

令和元年5月29日現在

機関番号：81303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20289

研究課題名（和文）うがい液を用いた早期咽頭癌分子診断法の開発

研究課題名（英文）A new approach for detection of early pharyngeal cancer

研究代表者

森田 真吉 (Morita, Shinkichi)

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：10773955

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、咽頭癌の早期診断および治療を最終目的として、咽頭癌の早期診断マーカーの樹立および新規治療法の確立を目的とした。私たちは独自に樹立した下咽頭癌細胞株を用いて、造腫瘍能の高い細胞集団をスクリーニングした。その結果、CD271分子が高発現すると、造腫瘍能が著しく高いことが判明した。CD271を治療標的とするため、本研究では複数クローンの抗CD271抗体を新規作成し1クローンをヒト化抗CD271抗体（以下、hCD271mAbとする）として改変した。腫瘍細胞株を免疫不全マウスに移植し、hCD271mAbを投与すると、明らかな腫瘍増殖抑制効果が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は難治である下咽頭癌に対して、新たな表面マーカーおよび治療標的を同定することができた。これまで、咽頭癌には特異的な治療標的が乏しく、今回新たに発見された意義は大きい。また、ヒト化抗体を用いて腫瘍抑制効果があることが確認できたため、臨床応用の期待ができる。今後、CD271の機能解析を含め、引き続き研究を実施する。

研究成果の概要（英文）：In this study, to develop a new diagnosis method for early pharyngeal cancer and a new therapy, we tried to find a new diagnostic marker. We screened a high tumorigenic population of PDX-derived hypopharyngeal cancer in tumorigenic activity assay using immunodeficient NOG mice. We found that CD271high population possessed significantly high tumorigenic activity than CD271low population. To identify CD271 as a therapeutic target, we developed 5 clones of anti-CD271 antibodies. Among several clones, we chose one clone to humanize since this clone possessed highest affinity against CD271. We injected the humanized antibody with effector cells into cancer cell-xenografted mice, and found that tumor volume was significantly suppressed in the antibody-injected mice than vehicle-injected mice.

研究分野：頭頸部外科学

キーワード：咽頭癌

1. 研究開始当初の背景

本邦で咽頭癌による死亡者数は漸増しており、1983年に約2,800人だった口腔・咽頭癌による死亡者数が2013年には約8,100人と30年間で3倍になっている。近年の診断技術や手術の進歩、抗がん剤の開発などをもってしても、咽頭癌の5年生存率は約40%程度と予後不良である。また、発生機序に関しても不明な点が多く、治療に対する分子標的も定まっていない。一方、この癌もstage Iの段階で発見されれば5年生存率もおおよそ70~80%と高く、内視鏡で治療できるような表在癌であれば原病死する症例はほとんどみられていない。従って、咽頭癌患者の予後を改善するためには早期発見例を増やすことが必須である。新しい内視鏡技術である狭帯域内視鏡(narrow band imaging: NBI)が診断に応用されたことで、進行癌でしか発見のできなかったこの領域の癌が表在癌として発見されるようになってきたが、全ての医療施設で行われているわけではない。また、スクリーニングでNBI可能な内視鏡検査を行うにはコストの面、従事できる医師の数、受診者への侵襲の面からも困難であるのが現状である。そこで、本申請者は咽頭癌の早期発見が簡単に行える方法の開発を模索していた。

中咽頭癌発癌の原因として喫煙、飲酒の他に、human papillomavirus (HPV) 感染による発癌(HPV関連中咽頭癌)がある。HPV関連中咽頭癌は、本邦では全中咽頭癌の約50%を占め、今後さらなる増加が想定されている。従来、HPV感染のスクリーニングには、通常ブラッシングによるサンプル採取後に、HPV-DNAの検出が行われる。同スクリーニング方法では、観察しにくい舌根部に腫瘍がある場合や、非常に小さな腫瘍の場合は、サンプル採取に難渋する事がある。そこで申請者らは、咽頭うがい液を用いて同様の検査が可能であればスクリーニングはより簡便で容易ではないかと考えた。うがい液によるサンプルを用いて中咽頭癌におけるHPV感染のスクリーニングが可能かどうかの基礎検討を行った。15例の中咽頭癌患者からうがい液と綿棒によるぬぐい液より細胞を収集し、PCRにて比較検討した。15例の患者のうち5例がHPV陽性であり、うがい液ではそのうち3例、ぬぐい液からは4例HPVが検出された。この結果から、工夫を加えることによりうがい液中の細胞からHPV-DNA検出が充分可能であることが明らかとなった(投稿準備中)。つまり、うがい液中に含まれる細胞を用いた咽頭癌の分子診断法の開発が可能と考えた。

当施設では2007年より消化器内科と共同で内視鏡下に咽頭表在癌の手術を開始し、現在まで100症例を超える切除が行われている。これらの切除標本を観察すると前癌病変である異型上皮や癌の最初期である上皮内癌病変が確認される。正常部には発現せず異型上皮、上皮内癌病変に特異的に発現する分子が同定されれば、その分子発現の検出による早期診断法の開発が可能である。そのためには、これらの微小病変から核酸を抽出することが必要である。また、病変観察のためにはパラフィン包埋組織より作製された標本が最もふさわしい。そこで、レーザービームマイクロダイゼクションにてパラフィン標本より病変を抽出した核酸を網羅的に分析することを考えた。

2. 研究の目的

本研究では、咽頭癌の早期診断および治療を最終目的として、咽頭癌の早期診断マーカーの樹立およびそれを利用した新規治療法の確立を目的とした。

3. 研究の方法

独自に樹立した下咽頭癌細胞株を用いて、造腫瘍能の高い細胞集団の表面マーカーをスクリーニングした。また、同定した表面抗原に対してヒト化抗体を作成した。

4 . 研究成果

表面抗原スクリーニングの結果、CD271 分子が高発現すると、造腫瘍能が著しく高いことが判明した。CD271 は正常咽頭粘膜では基底層に発現するが、dysplasia の時点では粘膜上層部に発現部位が広がり、squamous cell carcinoma では増殖の盛んな部位に特に高発現することが判明した。従って、CD271 は早期診断にも有用である可能性がある。

CD271 を治療標的とするため、本研究では、複数の抗 CD271 抗体を新規作成した。これらの抗体は、ELISA、flow cytometry、western blot、あるいは免疫染色において CD271 に反応した。2 クローンは CD271 のドメインの中で X および Y を認識しており、現在市販されている抗体にはない認識ドメインであった。これらのなかで、特に親和性・産生量の高い 1 クローンを選び、ヒト化抗 CD271 抗体（以下、hCD271mAb とする）として改変した。hCD271mAb はヒト CD271 に対し高い親和性を示し（ $KD=1 \times 10^{-9}M$ ）、CD271 の Z ドメインに結合することが明らかとなった。In vitro 試験では、作成した hCD271mAb は下咽頭癌患者由来細胞株 HPCM2、悪性黒色腫細胞株 MeWo-Luc、およびヒト CD271 を強制発現させたマウス細胞株 SP2/0-CD271 に対して ADCC（Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity）活性を示した。さらに、これらの細胞株を免疫不全マウスである NOD/scid マウスに移植し、hCD271mAb を用いて in vivo での抗腫瘍効果を確認したところ、すべての細胞において腫瘍増殖抑制効果が認められた。抗体治療を行った腫瘍組織を病理学的に解析したところ、抗体・リンパ球投与群では CD271 陽性細胞が有意に減少していた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

1. J. Suzuki, Y. Harazaki, S. Morita, Y. Kaga, K. Nomura, M. Sugawara, Y. Katori, Myeloid Sarcoma of the Paranasal Sinuses in a Patient with Acute Myeloid Leukemia, *Tohoku J Exp Med* (246) 141-146, 2018
2. T. Imai, I. Satoh, K. Matsumoto, Y. Asada, T. Yamazaki, S. Morita, S. Saijo, J.I. Okubo, S. Wakamori, S. Saijo, K. Matsuura, Retrospective observational study of occult cervical lymph-node metastasis in T1N0 tongue cancer, *Jpn J Clin Oncol* (47) 130-136, 2017
3. R. Ikeda, M. Tateda, A. Okoshi, S. Morita, H. Suzuki, S. Hashimoto, Transcanal endoscopic resection for leiomyoma of the external auditory canal and a review of the literature, *Auris Nasus Larynx* (43) 97-99, 2016
4. 森田 真吉, 松浦 一登。【耳鼻咽喉科処方マニュアル】 頭頸部がん 喉頭がん。耳鼻咽喉科・頭頸部外科(0914-3491)88 巻 5 号 Page305-309(2016.04)
5. 森田 真吉, 舘田 勝, 天野 雅紀, 中目 亜矢子, 橋本 省。血友病 A 患者に発症した喉頭血腫の 1 例。耳鼻咽喉科・頭頸部外科(0914-3491)88 巻 4 号 Page347-350(2016.04)

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 当科において 12 年間に施行した下咽頭癌部分切除術 49 例の検討。森田 真吉, 若盛 隼, 小柴 康利, 今井 隆之, 加藤 健吾, 浅田 行紀, 松浦 一登。頭頸部癌学会 (2016)

〔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

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）：

(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。