

令和 3 年 4 月 21 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K19237

研究課題名(和文) 口腔扁平上皮癌のNrf2抗酸化経路を介した放射線耐性機構の解明と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Elucidate the mechanism of radioresistance via Nrf2 anti-oxidative pathway in oral squamous cell carcinoma and development of novel therapeutic strategy

研究代表者

松岡 祐一郎 (Matsuoka, Yuichiro)

熊本大学・病院・医員

研究者番号：10802100

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：口腔扁平上皮癌(以下、OSCC)におけるNrf2抗酸化経路を介する放射線耐性機構の解明と新規治療法の開発を推進し、以下の点について明らかにした。1) in vivo 担癌マウスモデルにおいて、IL-6阻害剤トシリズマブ併用放射線療法は対照群と比較して腫瘍増殖を経時的に有意に抑制した。2) トシリズマブはIL-6刺激による下流のSTAT3経路、Nrf2抗酸化経路を抑制することで放射線感受性を増感させた。3) OSCC患者110例の生検標本を用いたリン酸化Nrf2の免疫組織化学的染色を行った。リン酸化Nrf2高発現患者群は術前化学放射線療法の不良な治療効果と有意な相関関係を認め、有意に予後不良であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、従来のより臨床的なプロトコルの放射線療法とIL-6シグナリングを標的とした治療法の併用の可能性を模索することは、口腔扁平上皮癌の放射線耐性を克服という観点から重要かつ独創的なアプローチである。また、トシリズマブは、関節リウマチなどに対して既に承認されており、高い効果を示している。従って、このトシリズマブを用いた非臨床試験の良好な結果は、トシリズマブはドラッグ・リ・ポジショニングの観点からも臨床試験のデザインにおいて非常に期待できる。さらに、本研究ではがん微小環境においてOSCC細胞のNrf2抗酸化経路を介した放射線耐性機構の更なる解明を目指した。

研究成果の概要(英文)：We investigated the mechanism of radioresistance via Nrf2 anti-oxidative pathway in oral squamous cell carcinoma (OSCC) and developed novel therapies, and obtained the following results. 1) The radiotherapy (X-rays 4 Gy/day, total 60 Gy) that combined tocilizumab significantly suppressed the tumor growth in vivo mice model. 2) The tocilizumab sensitized radiosensitivity by suppressing STAT3 pathway and Nrf2 anti-oxidative pathway stimulated by IL-6 in vivo mice model. 3) We analyzed the expression of phosphorylated Nrf2 in the immunohistochemical staining using biopsy specimens of 110 OSCC patients. A high phosphorylated Nrf2 tumour expression was significantly correlated with a poor response to preoperative chemoradiotherapy. A Kaplan-Meier analysis revealed that higher numbers of phosphorylated Nrf2 were significantly correlated with a poor prognosis.

研究分野：口腔扁平上皮癌

キーワード：口腔癌 口腔扁平上皮癌 放射線耐性 Nrf2 IL-6 トシリズマブ

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

OSCC を含む頭頸部癌において、放射線治療は重要な治療戦略の一つであるため、治療法として選択される場面が多く、頭頸部癌患者のうち、放射線治療を受ける患者の割合は約 78%と高い (Cancer. 103:2216-27, 2005)。一般的に、放射線治療は、放射線と水が反応して生じる活性酸素 (Reactive oxygen species: ROS) の発生を通して DNA 損傷を引き起こすことによって癌細胞を効果的に死滅させる (Crit. Rev. Oncol. Hematol. 88:706-15, 2013)。しかし、抗酸化能力の高い癌細胞は ROS スカベンジャーにより放射線障害から逃避することで抵抗性を獲得している (Nature 458:780-3, 2009)。従って、放射線抵抗性を解明することが OSCC 患者の予後の改善に大きく貢献すると考えられるが、未だ詳細なメカニズムは不明な点が多い。

癌において IL-6 は、慢性炎症構築に重要であり、免疫逃避や腫瘍増進的に機能すると言われている (Front. Oncol. 2:58, 2012)。しかし、OSCC における IL-6 の発現と化学・放射線療法の治療抵抗性との関連に関しては不明な点が多く、IL-6 シグナリングの制御が OSCC の放射線治療抵抗性の克服に関わるかは検討されていない。近年、癌関連線維芽細胞 (CAFs) 及び腫瘍随伴マクロファージ (TAMs) などを構成要素とするがん微小環境が癌の増悪、進展に極めて重要な因子であることがますます認識されている (Nat. Rev. Cancer. 6:392-401, 2006)。申請者らは、OSCC においてがん微小環境における TAMs が化学放射線療法の治療効果と患者の不良な予後に影響を与えることを明らかにした (APMIS 123(3):205-14, 2015)。また、OSCC 患者における血中 IL-6 濃度が局所および全身性炎症反応と強く正の相関を示し、全身性炎症反応が強い患者ほど局所の癌組織に対する化学放射線療法の効果が低下していることを報告した (BMC cancer 16:41, 2016)。このように IL-6 は腫瘍細胞そのものだけでなく、がん微小環境においても重要であり、がんの悪性度増加や進展、および腫瘍促進的な環境の構築に関与していると考えられる。

Keap1-Nrf2 システムは酸化ストレスや様々な毒物に対する生体内の防御反応として重要な役割を果たしている (Genes. Cells. 16:123-40, 2011)。活性化した Nrf2 は、Nrf2 抗酸化経路を介してがん細胞の ROS レベルを低くすることで ROS の解毒の調節に関与しており、放射線に対する抵抗性を増加させる (Nature 475:106-9, 2011)。申請者らはこれまでに、がん微小環境において IL-6 が Nrf2 抗酸化経路を介して酸化ストレスを調節することで OSCC の放射線抵抗性に影響を与えることを明らかにした (Br. J. Cancer. 8;115(10):1234-1244, 2016) (図 1)。したがって、IL-6 シグナリングの阻害は、放射線治療に抵抗性を示す OSCC 患者において治療効果改善と生存率向上につながる可能性があるが、その研究は未だ途上である。

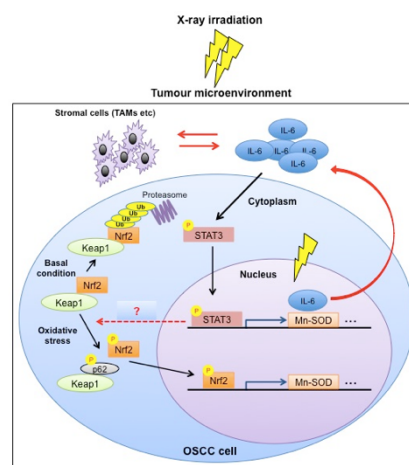


図 1. IL-6 依存的な放射線耐性モデル

2. 研究の目的

現在、OSCC を含む頭頸部癌において IL-6 阻害剤トシリズマブを用いた治療法、研究はほとんどなく、OSCC を含む頭頸部癌は、過去 30 年間明らかな予後の改善が認められていない。このことは、癌の治療抵抗性を新たな視点から理解する必要があることを顕著に示している。これまでの結果から、IL-6 と Nrf2 抗酸化経路との間に相互作用があることを見出した点は、IL-6 を標的とする新規治療開発の観点で意義が深い。そのため、従来の放射線療法に IL-6 シグナリングを標的とする治療法を併用することは、OSCC 患者の放射線耐性を克服するための新しいアプローチになる可能性を示唆している。また、トシリズマブを用いた非臨床試験の結果が良好なものであるならば、トシリズマブはドラッグ・リ・ポジショニングの観点からも臨床試験のデザインにおいて非常に期待できる。

そこで本研究の目的は、OSCC 患者に対するより有効性の高い放射線療法の開発を目指して、① *in vivo* 担癌マウスモデルにおけるトシリズマブ併用放射線療法の有効性の検討、② がん微小環境における OSCC 細胞の Nrf2 抗酸化経路を介した放射線耐性機構の更なる解明を行うことである。

3. 研究の方法

- ① ヒト癌細胞を移植した免疫不全マウス (Bulb/c-nu/nu) (雌 6 週齢) を用いて、IL-6 阻害剤であるトシリズマブを投与して放射線分割照射を行う。トシリズマブの抗腫瘍効果の検討、およびトシリズマブ併用のより臨床プロトコルに則した放射線治療の有効性の検討を行った。
- ② OSCC 患者 110 症例の生検標本を用いたリン酸化 Nrf2 の免疫組織化学的染色で発現解析を行った。そして、各種臨床病理学的項目との関連性を統計学的に解析した。

4. 研究成果

① 免疫不全マウス (Bulb/c-nu/nu) (雌 6 週齢) を用いた異種移植モデルにてトシリズマブを投与し、移植腫瘍の放射線感受性の変化を検討した (図 2)。具体的には、免疫不全マウスに塩酸ケタミン 75mg/Kg+塩酸メドトミジン 1.0 mg/Kg を生理食塩水で希釈し腹腔内投与して麻酔をかけた後、SAS 細胞株 (1×10^7) を背部に皮下移植した。その後、SAS 細胞が生着し、一定のサイズ (基準: 150 mm^3) に増大した時点から、①ヒト抗 IgG 抗体 100 μl (Sigma)、②ヒト化抗 IL-6 受容体抗体 100 $\mu\text{g}/100 \text{ }\mu\text{l}$ の 2 群 (各群 $n=5-10$) に分けてそれぞれの試薬を腹腔内投与する。また、同時に X 線 6 Gy/日、連続 7 日間、合計 42 Gy を照射した (MBR-1520R; Hitachi)。トシリズマブは 48 時間毎に投与 (3 回) した。48 時間毎に移植腫瘍のサイズ、体積を計測した。最後の照射が終了した時点から 24 時間後に屠殺を行い、移植腫瘍片および各種臓器の摘出を行った。

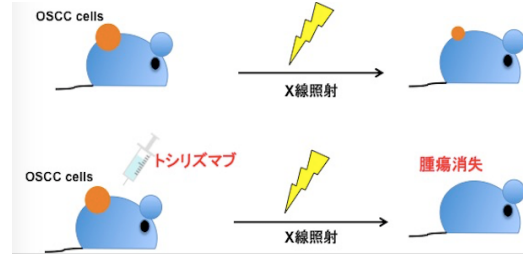


図 2. *in vivo* マウス実験系の概要

本プロトコルでは、トシリズマブ投与群において対照群と比較して腫瘍増殖が有意に抑制されたことを予備実験として確認していた (図 3)。また、より臨床的な放射線プロトコルに則した線量を照射することを目的に X 線 4 Gy/日、20 Gy/週、合計 60 Gy を照射した。トシリズマブ投与群において、対照群と比較して腫瘍増殖が経時的に有意に抑制され、縮小を認めた (図 4)。また、また、得られた腫瘍片を用いて免疫組織学的染色を行ったところ、トシリズマブ投与群において、リン酸化 Nrf2 の発現が低下していることが明らかとなった (図 5)。

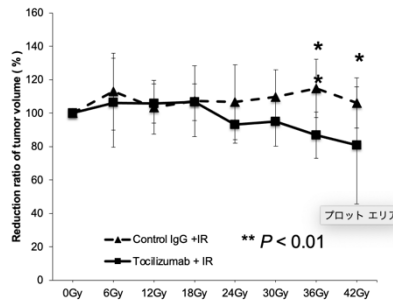


図 3. トシリズマブによる放射線感受性の向上

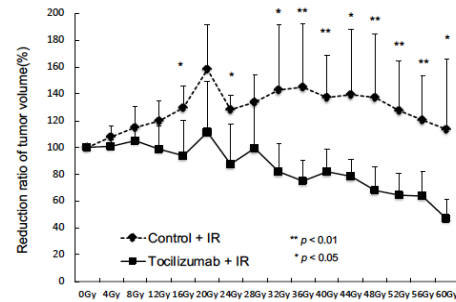


図 4. トシリズマブによる放射線感受性の向上

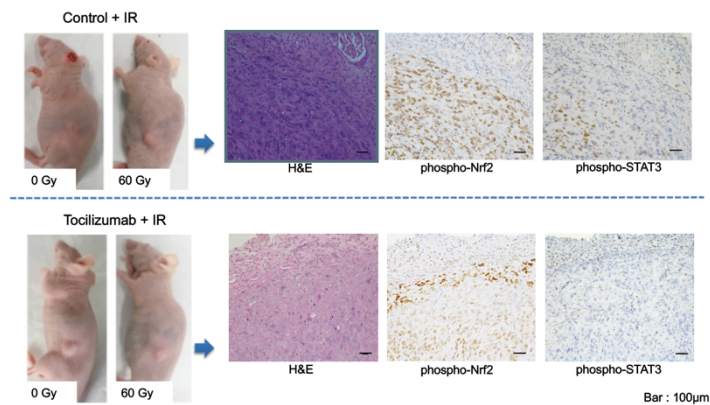


図 5. 放射線照射後の OSCC 異種移植担癌マウスモデルの免疫組織学的検討

② OSCC 組織において、リン酸化 Nrf2 は主に癌細胞の核内に発現を認めた (図 6)。過去の文献からも、Nrf2 の活性化フォームとしてリン酸化 Nrf2 は核内で機能していると推察される。

次に、リン酸化 Nrf2 の発現に基づく OSCC 患者の臨床病理学的因子との関連性を単変量解析にて検討したところ、OSCC 患者 110 例のうちリン酸化 Nrf2 高発現であった患者は 46 症例 (41.8%) であり、リン酸化 Nrf2 の発現は化学放射線療法に対する組織学的治療効果と相関を認めた (図 7)。

続いて、OSCC 患者におけるリン酸化 Nrf2 の発現が患者予後に与える影響について Kaplan-Meier 生存曲線を log-rank 検定にて解析した。リン酸化 Nrf2 を高発現している患者は、5 年全生存率、5 年無病生存率ともに有意に低く、予後不良であることが明らかとなった (表 1)。さらに、Cox 比例ハザードモデルを用いて多変量解析を行ったところ、pathological N stage、化学放射線療法に対する治療効果とともに、リン酸化 Nrf2 の発現が OSCC の予後予測因子であるこ

とが明らかとなった(表2)。

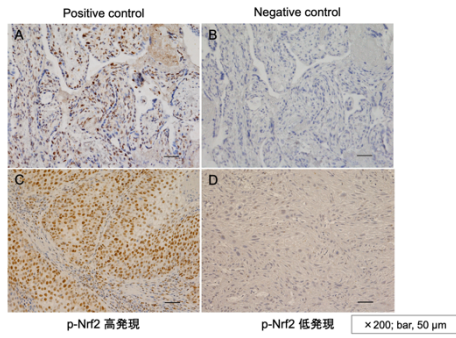


図6. OSCC組織におけるリン酸化Nrf2の免疫染色像

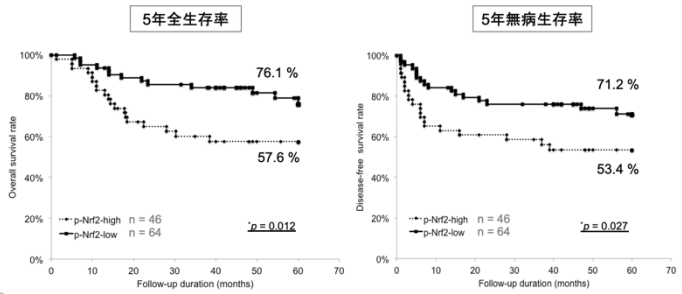


図7. OSCC 110例の患者におけるリン酸化Nrf2の発現の予後への影響

表1. リン酸化Nrf2の発現に基づくOSCC患者の臨床病理学的特徴

Characteristics	Total	p-Nrf2 status		p-value
		Low n (%)	High n (%)	
	110	64 (58.2)	46 (41.8)	
Age, years				
Median	67.0	67.4	66.5	
Range	30-87	30-85	33-87	
≤ 65	45	25 (55.6)	20 (44.4)	0.642
> 65	65	39 (60.0)	26 (40.0)	
Sex				0.528
Male	66	40 (60.6)	26 (39.4)	
Female	44	24 (54.5)	20 (45.5)	
Primary site				0.742
Tongue	34	17 (50.0)	17 (50.0)	
Mandible	25	16 (64.0)	9 (36.0)	
Maxilla	22	13 (59.1)	9 (40.9)	
Oral floor	13	9 (69.2)	4 (30.8)	
Buccal mucosa	16	9 (56.3)	7 (43.7)	
pT-stage				0.951
T2	42	24 (57.1)	18 (42.9)	
T3	28	17 (60.7)	11 (39.3)	
T4	40	23 (57.5)	17 (42.5)	
pN-stage				0.977
N = 0	62	36 (58.1)	26 (41.9)	
N ≥ 1	48	28 (58.3)	20 (41.7)	
Clinical stage				0.541
II	13	7 (53.8)	6 (46.2)	
III	30	20 (66.7)	10 (33.3)	
IV	67	37 (55.2)	30 (44.8)	
Differentiation				0.549
Well	89	53 (59.6)	36 (40.4)	
Moderate	21	11 (52.4)	10 (47.6)	
Mode of invasion				0.967
Grade I	2	2 (100.0)	0 (0.0)	
Grade II	18	10 (55.6)	8 (44.4)	
Grade III	62	35 (56.5)	27 (43.5)	
Grade IVc, Ivd	28	17 (60.7)	11 (39.3)	
Pathological response				0.010*
Grade = 0, I, IIa	21	7 (33.3)	14 (66.7)	
Grade ≥ IIb	89	57 (64.0)	32 (36.0)	

The chi-square test was used to examine the relationship between the p-Nrf2 expression and the clinicopathological factors. *, p < 0.05.

表2. Cox 比例ハザードモデルを用いたOSCC 予後予測因子の多変量解析

Variables	Assigned score	OS		DFS	
		Hazard ratio (95% CI)	p-value	Hazard ratio (95% CI)	p-value
Age, years					
≤ 65	0	0.852 (0.354-2.024)	0.716	1.200 (0.556-2.614)	0.642
> 65	1				
Sex					
Male	0	0.792 (0.352-1.747)	0.564	0.873 (0.419-1.791)	0.712
Female	1				
Primary site					
Tongue	1	0.922 (0.710-1.181)	0.527	1.065 (0.421-2.614)	0.892
Mandible	2				
Maxilla	3				
Oral floor	4				
Buccal mucosa	5				
pT-stage					
T2	1	1.098 (0.716-1.700)	0.668	2.263 (0.710-7.492)	0.168
T3	2				
T4	3				
pN-stage					
N = 0	0	3.526 (1.643-8.030)	0.001**	2.822 (1.421-5.781)	0.003**
N ≥ 1	1				
Differentiation					
Well	0	1.015 (0.424-2.250)	0.923	1.035 (0.445-2.194)	0.933
Moderate	1				
Pathological response					
Grade = 0, I, IIa	0	0.284 (0.123-0.659)	0.004**	0.331 (0.158-0.711)	0.005**
Grade ≥ IIb	1				
p-Nrf2 status					
Low	0	2.224 (1.070-4.747)	0.032*	2.039 (1.041-4.041)	0.038*
High	1				

CI, confidence interval; OS, overall survival; DFS, disease-free survival; *, p < 0.05, **, p < 0.01

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sakata J, Hirose A, Yoshida R, Kawahara K, Matsuoka Y, Yamamoto T, Nakamoto M, Hirayama M, Takahashi N, Nakamura T, Arita H, Nakashima H, Nagata M, Hiraki A, Shinohara M, Nakayama H	4. 巻 20
2. 論文標題 HMGA2 Contributes to Distant Metastasis and Poor Prognosis by Promoting Angiogenesis in Oral Squamous Cell Carcinoma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International journal of molecular sciences	6. 最初と最後の頁 2473
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms20102473	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 akata J, Yoshida R, Matsuoka Y, Kawahara K, Arita H, Nakashima H, Hirose A, Naito H, Takeshita H, Kawaguchi S, Gohara S, Nagao Y, Yamana K, Hiraki A, Shinohara M, Ito T, Nakayama H	4. 巻 32
2. 論文標題 FOXP3 lymphocyte status may predict the risk of malignant transformation in oral leukoplakia.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology	6. 最初と最後の頁 33-39
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sakata J, Hirose A, Yoshida R, Matsuoka Y, Kawahara K, Arita H, Nakashima H, Yamamoto T, Nagata M, Kawaguchi S, Gohara S, Nagao Y, Yamana K, Toya R, Murakami R, Kuwahara Y, Fukumoto M, Nakayama H	4. 巻 12
2. 論文標題 Enhanced Expression of IGF1P-3 Reduces Radiosensitivity and Is Associated with Poor Prognosis in Oral Squamous Cell Carcinoma.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers12020494.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsuoka Yuichirou, Asuka Iwamoto, Ryoji Yoshida, Kojima Taku, Hirayama Masatoshi, Nozomu Takahashi, Masafumi Nakamoto and Hideki Nakayama.	4. 巻 -
2. 論文標題 A rare intraosseous schwannoma in the maxillary left incisor region: A case report.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 松岡 祐一郎、吉田 遼司、廣末 晃之、小島 拓、緒方 克守、中山 秀樹	4. 巻 66
2. 論文標題 鎖骨上窩と上縦隔に波及した舌下顎下型ラヌーラの1例	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本口腔外科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Yuichiro Matsuoka, Hidetaka Arita, Ryoji Yoshida, Junki Sakata, Hikaru Nakashima, Kenta Kawahara, Masashi Nagaata, Akiyuki Hiroseue, Masanori Shinohara, Hideki Nakayama
2. 発表標題 IL-6シグナル阻害剤トシリズマブは口腔扁平上皮癌の放射線感受性を増感する
3. 学会等名 第64回 日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------