

令和元年6月13日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11737

研究課題名(和文) 口腔癌への癌化学療法がもたらすゲノムの加速的变化と治療抵抗性獲得メカニズムの解析

研究課題名(英文) Mechanism of acquired resistance and genome evolution treated with anti-cancer drug against oral cancer

研究代表者

野口 一馬 (NOGUCHI, Kazuma)

兵庫医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50309473

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では口腔癌患者の癌遺伝子・癌抑制遺伝子の変異をがん治療に活用し、口腔癌治療において有効ながん化学療法・放射線治療を解析することである。実際には手術検体から培養細胞株を樹立し、CDDPやCmabを培養液に添加し、耐性細胞を樹立した。また放射線耐性細胞では10Gy/回を照射し、100Gy照射後も増殖能を有する口腔扁平上皮癌培養細胞の樹立に成功した。さらに唾液腺癌では培養細胞の樹立と発がんに関わる融合遺伝子の解析を行った。現在、樹立細胞の全ゲノム解析を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔がんの治療方針としては外科切除が優先されるが、術後再発や転移のリスクが高い場合は放射線化学療法(あるいは放射線治療)が行われることが推奨される。術後治療の効果が患者の予後を決定するといっても過言ではない。われわれは術後治療の効果判定を切除した組織検体から予測できないかと考え、患者由来の癌培養細胞を作成し、がん化学療法や放射線治療を行った際の遺伝子の変化から効果予測が可能かを検討した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we established newly oral squamous cell carcinoma cell lines and salivary gland carcinoma cell line derived from surgical specimen. Moreover, we analyzed some oncogene and tumor suppressor gene. Furthermore, we established acquired resistant cell lines against CDDP and Cmab. In addition, we established radiation resistant oral carcinoma cell line. Now, we analyzed mutation of oncogene and tumor suppressor gene using Next Generation Sequencer against parental cell lines. Next, we established mucoepidermoid carcinoma cell lines, and adenoid cystic carcinoma cell line. we will analyze molecular characterization of salivary gland carcinoma cell lines.

研究分野：口腔腫瘍学

キーワード：口腔がん 唾液腺癌 癌化学療法 放射線治療 獲得耐性

## 1. 研究開始当初の背景

癌化学療法は外科療法、放射線療法と並び、癌治療における重要な位置を占める。外科療法と放射線療法は腫瘍が存在する部位を治療対象にするのに対し、癌化学療法は原発巣のみならず、転移性のがんにも効果を発揮するので、標準治療では切除不能または遠隔転移症例が適応となる。癌化学療法は患者の QOL に関わる重要な治療法であるにもかかわらず、選択肢が少ない上に、生存期間の延長、有害事象対策などの点で現状は十分とは言えない。近年、癌の tailor-made 治療、個別化治療が主張されるが、個別化治療が最も重要かつ進歩している癌治療は癌化学療法である。口腔癌を含む頭頸部癌では One size fits-all 治療の癌化学療法、すなわちファーストラインとして CDDP・5-FU + Cmax が実施され、セカンドラインでドセタキセル + Cmax が適応されるのみ(その後、オブジーボの承認によりファーストラインとして CDDP・5-FU + Cmax またはカルボプラチン + パクリタキセル + Cmax、セカンドラインとしてオブジーボ、サードラインとしてパクリタキセル + Cmax と変化している)で、頭頸部癌の key Oncogene である EGFR シグナルの遺伝子レベルでの変異を確認するには至っていない。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は口腔癌のゲノム不安定性を背景としたクローン進化に伴う組織内不均一性を次世代シーケンサー (NGS) を用いて癌遺伝子・癌抑制遺伝子の発現を検討する。すなわち、放射線治療、癌化学療法を行うと治療前の細胞集団と治療後の細胞集団は変化する。これは腫瘍内細胞不均一性によるものであるが、前述の治療が有効な細胞群は死滅し、無効な細胞群が残存する。このような変化はあたかもがん組織が治療により別の細胞集団へと進化(ダーウィニズム的進化)にも見える。腫瘍内細胞不均一性はがんの治療抵抗性の大きな原因であり、薬剤耐性に関与する遺伝子・シグナル経路の発見につながるだけでなく、個別化治療を確立するための基礎的データを蓄積することである。本研究の目的は CDDP や Cmax 耐性症例の予測、他の既存の有効な分子標的薬を選択、その有効性を in vitro で検討することである。

## 3. 研究の方法

- 1) 口腔癌への標準治療の実施と口腔癌培養細胞株の樹立  
口腔癌に対し NCCN のガイドラインに沿った標準治療を行い、癌化学療法が必要となった患者に対して分化度・YK 分類・リンパ管浸潤・脈管浸潤・神経浸潤の有無を臨床的に評価する。同時に同意を得られた患者の手術検体よりがん組織を採取し、腫瘍組織より DNA・RNA を抽出、細胞培養を試みた。
- 2) シスプラチン・セツキシマブ耐性細胞の作成  
新たに樹立した口腔扁平上皮癌培養細胞 4 株と以前より当科で継代培養していた口腔扁平上皮癌培養細胞 11 株の合計 15 株に対してシスプラチン(CDDP)とセツキシマブ(Cmax)を低濃度から作用させる dose escalation method を用いて CDDP および Cmax の耐性細胞を作成した。CDDP は各細胞の IC50 の約 10 倍まで、Cmax は最高血中濃度から計算して 400 µg/mL 添加下の培養上清で増殖可能な細胞群を耐性細胞群とした。
- 3) 次世代シーケンサー(NGS)による腫瘍内不均一性・耐性細胞のゲノム変化の解析  
得られた細胞群を用いて本学共同研に常設されている NGS の MiSeq とプラットフォームとして TruSeq Amplicon – Cancer panel を用いてゲノム解析を行った。
- 4) シスプラチン・セツキシマブ耐性細胞における細胞生物学的特徴  
各薬剤に対して得られた耐性細胞群間、耐性細胞と親株のゲノム変異を NGS にて確認し、シグナル変化を RT-PCR 法を用いて発現量を解析した。
- 5) 放射線耐性細胞の樹立と解析  
前述の口腔扁平上皮癌培養細胞 15 株のうち、p53 に nonsense 変異など重要な変異がある細胞株 8 種類に対し、10Gy/回の放射線照射を行い、総線量が 100Gy になるまで照射と再増殖を繰り返した細胞群を放射線耐性細胞株として上記と同様の手法で解析した。

## 4. 研究成果

- 1) 口腔癌培養細胞株の樹立  
われわれは外科的切除ののち、遠隔転移をきたした口腔癌患者 4 名より培養細胞株の作成を試み、50 継代を超える現在も継代培養中である。さらに当科で加療した腺様嚢胞癌・多形腺腫由来癌・粘表皮癌の 3 種類の唾液腺癌患者より同様の手法を用いて培養細胞株を作成した。現来新たに顎骨中心性癌より培養細胞株を作成中である。
- 2) シスプラチン・セツキシマブ耐性細胞の樹立  
dose escalation 法を用いて CDDP 耐性口腔扁平上皮癌培養細胞および Cmax 耐性口

腔扁平上皮癌培養細胞を作成したところ、CDDP 耐性細胞は 3 株、Cmab 耐性細胞は 4 株が樹立された。

- 3) シスプラチン耐性細胞の耐性獲得機序の解析  
CDDP 耐性細胞 3 株のうち、2 株についてはこれまでの報告どおり ABC トランスポーターである ATP7B によることが明らかになった。しかし 1 株は特異な細胞形態と増殖スピードを示し、他の 2 株と明確な差があることが分かった。そのため、分子遺伝的解析を行い、Hippo シグナル経路の YAP が耐性に関与していることを明らかにした。
- 4) セツキシマブ耐性細胞の耐性獲得機序の解析  
次にわれわれは CDDP 耐性細胞樹立と同様の手法で、Cmab 耐性細胞株を樹立した。Cmab は EGFR と結合する分子標的薬で頭頸部癌だけでなく大腸癌などでも使用される薬剤であり、大腸癌の場合、K-Ras の変異があると使用出来ないことが知られている。そこでわれわれは NGS で口腔扁平上皮癌培養細胞株 15 株の EGFR および K-Ras の変異をあらかじめ確認した上で耐性細胞の作成に移った。また EGFR についてはコピー数の変化も確認した。その結果、耐性を獲得した細胞と獲得できなかった(すなわち Cmab が有効である)細胞群間、さらに耐性細胞とその親株に共通した EGFR の変異は確認できなかった。また EGFR のコピー数と Cmab 耐性獲得に相関はないように思われた。K-Ras の変異も同様で、大腸癌と異なり頭頸部癌では K-Ras の変異は Cmab の有用性とは関係なく、K-Ras に変異があっても Cmab が有効な細胞株は存在した。そこで EGFR-PI3K-AKT 経路に注目し、EGFR よりも下流の遺伝子変異に注目して解析を行った。その結果、PI3K の変異が Cmab 耐性に関与していることが確認された。
- 5) 放射線耐性細胞の樹立と解析  
得られた耐性細胞と親株を比較すると、放射線耐性細胞は CD44 など幹細胞マーカーが変化しており、顕著に幹細胞化が進んでいることが確認された。

現在、これらは in vitro の解析結果であるため、病理組織学的解析も含めて検討中である。

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 9 件)

- 1) Kitajima K, Noguchi K, Tsuchitani T, Doi H, Kanda S, Moridera K, Takaoka K, Yamakado K, Kishimoto H. Usefulness of quantitative bone SPECT/CT for evaluating response to antibiotics therapy in patients with osteomyelitis of mandible. Oral Science in Japan 2018, Japanese Stomatological Society; 53-57, 査読有
- 2) Yoshikawa K, Noguchi K, Yamanegi K, Takaoka K, Kishimoto H. Bilateral incidence of central odontogenic fibroma simulating hyperplastic dental follicle: A case report. Oral Science in Japan 2018, Japanese Stomatological Society; 57-60, 査読有
- 3) Sakuramoto-Sadakane A, Noguchi K, Yamanegi K, Kawabe M, Takaoka K, Kishimoto H. Canalicular adenoma of upper lip: A case report. Oral Science in Japan 2017. Japanese Stomatological Society; 69-70, 査読有
- 4) Kawabe M, Yamanegi K, Moridera K, Nakanishi M, Noguchi K and Kishimoto H. A case of basaloid squamous cell carcinoma diagnosed from the tissue surrounding the extracted tooth. Oral Science in Japan 2017, Japanese Stomatological Society; 73-4, 査読有
- 5) Noguchi K, Wakai K, Kiyono T, Kawabe M, Yoshikawa K, Hashimoto-Tamaoki T, Kishimoto H, Nakano Y. Molecular Analysis of keratocystic odontogenic tumor cell lines derived from sporadic and basal cell nevus syndrome patients. International Journal of Oncology 2017, 51(6):1731-38, 査読有
- 6) Sugahara K, Hasegawa Y, Fukuoka T, Saito S, Sakuramoto A, Horii N, Sano S,

Hasegawa K, Nakao Y, Nanto T, Kadoi K, Moridera K, Noguchi K, Domen K, Kishimoto H. Change in tongue pressure in patients with head and neck cancer after surgical resection. Odontology, 2017 Feb 14. doi: 10.1007/s10266-016-0291-0, 査読有

- 7) 岸本裕充、高岡一樹、野口一馬 歯科医師のための骨吸収抑制薬関連顎骨壊死の最新情報 日本顎咬合学会誌 2017; 37(3):35-42, 査読有
- 8) 野口一馬、川邊睦記、山根木康嗣、高岡一樹、岸本裕充 全身および口腔内に多発したカポジ肉腫の1例 日本口腔腫瘍学会雑誌 2017; 29(1) 15-21, 査読有
- 9) 野口一馬、岸本裕充、中野芳朗 ヘッジホッグシグナルと口腔疾患 日本口腔組織培養学会誌 2016:25(2):1-6 (口腔組織培養学会学術奨励賞受賞), 査読有

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計2件)

名称:「標準化学療法不応または不耐で治癒切除不能な進行または再発癌患者の治療のための医薬」

発明者: 菊池正二郎、篠原尚、笹子三津留、三輪洋人、岸本裕充、野口一馬

権利者:(株)三和化学、学校法人兵庫医科大学

種類:特許

番号:PCT/JP2018/011007

出願年:2018年(2017年 日本基礎出願)

国内外の別:PCT

名称:「標準化学療法不応または不耐で治癒切除不能な進行または再発癌患者の治療のための医薬」

発明者: 菊池正二郎、篠原尚、笹子三津留、三輪洋人、岸本裕充、野口一馬

権利者:(株)三和化学、学校法人兵庫医科大学

種類:特許

番号:107109442

取得年:2019年

国内外の別:台湾

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名: 山根木 康嗣

ローマ字氏名: (YAMANEGI, koji)

所属研究機関名: 兵庫医科大学

部局名: 医学部

職名: 講師

研究者番号(8桁): 00434944

研究分担者氏名: 川邊 睦記

ローマ字氏名: (KAWABE, mutsuki)

所属研究機関名: 兵庫医科大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号（8桁）：10760720

研究分担者氏名：岸本 裕充

ローマ字氏名：(KISHIMOTO, hiromitsu)

所属研究機関名：兵庫医科大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：30291818

研究分担者氏名：中野 芳朗

ローマ字氏名：(NAKANO, yoshiro)

所属研究機関名：兵庫医科大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：30360267

(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。