamous cell carcinoma (OSCC). Epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitor cetuximab is widely used for OSCC treatment. Several evidences suggest a correlation between DSG3 and EGFR in epidermal keratinocytes. Thus, we investigated the DSG3-EGFR interaction in OSCC and its effect on cetuximab treatment. Cells from metastatic lymph nodes of each patient expressed increased DSG3 and EGFR than cells from the primary tumor in the same patient. Cetuximab treatment increased DSG3 expression by up to 3.5-fold in 7 of the 11 cell lines. A high calcium concentration increased the expression of DSG3 and EGFR in a dose dependent manner. Strikingly, a high-calcium-associated DSG3 induction enhanced cetuximab efficacy by up to 23% increase in cetuximab-low-sensitive cell lines. Our findings also suggest a correlation between DSG3 and EGFR in OSCC, and this affects cetuximab treatment efficacy.

研究分野：皮膚科学

キーワード：口腔癌 デスマogleイン3 EGFR

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本研究では、口腔扁平上皮癌 (OSCC) においてデスモグレイン 3 (Dsg3) が高発現していることから、天疱瘡患者からクローニングされた病原性を持たない抗 Dsg3 抗体 Px44 と癌抑制分子 TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) をつなげた融合タンパク Px44TRAIL を作製し、口腔癌を対象とした選択的治療モデルの開発を目指してきた。これまでに 6 人の口腔癌患者の原発巣、転移リンパ節に由来する 12 種類の OSCC 細胞株を対象として *in vitro* での治療効果を調べ、Px44TRAIL が Dsg3 を発現している OSCC 細胞に対してのみ結合し治療効果を発揮することを証明した。その過程において、口腔癌患者の OSCC 細胞株において Dsg3 と EGFR (epidermal growth factor receptor) の発現が原発巣より転移リンパ節で高い傾向であること、抗 EGFR 抗体であるセツキシマブにより Dsg3 の発現上昇がみられることを見出し、さらに天疱瘡の病態において Dsg3 と EGFR との相関についての研究報告があることから、OSCC 細胞株における Dsg3 と EGFR との相関と、セツキシマブによる治療効果について検討を行った。

2. 研究の目的

本研究では、表皮細胞において Dsg3 と EGFR との相関が天疱瘡の病態に関与するのと同様に、形質転換した上皮細胞である口腔癌細胞においても Dsg3 と EGFR との相関がみられ、それが抗 EGFR 抗体であるセツキシマブの治療効果に関与するかを検討することを目的とした。

3. 研究の方法

4 人の口腔癌患者の原発巣と転移リンパ節から樹立した 8 種類の細胞株 (表) と 3 種類の確立された OSCC 細胞株 (HSC3, HSC4, SAS) における DSG3 と EGFR の相互作用について検討し、さらにその相互作用によるセツキシマブの治療効果に対する影響について検討した。まず、各細胞株の Dsg3 と EGFR の発現をリアルタイム PCR により調べ、細胞増殖能を WST-1 アッセイにより解析した。さらに Dsg3, EGFR のノックダウン及びセツキシマブ投与時の変化を調べた。

細胞株No.	年齢	性別	原発部位	原発巣	転移リンパ節
7	80	男	上顎歯肉	7P	7LY
17	69	女	上顎歯肉	17P	17LY
58	65	男	舌	58P	58LY
60	82	女	上下顎歯肉	60P	60LY

表: OSCC 患者細胞株のプロフィール

4 人の OSCC 患者の原発巣 (P) と転移リンパ節 (LY) から樹立された細胞株を示す。

4. 研究成果

まず、4 人の OSCC 患者細胞株において DSG3 と EGFR の発現をリアルタイム PCR にて調べたところ、全てにおいて、原発巣よりも転移リンパ節で DSG3 と EGFR の発現がともに高く、DSG3 を発現していない細胞株 (7P) では EGFR の発現も認められなかった (図 1)。

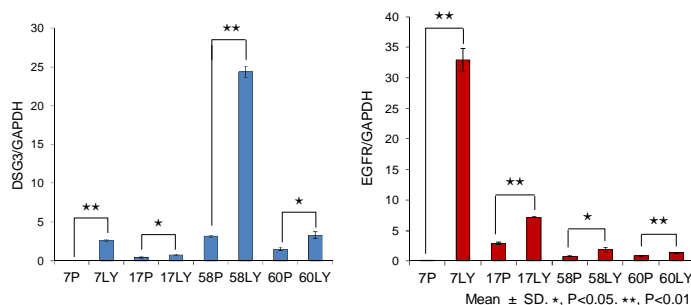


図 1: 原発巣とリンパ節の DSG3, EGFR 発現

4 人全てにおいて、原発巣 (P) よりも転移リンパ節 (LY) で DSG3 と EGFR とともに発現が高かった。

左: 各細胞株の DSG3 発現

右: 各細胞株の EGFR 発現

さらに、OSCC 患者細胞の EGFR 発現をノックダウンしたところ、control siRNA と比較し、8 種類中 5 種類で最大 50% DSG3 の発現が減少した。次にセツキシマブにより EGFR を阻害したところ、8 種類中 4 種類の OSCC 患者細胞株と HSC3、HSC4、SAS において DSG3 の発現が最大 3 倍上昇した。表皮細胞においては高カルシウム (Ca) 条件下で DSG3 の発現が上昇することが知られているため、OSCC 細胞を高カルシウム条件下で培養したところ DSG3 の発現上昇とともに EGFR 発現の上昇も認められた(図 2)。

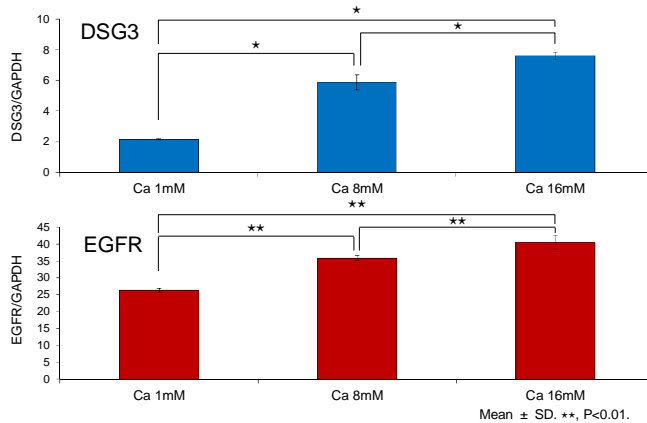


図 2 : Ca 投与時の DSG3 と EGFR の発現 (7LY)
 セツキシマブ耐性細胞 7LY では Ca 濃度依存性に DSG3 だけでなく EGFR も発現が上昇した。
 上 : Ca 1, 8, 16mM の条件下の DSG3 発現
 下 : Ca 1, 8, 16mM の条件下の EGFR 発現

以上の結果から OSCC において DSG3 と EGFR の発現に相関性があることが示唆され、セツキシマブにより DSG3 発現が上昇し、Ca により DSG3 と EGFR 発現が誘導されたことから、高 Ca 条件によりセツキシマブの効果が増強するのではないかという仮説をたてた。これまで、OSCC におけるセツキシマブ単剤での奏効率は 10-13% と報告されており、本研究で用いた OSCC 細胞株においてもセツキシマブの効果を WST-1 細胞増殖アッセイにて確認した結果、11 種類中 3 種類のみでしか効果を認めなかった。この仮説を検証するために、セツキシマブ耐性細胞株 (7LY, HSC3) と感受性細胞株 (17LY, SAS) を 2 種類ずつ選択し、高 Ca 条件による DSG3 と EGFR の発現とそのセツキシマブの治療効果に対する影響を検討した。その結果、高 Ca 条件によりセツキシマブ耐性細胞のみで、DSG3 と EGFR の発現が上昇し、最大 50% の細胞増殖能の低下を認めた。さらに Ca 条件によるセツキシマブの効果の増加率に着目したところ、耐性細胞では最大 27% の効果の増強を認めた(図 3)。この結果から、セツキシマブ耐性細胞において、高カルシウム条件下ではセツキシマブの効果が増強する可能性が示された。

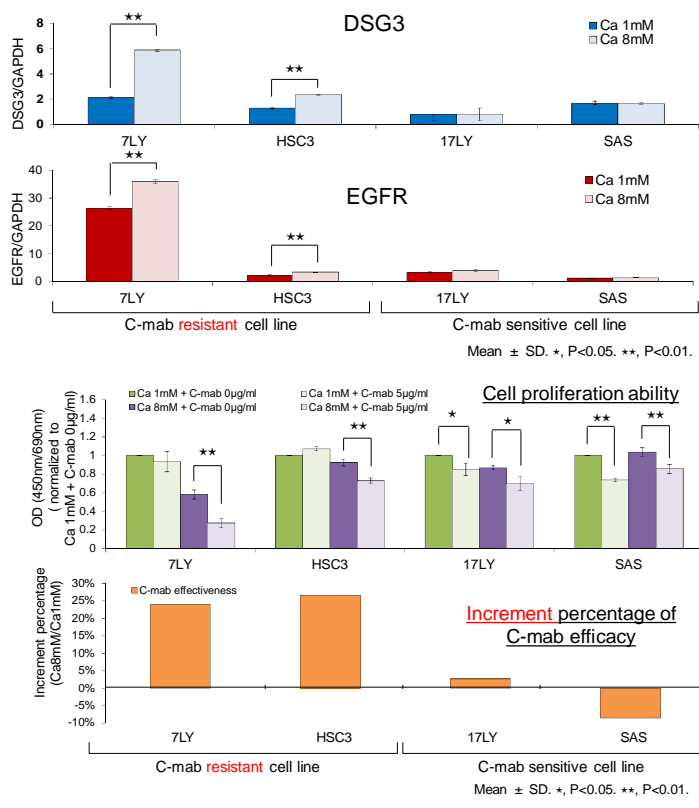


図 3 : セツキシマブ耐性細胞 (7LY, HSC3) と感受性細胞 (17LY, SAS) における, 高 Ca 条件下の DSG3 と EGFR の発現と治療効果
 耐性細胞 (7LY, HSC3) のみで DSG3 と EGFR 発現が上昇し, 治療効果が上昇した.
 上 : Ca 8mM の条件下の DSG3 発現
 中上 : Ca 8mM の条件下の EGFR 発現
 中下 : Ca 1mM と Ca 8mM の条件下で セツキシマブ 5μg/ml 投与後の細胞増殖能
 下 : Ca 1mM と比較した Ca 8mM 条件下での効果の増加率

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

Michiyoshi Kouno, Yurie Akiyama, Masaki Minabe, Naohiko Iguchi, Takeshi Nomura, Kazuyuki Ishihara, Shinichi Takahashi: Dysbiosis of oral microbiota in palmoplantar pustulosis patients. *J Dermatol Sci*. Jan;93(1):67-69.2019. doi:10.1016/j.jdermsci.2018.12.003.

Masaki Minabe, Yurie Akiyama, Kazunari Higa, Tetsuhiko Tachikawa, Shinichi Takahashi, Takeshi Nomura, Michiyoshi Kouno: A potential link between desmoglein 3 and epidermal growth factor receptor in oral squamous cell carcinoma and its effect on cetuximab treatment efficacy. *Exp Dermatol* (in press)

[学会発表](計 4 件)

Michiyoshi Kouno, Masaki Minabe, Yurie Akiyama, Tetsuhiko Tachikawa
 Cross-talk between desmoglein 3 and epidermal growth factor receptor in oral squamous cell carcinoma
 42nd Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, Kochi, Japan, 2017年12月17日、高知市文化プラザかるぽーと、高知

Michiyoshi Kouno, Yurie Akiyama, Masaki Minabe, Kazuyuki Ishihara, Shinichi Takahashi: Oral dysbiosis in palmoplantar pustulosis patients with arthro-osteosis. IID2018. 2018年5月18日、Rosen Shingle Creak Resort、オランダ、アメリカ合衆国

Yurie Akiyama, Masaki Minabe, Kazuyuki Ishihara, Shinichi Takahashi, Michiyoshi Kouno, Takeshi Nomura: **Oral dysbiosis in patients with palmoplantar pustulosis**. IADR2018. 2018年7月26日、ExCel London Covention Center、ロンドン、イギリス

Masaki Minabe, Yurie Akiyama, Tetsuhiko Tachikawa, Michiyoshi Kouno, Takeshi Nomura: Desmoglein3-EGFR Interaction in OSCC and its effect on cetuximab treatment. IADR2018. 2018年7月28日、ExCel London Covention Center、ロンドン、イギリス

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：山上淳

ローマ字氏名：JUN YAMAGAMI

所属研究機関名：慶応義塾大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号(8桁)：80327618

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。