

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03826

研究課題名(和文) 口腔粘膜悪性黒色腫の重粒子線治療を中心とした集学的治療法の開発

研究課題名(英文) Development of combined therapy utilizing heavy particle radiation treatment for oral mucosal malignant melanoma

研究代表者

藤井 万紀子 (Fujii, Makiko)

広島大学・医系科学研究科(歯)・教授

研究者番号：70406031

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：頭頸部難治性希少癌である粘膜悪性黒色腫に対して現在行われている重粒子線治療、免疫療法に加えた新規分子標的薬の対象となり得る分子の探索を行った。国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構との共同研究により、QST病院を受診した無治療の悪性粘膜黒色腫の患者血液サンプルからmiRNAを回収し、次世代シーケンスを用いてそれぞれの検体中の発現パターンを検討する予定であったが、ライブラリー作製がうまくいかず、重粒子線治療の条件との突合せを行うことができなかった。一方、粘膜悪性黒色腫細胞株は、PDGF阻害薬に感受性が高いため、PDGFがどのように細胞内増殖シグナルを活性化するかについて検討を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、頭頸部における難治性希少癌である粘膜悪性黒色腫のゲノム異常の解析を基に、現在行われている重粒子線治療、免疫療法に加えた新規分子標的薬の対象となり得る分子の探索を行い、既存の治療法を統合させた集学的治療の成績向上を目指すために行った。難治性希少癌に対しては、重粒子線治療は有効であるが、局所再発症例、転移症例などでは、新規分子標的薬の開発が必要となる。患者検体から最大限の情報を得て、それを治療法開発につなげる研究を継続して行っている。

研究成果の概要(英文)：In this study, we explored the target for new molecules target medicine for patients suffering from the head and neck mucosal malignant melanoma. Recent advancement of treatment show that heavy particle radiation exert the effective treatment for this head and neck mucosal malignant melanoma. Collaborative investigation with the National Institute for Quantum Science and Technology enabled us to analyze miRNA of patients' blood samples collected before the treatment in QST Hospital. We started the analysis, but unfortunately, we could not proceed to the next-generation sequencing, because of the unsuccessful step in making miRNA library. On the other hand, we are exploring the new molecular target for treatment since we found that PDGF activates the growth of mucosal malignant melanoma.

研究分野：がんの分子生物学

キーワード：頭頸部粘膜悪性黒色腫 重粒子線 miRNA 血液検体 PDGF 粘膜悪性黒色腫細胞株樹立

1. 研究開始当初の背景

(外科的療法の問題点) 頭頸部がんでは外科的療法による審美性や形態機能の障害が起こりやすく、腫瘍の進行程度によっては顔貌の変化、発語機能喪失、咀嚼・嚥下機能低下などにより、社会復帰など患者 QOL を大きく低下させる。

(重粒子線治療の現状) 口腔粘膜悪性黒色腫は口腔粘膜に存在するメラノサイト由来の希少癌である。口腔がんを含む頭頸部がん治療における放射線療法は、治療後も機能や形態が温存されやすく、外科的療法とともに治療の中心として用いられてきた。頭頸部粘膜悪性黒色腫に対する重粒子線照射の効果が近年認められ、2018 年 4 月より保険適応となった。頭頸部粘膜悪性黒色腫患者の 5 年生存率は重粒子線治療のみ(外科手術なし)で 50%となっており(Koto M. et al. Int. J. Radiation Oncol. Biol. Phys. 2018)、局所制御の高率化に伴って劇的に予後が改善された。一方、遠隔転移がある場合予後は非常に悪く、全身を巡るがん細胞に効果的な化学療法剤の使用、新規分子標的治療薬の開発に対する社会的要請が高まっている。

(分子標的標的治療の現状) 口腔粘膜悪性黒色腫は、皮膚由来悪性黒色腫と比べて、悪性度が強く予後は悪い。

(国内外の研究動向) 重粒子線治療は、様々ながん治療法の中で現在日本が治療患者数、治療成績の観点から世界をリードする、日本発のがん治療研究・開発としての期待を背負う治療法である。1970 年代末、アメリカのローレンス・バークレー研究所(LBL)が原子核実験用に建設された加速器を利用して、ネオン線を利用した重粒子線治療の先駆的研究が行われたが、成果を出せず施設は閉鎖された。その後日本では放射線医学総合研究所(放医研)では主に炭素線を中心に研究が行われ、加速器によりがん細胞に集中的に照射する方法ががん治療に有効であることが示された。1994 年より世界初の重粒子治療専用照射施設「HIMAC」において治療を開始しており、治療患者数は 1 万人を超え世界随一で、研究開発の中心にある。現在、医療目的の重粒子線照射装置を保持している国は、日本、ドイツ、イタリア、中国、オーストリアに限定されている点でも独自性が強い。現在日本国内では重粒子線治療施設は 6 カ所に増えているが、海外からも興味を集めており、将来的には装置の小型化とともに施設のみならず人材とともに輸出の増加が期待されている。

2. 研究の目的

本研究では、希少癌の一つである頭頸部粘膜悪性黒色腫の集学的治療法を確立させるため、重粒子線治療の効果を上げる分子標的治療薬の開発を目指す。現在、重粒子線のみでの治療では、局所制御率 70%、5 年生存率 50%と非常に高い効果を示している。現在 OPDIVO® (nivolumab) との併用療法が試験的に開始されている。しかし粘膜悪性黒色腫は奏効率 OPDIVO® (nivolumab) 単独では 9.5%となり、重粒子線治療との相乗的な腫瘍縮小効果が認められるかは未知数である。粘膜悪性黒色腫の治療効果を上げるためのアジュバンド化学療法の開発が必要である。

3. 研究の方法

頭頸部粘膜悪性黒色腫の無治療の患者血液サンプルを利用する。放射線医学総合研究所では重粒子線照射前の無治療の日本人患者血液サンプルを採取し保存しているが、希少がんということもあり、無治療の粘膜悪性黒色腫患者が一つの施設で治療を受ける為に集まっている増殖に關与するゲノムの欠失、変異や miRNA の発現について次世代シーケンサーを使用して検索する。

これまで研究の進んでいなかった粘膜悪性黒色腫の増殖に關わるたんぱく質の機能について粘膜悪性黒色腫培養細胞株を用いて同定する。

ゲノム異常と、重粒子線照射後の患者予後に相関関係があるかを調べる。

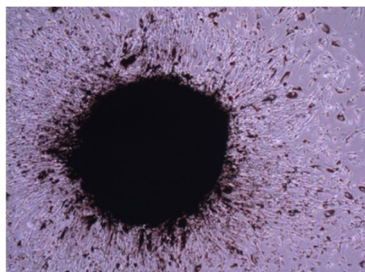
既に粘膜悪性黒色腫で既に増殖に關与することが報告されている遺伝子群の作用機序を解析し、分子標的治療薬の開発に繋げる。

4. 研究成果

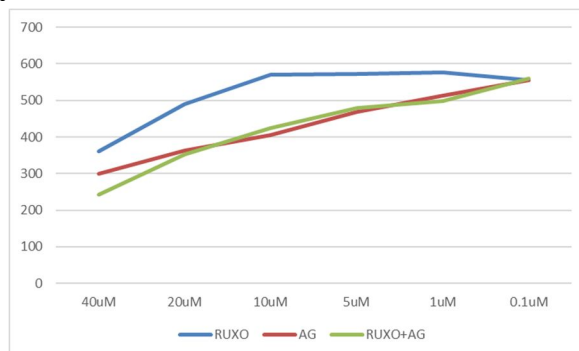
本研究では、頭頸部における難治性希少癌である粘膜悪性黒色腫のゲノム異常の解析を基に、現在行われている重粒子線治療、免疫療法に加えた新規分子標的薬の対象となり得る分子の探索を行い、既存の治療法を統合させた集学的治療の成績向上を目指すために開始した。国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構との共同研究により、QST 病院を受診した無治療の悪性粘膜黒色腫の患者血液サンプル各患者の発生部位、TNM、組織型、ステージについて情報が得られている。分類された患者の重粒子線照射

の前治療、重粒子線治療の条件（線量、分割、照射門数、照射の標的体積など）との突合せを行い、予後予測につなげる計画であった。広島大学医系科学研究科にて検討を行うため、量子科学技術研究開発機構側とは「メディカルデータバンク（MDB）から提供した検体の臨床情報データ提供に関する指針」に従い、広島大学側および量子科学技術研究開発機構それぞれでの倫理申請を行い、オプトアウト期間を得て、実験を開始した。miRNA 抽出を行ったが、次世代シーケンスを行うためのライブラリー作製が上手くいかず、いくつか方法を試したが、この時点で血液検体を使用した遺伝子発現解析を断念せざるを得ない状況となった。

粘膜悪性黒色腫患者の患者検体を使用し、細胞株樹立を行った。粘膜悪性黒色腫細胞株の樹立に関しては、現在のところ 2 検体で、D-MEM 培地での増殖を認めることができている。継続培養しながら繊維芽細胞の混入がないことを確認していく。



RIKEN BRC から供与された粘膜悪性黒色腫細胞株を使用して、PDGF 阻害剤による細胞増殖抑制作用について検討を行った。粘膜悪性黒色腫細胞株は、PDGF 阻害薬によって増殖を抑制された。PDGF 阻害薬による細胞増殖抑制作用は、JAK1/2 阻害薬によって、相乗的に増強した（40 μ M）。粘膜悪性黒色腫細胞を用いて、細胞装飾に関わる細胞内シグナル伝達経路を明らかにし、細胞増殖機構を詳細にすることによって新たな分子標的治療法の候補たんぱく質を検索する。本研究に関しては、まだ終了しておらず、今後も継続して研究を行う。



国立研究開発法人 量子科学技術研究開発機構との共同研究で、重粒子線治療のためのオルガノイドを用いた基盤的研究を行う予定であった。予備実験として、粘膜悪性黒色腫細胞株を単層培養で重粒子線をいくつかの dose で照射し、条件設定を行った。重粒子線による DNA 損傷のマーカで細胞殺傷効果を検討した。重粒子線照射後の悪性黒色腫細胞株は、細胞死に誘導されたが、P53 たんぱく質の強発現は照射直後から観察された。広島大学の研究協力者が量子科学技術研究開発機構に赴き実習生として予備実験を行っていたが、新型コロナウイルス感染拡大の影響で現地での研究の継続が不可能となった。

<参考文献>

藤井万紀子、小藤昌志 重粒子線を主体とした頭頸部がん集学的治療の展望（北隆館） Bio Clinica 34 (4) : 428-432 2019

Hoang NTD, Hassan G, Suehiro T, Mine Y, Matsuki T, Fujii M. BMP and activin membrane-bound inhibitor regulate connective tissue growth factor controlling mesothelioma cell proliferation BMC Cancer. 22:984 2022

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 Hoang Nguyen Truong Duc, Hassan Ghmkin, Suehiro Tomoya, Mine Yuichi, Matsuki Tohru, Fujii Makiko	4. 巻 22
2. 論文標題 BMP and activin membrane-bound inhibitor regulate connective tissue growth factor controlling mesothelioma cell proliferation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 984
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12885-022-10080-x	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8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Truong Duc Hoang Nguyen, Tomoya Suehiro, Yuichi Mine, Makiko Fujii
2. 発表標題 Regulation of mesothelioma cell proliferation by connective tissue growth factor via membrane-bound inhibitor expression
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomoya Suehiro, Truong Duc Hoang Nguyen, Yuichi Mine, Makiko Fujii
2. 発表標題 Examination of PDGFR pathway as a new target for malignant mesothelioma treatment
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 末廣智也、NGUYEN TRUONG DUC HOANG、峯裕一、藤井万紀子
2. 発表標題 Therapeutic development based on personalized medicine for malignant mesothelioma.
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 末廣智也、二川浩樹、藤井万紀子
2. 発表標題 Inhibitory effects of molecular targeting agents and signal transduction mechanism in malignant mesothelioma
3. 学会等名 2nd International Oral Health Engineering Consortium
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nguyen Truong Duc Hoang, 末廣智也、峯裕一、藤井万紀子
2. 発表標題 The activity of CTGF in cytoplasm in cancer cells
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nguyen Truong Duc Hoang, 末廣智也、峯裕一、藤井万紀子
2. 発表標題 CTGF regulates the expression of BAMBI and controls the proliferation of mesothelioma cells
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 末廣智也、Truong Duc Hoang Nguyen、峯裕一、藤井万紀子
2. 発表標題 Examination of the efficacies of PDGF receptors for the treatment of malignant mesothelioma
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 末廣智也、Truong Duc Hoang Nguyen、峯裕一、藤井万紀子
2. 発表標題 PDGFR regulates cell proliferation through CTGF expression
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

〔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
研究分担者	小藤 昌志 (Koto Masashi) (10375066)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所 重粒子線治療研究部・部長(定常) (82502)	
研究分担者	今井 高志 (Imai Takashi) (50183009)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・QST病院・室長(任常) (82502)	
研究分担者	柿本 直也 (Kakimoto Naoya) (50324794)	広島大学・医系科学研究科(歯)・教授 (15401)	
研究分担者	峯 裕一 (Mine Yuichi) (60605989)	広島大学・医系科学研究科(歯)・講師 (15401)	
研究分担者	小池 学 (Koike Manabu) (70280740)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所 重粒子線治療研究部・上席研究員(定常) (82502)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	Verdonschot RG (Verdonschot RG) (30756094)	広島大学・医系科学研究科(歯)・助教 (15401)	2021.4 所属研究機関辞職

	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
研究協力者	末廣 智也 (Tomoya Suehiro)		
研究協力者	上田 勉 (Ueda Tsutomu) (70522928)	広島大学・医系科学研究科・准教授 (15401)	
研究協力者	田原 栄俊 (Tahara Hidetoshi) (00271065)	広島大学・医系科学研究科・教授 (15401)	

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