

令和元年6月21日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16454

研究課題名(和文) 癌幹細胞選択的阻害剤とのシナジー効果による食道癌の新規放射線治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel method of radiotherapy for esophageal carcinoma by synergy effect with the selective inhibitor of cancer stem cells

研究代表者

脇山 浩明(WAKIYAMA, Hiroaki)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：70758375

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：食道扁平上皮癌に対する新規放射線増感剤の開発は喫緊の課題である。CD44vは癌幹細胞マーカーであるが、シスチントランスポーター(xCT)を安定化させ活性酸素の制御を行っている。本研究は食道扁平上皮癌におけるxCT阻害剤のスルファサラジンを併用した新規放射線治療の開発を目的とした。結果、スルファサラジン併用で食道扁平上皮癌細胞への放射線感受性の増強を認めた。また、CD44vの高発現と食道扁平上皮癌の放射線治療抵抗性との関連も認めた。以上より、スルファサラジンは食道扁平上皮癌に対する新規放射線増感剤となりうる薬剤であり、CD44v高発現が食道扁平上皮癌の放射線抵抗性のマーカーと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食道扁平上皮癌への化学放射線療法は手術と並ぶ標準治療として確立しているが、放射線抵抗性の改善が喫緊の課題である。放射線による抗腫瘍効果は活性酸素(Reactive oxygen species:ROS)産生によるものが主である。癌幹細胞はROSを抑制するCD44vを発現しており、放射線抵抗性の原因と考えられている。本研究ではスルファサラジンの併用で、食道扁平上皮癌細胞で放射線感受性が増加することや、CD44vの高発現と食道扁平上皮癌の放射線治療抵抗性との関連を示した。スルファサラジンは有望な放射線増感剤であり、今後は前臨床試験としての位置づけで有効性に関するエビデンスを蓄積していきたい。

研究成果の概要(英文)：Identification of new radiosensitizers for esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) is required. CD44v is recognized as a marker for cancer stem cells and regulates redox status in cancer cells by stabilizing the xCT. In this study, we investigated the radiosensitizing effect of sulfasalazine that is an inhibitor of xCT. We found that sulfasalazine improved radiosensitivity in ESCC. Moreover, we found that the association of elevated CD44v expression level with radiotherapy resistance in ESCC. These results suggest that combining radiotherapy with sulfasalazine could be a therapeutic option for ESCC and ectopic expression CD44v could be a novel biomarker of radiotherapy resistance.

研究分野：放射線治療

キーワード：放射線治療 食道扁平上皮癌 活性酸素 CD44v 癌幹細胞 スルファサラジン ROS 放射線増感剤

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

1. 研究開始当初の背景

難治性癌である食道扁平上皮癌に対する治療法として、化学放射線療法が機能温存かつ低侵襲な治療として手術と並び確立している(Tachimori Y et al, *Esophagus*.13: 110-137 2016)。しかし、切除可能食道癌に対する化学放射線療法は37% (第 相試験 JCOG9906) と満足すべき値ではない。さらなる治療成績の向上には放射線抵抗性の改善が喫緊の課題であり、新規放射線増感剤の開発とその増感効果を予測するバイオマーカーの同定が切望されている。

放射線抵抗性の原因として、放射線により誘導された殺細胞効果を持つ活性酸素(Reactive oxygen species:ROS)が癌幹細胞により中和されることが考えられている。癌幹細胞では CD44 のバリエーション(CD44v)が高発現している。CD44v はいくつのバリエーションが報告されている(Chen C et al. *J Hematol Oncol*.11:64 2018.)。そのバリエーションの中で、エキソン 12-14 を含む CD44v は腫瘍細胞膜表面のシスチントランスポーター(以下 xCT)を安定化させることで細胞外シスチンの取り込みを増加させ、抗酸化物質であるグルタチオンの生成を促進することにより ROS を中和し、細胞内 ROS を低く保っているが、特にこの ROS 中和システムにより癌幹細胞は ROS による殺細胞効果に高い抵抗性を示すと考えられている(Ishimoto T et al, *Cancer Cell*.19:387-400 2011.)

近年、抗リウマチ薬として使用されるスルファサラジンが、ROS の中和抑制により抗腫瘍効果を示すことが報告された(Ishimoto T et al, *Cancer Cell*.19:387-400 2011.)。スルファサラジンは xCT の機能を抑制することで ROS の中和システムを阻害する。上記のスルファサラジンの抗腫瘍効果が注目され、ドラッグリポジショニング薬として臨床応用すべく、本邦において施行された胃癌に対するスルファサラジン単剤投与の第一相試験では、CD44v 陽性細胞の減少が確認された(Shitara K et al, *Gastric cancer* 20: 341-349, 2017.)。以上から、放射線照射と癌幹細胞を標的としたスルファサラジンを併用することによる抗腫瘍効果の増強が期待される。(図 1)。

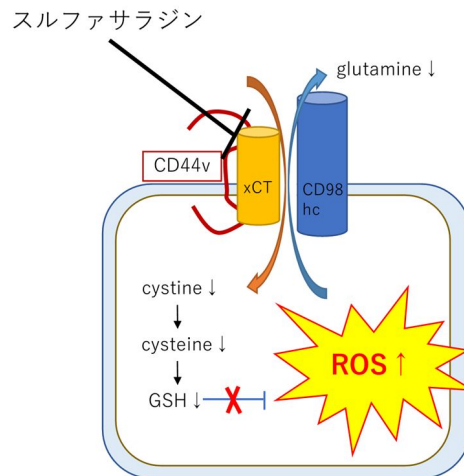


図 1 癌幹細胞による ROS の回避機構とスルファサラジン

2. 研究の目的

本研究は食道癌におけるスルファサラジンを併用した新規放射線治療の開発を目的とした。

3. 研究の方法

(1) ヒト食道扁平上皮癌細胞株の、エキソン 12-14 を含む CD44v(以下 CD44v)発現とスルファサラジン/放射線照射に対する感受性との関連

- 1) CD44v 高発現および低発現ヒト食道扁平上皮癌細胞株の同定(FACS, RT-qPCR)
- 2) スルファサラジン単剤投与による CD44v 高発現および低発現細胞株の抗腫瘍効果(MTT assay, FACS)
- 3) スルファサラジン/放射線照射併用による CD44v 高発現および低発現細胞株の抗腫瘍効果(colony assay)

(2) CRISPR Cas9 システムによる CD44v ノックアウト(以下 CD44vKO)ヒト食道扁平上皮癌細胞株の樹立と、放射線照射に対する感受性変化

- 1) CD44vKO 細胞株(エキソン 13 の切離)の樹立(CRISPR Cas9 システム)
- 2) CD44vKO 細胞株の増殖能(MTT assay, colony assay)
- 3) CD44vKO 細胞株の放射線照射による抗腫瘍効果(colony assay)

(3) 放射線治療前の食道扁平上皮癌組織中の CD44v 発現

化学放射線療法前の食道扁平上皮癌組織中の CD44v 発現と局所再発との関連

4. 研究成果

(1)ヒト食道扁平上皮癌細胞株の CD44v 発現とスルファサラジン/放射線照射に対する感受性との関連

- 1)CD44v 高発現株として TE1, TE11、低発現株として TE4 を同定した (RT-PCR、FACS)。
- 2)スルファサラジン単剤投与により、高発現株 (TE1, TE11) は低発現株 (TE4) に比較して生存細胞数が減少した (MTT assay, $p < 0.05$)。この生存抑制効果は、Live-or-Dye を用いた FACS 解析によりスルファサラジン投与により死細胞数の増加を認めなかったことから殺細胞効果ではなく増殖抑制効果であることが示唆された。
- 3)スルファサラジンと放射線照射の併用により TE1 (高発現株)、TE4 (CD44v 低発現株) いずれも併用による細胞生存抑制効果の増強を認めた (colony assay, 図 2)。この 2 つの細胞に対する増強効果は、スルファサラジンと放射線照射それぞれの抑制効果の代数和以上であることから、併用による相乗効果が示唆された。

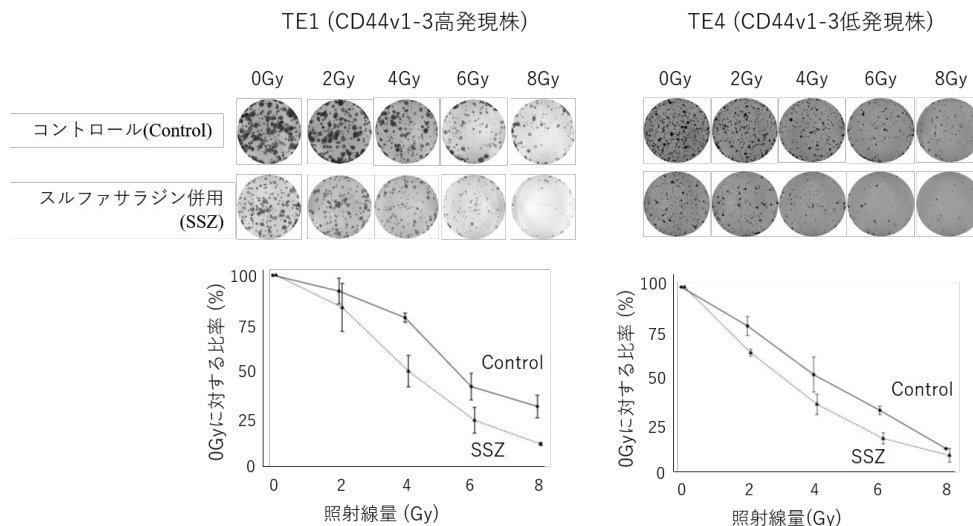


図 2 スルファサラジンと放射線照射の併用による食道扁平上皮癌細胞に対する抗腫瘍効果

(2)CRISPR Cas9 システムによる CD44v-KO ヒト食道扁平上皮癌細胞株の樹立と、放射線照射に対する感受性変化

- 1)CRISPR Cas9 システムによる CD44v-KO およびそのコントロールを樹立した (図 3)。

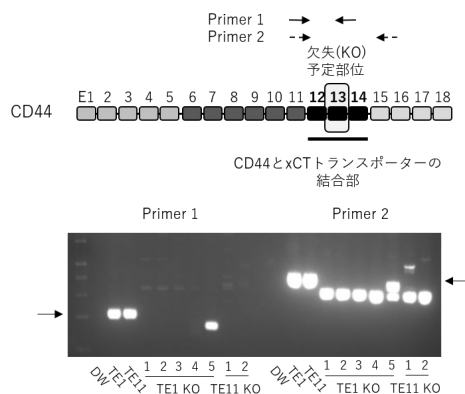


図 3 CD44v-KO 食道扁平上皮癌細胞の樹立

- 2)CD44v-KO-TE1 株はコントロールに比較し、細胞増殖能の低下を認めた (MTT assay, colony assay. $p < 0.05$)
- 3)放射線照射により CD44v-KO 株はコントロールに比較し、生存細胞数の低下を認めた (colony assay, 図 4)

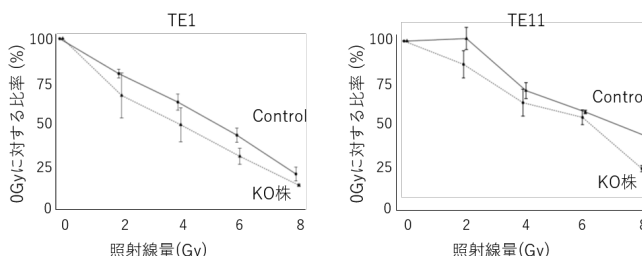


図 4 CD44v-KO 食道扁平上皮癌細胞に対する放射線照射の抗腫瘍効果

(3)放射線治療前の食道扁平上皮癌組織中の CD44v 発現

化学放射線療法後に早期再発を示した症例は CD44v 発現が高値であった (図 5)。

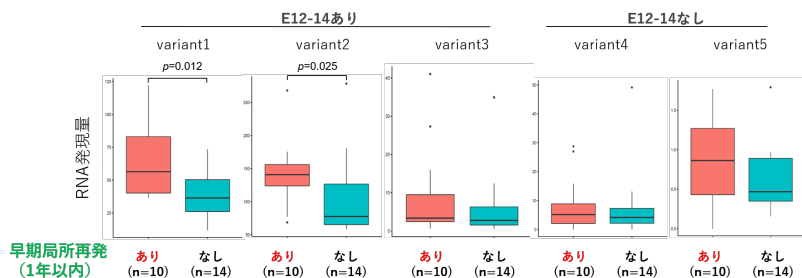


図 5 化学放射線療法前の食道扁平上皮癌組織中の CD44v 発現

本研究により、抗リウマチ薬として臨床的に安全に使用されているスルファサラジンと放射線照射を併用することにより、食道扁平上皮癌細胞の放射線感受性の増強を認めた。さらに、CRISPR-Cas9 システムによる CD44v ノックアウト細胞を用いた実験では、これまでに報告されている、スルファサラジンの xCT 抑制による ROS の中和阻害からもたらされる殺細胞効果の増強を支持する結果となった。また、化学放射線療法に抵抗性を示した症例は CD44v 発現が高値であり、CD44v 高発現が食道扁平上皮癌の放射線抵抗性のマーカーと考えられた。これらの結果により、放射線照射に高い抵抗性を示す癌幹細胞を標的とする治療戦略の有効性が期待された。さらにこの癌幹細胞を標的とした治療は、食道扁平上皮癌のみならず多くの悪性腫瘍に有効性を示すことが予想される。スルファサラジンはドラッグリポジショニング薬として有効と考えるが、さらなる有効性の高い化合物の同定を進めていく必要がある。

今後は、主として以下の 3 つの検討を行う予定である。1 .食道癌担癌マウスを用いた *in vivo* での相乗効果を確認する。2 .スルファサラジンが xCT の抑制を介して ROS の中和を阻害することを確認する。3 .ドラッグリポジショニングを用いてスルファサラジンより強力に ROS の中和を阻害する化合物を同定する。前臨床試験としての位置づけで食道扁平上皮癌放射線治療におけるスルファサラジン併用の有効性に関するエビデンスを蓄積していきたい。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者は下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

下記、全て査読あり

1. Hisano O, Nonoshita T, Hirata H, Sasaki T, Watanabe H, Wakiyama H, Ono M, Ohga S, Honda H. Additional radiotherapy following endoscopic submucosal dissection for T1a-MM/T1b-SM esophageal squamous cell carcinoma improves locoregional control. *Radiat Oncol*. 2018 Jan 29;13(1):14. doi: 10.1186/s13014-018-0960-y.

2. Wakiyama H, Masuda T, Motomura Y, Hu Q, Tobo T, Eguchi H, Sakamoto K, Hirakawa M, Honda H, Mimori K. Cytolytic Activity (CYT) Score Is a Prognostic Biomarker Reflecting Host Immune Status in Hepatocellular Carcinoma (HCC). *Anticancer Res*. 2018 Dec;38(12):6631-6638. doi: 10.21873/anticancer.13030.

[学会発表] (計 3 件)

1. Wakiyama H, Hirata H, Sugimachi K, Masuda T, Hayashi N, Kuroda Y, Ito S, Eguchi H, Terashima K, Sakamoto K, Hirakawa M, Honda H, Mimori K: Loss of fructose-1,6-bisphosphatase expression induces altering glucose metabolism and tumor progression in hepatocellular carcinoma. AACR Annual Meeting 2017 April 1-5, 2017 Washington, D.C., USA

2. 脇山浩明、増田隆明、神山勇太、吉川幸宏、胡 慶江、佐藤晋彰、齋藤衆子、林 直樹、黒田陽介、伊藤修平、江口英利、三森功士 : Cytolytic activity (CYT) score は肝細胞癌の独立予後規定因子である、第 76 回日本癌学会学術総会 2017 年 9 月 28-30 日 横浜

3. 脇山浩明、増田隆明、胡 慶江、鶴田祐介、黒田陽介、伊藤修平、江口英利、平川雅和、松本圭司、坂本勝美、本田 浩、三森功士 : 胃癌及び肝細胞癌における Cytolytic activity (CYT) の臨床的意義、第 39 回癌免疫外科学研究会 2018 年 5 月 17-18 日 岐阜

[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：

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。