

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

## 科学研究費助成事業

## 研究成果報告書



令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K16843

研究課題名（和文）PHD阻害剤を用いたがん微小環境の改善による頭頸部癌新規治療戦略の開発

研究課題名（英文）Development of novel therapeutic approach with tumor microenvironment normalisation by prolyl hydroxylase inhibitor for Head and Neck Cancer

研究代表者

小山 哲史（KOYAMA, Satoshi）

鳥取大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90771402

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000 円

研究成果の概要（和文）：ヒト頭頸部扁平上皮癌細胞株の培養、移植したモデルマウスの作成が安定的に実施できず、培養環境、培養溶液など再考を重ねたが遅々として実験は進まず、研究の本筋において十分な成果を上げることはできなかった。

一方、関連した学会への参加を通じて情報収集を行い、本研究の独自性、先進性は確認された。癌治療の発展にとって重要なテーマであり、今後実験方法について見直しを行い研究を前進させる必要性を感じた。その他、関連した研究論文を欧文で1報公表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

情報収集を通じて本研究の先進性と独自性が確認され、がん治療の発展にとって重要なテーマであることや、臓器横断的にがん治療全体に対して大きな利益を与える可能性が示唆された。特に低酸素環境は、がんの治療抵抗性の主原因の一つであるため、がん薬物療法や放射線治療の効果を増強することで、患者さんの予後延長や生活の質（QOL）の改善維持に期待が持て、治療効果を通じて社会に役立てられると考える。また、本研究を進め日本初の治療として確立していくことは、世界に対する学術的競争力向上にもつながる。

研究成果の概要（英文）：The culture of human head and neck squamous cell carcinoma cell lines and the creation of transplanted model mice could not be carried out in a stable manner. Although the culture environment and culture solution were reconsidered, the experiment did not proceed, and sufficient results were not achieved to compete this research.

On the other hand, information was collected through participation in related academic societies, and the uniqueness and advancedness of this research were confirmed. It is an important theme for the development of cancer treatment, and I felt the need to review experimental methods and advance this research in the future. In addition, one related research paper was published in European languages.

研究分野：耳鼻咽喉科頭頸部外科

キーワード：PHD HIF 低酸素 がん微小環境

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、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

癌細胞は自らの増大の過程において、血管内皮増殖因子などを分泌することで栄養血管(腫瘍血管)を新生することが知られている。この過程には、腫瘍内の Hypoxia inducible factor(HIF)という転写因子が関連していることが過去の研究から明らかとなっている。通常酸素環境では、Hypoxia inducible factor(HIF)は prolyl-hydroxylase (PHD)により分解され活性を失う。低酸素環境では PHD により分解されず、HIF の活性化から血管新生が導かれる。

一方、このようにして形成された腫瘍血管は正常血管と比較して血管径が小さく透過性が高いなどの特徴を持つ。さらには、癌組織内を低酸素環境に陥らせる原因となり、癌の抗癌剤への感受性を低下させる。HIF の分解酵素である prolyl-hydroxylase(PHD)をヘテロ欠損させた遺伝子改変マウスを用いた報告から、PHD の活性低下から生じた HIF の増加により血管の形態および透過性などを正常化し、癌組織内の低酸素環境を改善し転移を抑制することが可能であると示された(Cell, 2009)。また、腫瘍血管の正常化は、抗癌剤への感受性の向上に寄与することも明らかとなっている(Cancer Cell, 2014)。

ヒトの頭頸部扁平上皮癌も同様に異常な血管を形成することで抗癌剤への抵抗性を獲得する。頭頸部癌の特有の問題として、咽喉頭に生じた腫瘍は嚥下障害や気道狭窄の原因となることから、抗癌剤への感受性向上による腫瘍の制御は患者の生活の質の向上に大きく寄与する。

## 2. 研究の目的

癌を栄養する腫瘍血管には正常組織の血管と透過性や形状などの点で異なる特徴があり、抗癌治療を困難にする一つの原因となっている。腫瘍血管の形成は、Hypoxia inducible factor( HIF )に制御されている。遺伝子改変マウスを用いた HIF の過剰発現により腫瘍血管を正常化させ、更には抗癌剤の感受性を向上させると報告された。

Dimethylloxaloglycine(DMOG)は、HIF の分解酵素 prolyl-hydroxylase(PHD)の阻害剤である。我々は肺癌モデルマウスを用い、DMOG の全身投与が腫瘍血管を正常化し抗癌剤の感受性を向上させることを報告した(図1、Scientific Reports 2017)。

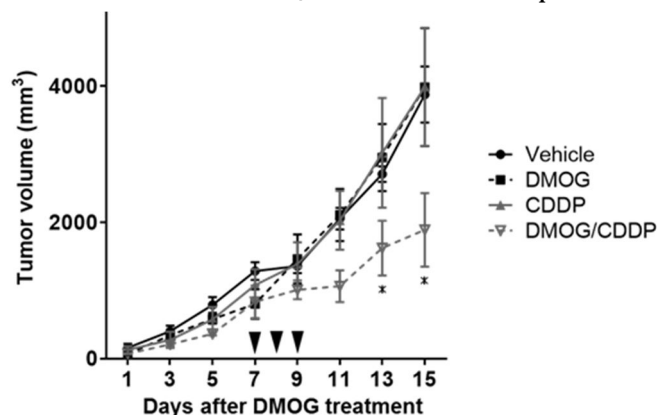


図1. DMOG による抗がん剤感受性の向上効果

Vehicle 群(Vehicle)、DMOG 単独投与群(DMOG)、シスプラチン単独投与群(CDDP)はいずれも同様の腫瘍の増大速度であり、DMOG 単独またはシスプラチン単独での抗腫瘍効果は認めなかったものの、DMOG とシスプラチンの両方を投与した群(DMOG/CDDP)では有意に腫瘍の増大速度が抑制されていた。シスプラチン投与、\* : $p < 0.05$  (Turkey's multiple comparison test)

本研究では、同様の研究をヒト頭頸部扁平上皮癌モデルマウスで行い、抗癌剤の感受性向上効果を複数の癌モデルマウスで明らかにすることで、PHD 阻害剤による腫瘍血管の正常化および抗癌剤感受性向上の理論の一般化を目的としている。

本研究の概要は以下図2の通りである。

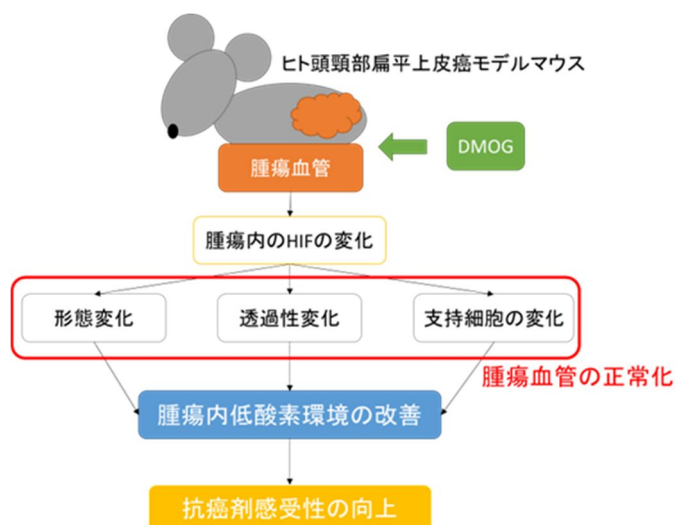


図2. 本研究のシェーマ

マウスの皮下にヒト頭頸部扁平上皮癌細胞株を移植し皮下に腫瘍を形成させた後、それを摘出して ex vivo での形態変化、透過性変化、血管支持細胞の変化を確認する。その後、抗癌剤の投与を行い感受性の向上を確認する。

### 3. 研究の方法

マウスの皮下にヒト頭頸部扁平上皮癌細胞株を移植し皮下に腫瘍を形成させた後、それを摘出して ex vivo での形態変化、透過性変化、血管支持細胞の変化を確認する。その後、抗癌剤の投与を行い感受性の向上を確認する。

#### (1)ヒト頭頸部扁平上皮癌モデルマウスの作成

所属の既報論文(Int J Clin Oncol 16:133-140, 2011)に従い、ヒト頭頸部扁平上皮癌を皮下に移植したモデルマウスを作成する。

#### (2) DMOG 投与による腫瘍血管の変化の確認

DMOG 投与群および DMOG 非投与群の 2 群に分け以下、～ の検討を行う。

単位面積あたりの腫瘍血管数、血管径

DMOG 投与から 7 日目時点で腫瘍を採取し、薄切切片を作成して、抗 CD31 抗体を用いた蛍光免疫染色を行い、単位面積あたりの腫瘍血管数と血管長径を評価する。

腫瘍血管の血管内皮細胞におけるタイトジャンクションおよび支持細胞

上記と同様にして作成した薄切切片を抗 CD31 抗体とともにタイトジャンクションの指標となる抗 ZO-1 抗体を用いた蛍光免疫染色によりタイトジャンクションの変化を評価する。また、支持細胞の指標である抗 NG2 抗体を用い支持細胞の変化を評価する。

腫瘍血管における血管透過性

Dextran-FITC を尾静注した後に腫瘍を採取し、薄切切片を作成する。抗 CD31 抗体で蛍光免疫染色を行い、血管内皮細胞よりも間質側へと漏出した Dextran-FITC の量について比較検討を行う。

腫瘍内の低酸素環境

低酸素領域のマーカーである pimonidaole を用いて、両群間での単位面積あたりの低酸素領域の割合に差が生じるか検討を行う。

免疫染色した組織の各定量は、KEYENCE BZ9000 顕微鏡の付属ソフトのハイブリットセルカウントを用いて定量を行う。

DMOG 投与の有無により腫瘍内の HIF に変化があったか、DMOG 投与後の腫瘍からタンパクを抽出しウェスタンブロッティング法を用いて定量比較を行う。

その他、腫瘍血管の性状が変化または DMOG の投与自体が、腫瘍の増大や生存率の低下などに影響がないことを確認するためにも、腫瘍体積の増加曲線および生存曲線も DMOG の投与の有無で比較し差がないことを確認する。

#### (3) DMOG 投与による抗癌剤感受性の変化

併用治療による抗腫瘍効果の検討

DMOG 投与の有無、抗癌剤投与の有無で 4 群に分配し、2 日に 1 回ノギスを用いて腫瘍の大きさを測定して増大曲線をそれぞれ作成し比較検討を行う。

腫瘍の組織学的変化

DNA 傷害マーカーである抗 H2AX 抗体およびアポトーシスのマーカーである抗 cleaved caspase 3 抗体を用いた蛍光免疫染色により 4 群間での比較検討を行う。

抗癌剤によってはその薬剤自体が腫瘍血管の性状を変化させる可能性もあるため、増大曲線または生存率などに差が生じない場合には、抗癌剤を変更して再検討を行う必要がある。

また、抗癌剤の投与量や投与期間についても複数の過去の報告を参照して検討する。

### 4. 研究成果

ヒト頭頸部扁平上皮癌細胞株の培養、移植したモデルマウスの作成が安定的に実施できず、培養環境、培養溶液など再考を重ねたが遅々として実験は進まず、研究の本筋において十分な成果を上げることができなかった。

一方、関連した学会への参加を通じて情報収集を行い、本研究の独自性、先進性は確認された。また関連した研究論文を欧文で 1 報公表した。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1 . 著者名 Koyama Satoshi、Morisaki Tsuyoshi、Taira Kenkichiro、Fukuhara Takahiro、Fujiwara Kazunori	4 . 巻 64
2 . 論文標題 Sequential Evaluation of Swallowing Function During Chemoradiotherapy for Head and Neck Cancer	5 . 発行年 2021年
3 . 雑誌名 Yonago Acta Medica	6 . 最初と最後の頁 234 ~ 239
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.33160/yam.2021.08.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6 . 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7 . 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------