

令和 4 年 5 月 20 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18700

研究課題名（和文）PARPを標的とした口腔癌の放射線抵抗性機構の解明と新規治療戦略の創出

研究課題名（英文）Elucidation of radiation resistance mechanism of oral cancer targeting PARP and creation of new treatment strategy

研究代表者

坂田 純基（Sakata, Junki）

熊本大学・病院・医員

研究者番号：70823326

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）：PARPは主にDNA一本鎖切断の修復に関与しており、オラパリブはPARPを阻害することでDNA一本鎖切断の修復を妨げ細胞死を招く。本研究では口腔癌におけるオラパリブの効果について検討を行った。その結果、口腔扁平上皮癌においてオラパリブ併用によりシスプラチンおよび放射線の治療効果が向上する可能性が示された。腺様嚢胞癌において、オラパリブ併用により放射線の治療効果が向上する可能性が示された。治療効果増強の機序として、抗癌剤や放射線照射により障害を受けたDNAがオラパリブによりDNA単鎖修復が阻害され、より致死的なDNA二重鎖切断が生じている可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔癌において放射線治療との併用による有用性が示されている抗癌剤は限られているのが現状であるが、本研究の結果、オラパリブを放射線治療やシスプラチンのようなDNAに作用する一部の抗癌剤と併用することで治療効果が向上する可能性が示された。PARPを標的とした治療を応用することにより、口腔癌患者の予後が改善する可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：PARP is mainly involved in the repair of DNA single-strand breaks, and olaparib inhibits PARP to prevent the repair of DNA single-strand breaks, leading to cell death. In this study, we investigated the effect of olaparib on oral cancer. As a result, it was shown that the therapeutic effect of cisplatin and radiation may be improved by the combined use of olaparib in oral squamous cell carcinoma. In adenoid cystic carcinoma, it was shown that the combined use of olaparib may improve the therapeutic effect of radiation. As a mechanism for enhancing the therapeutic effect, it is possible that DNA single-strand repair is inhibited by olaparib in DNA damaged by anticancer agents or irradiation, resulting in more lethal DNA damages.

研究分野：口腔外科学

キーワード：口腔癌 治療抵抗性 PARP

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

口腔扁平上皮癌(Oral squamous cell carcinoma: OSCC)を含む口腔がんにおいて、放射線治療は重要な治療戦略の一つであり、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(Delaney et al. Cancer 2005)。一方で、放射線との併用による有用性が示されている抗癌剤はまだ限られているのが現状である。放射線による生物に対する影響は、放射線と水が反応して生じる活性酸素の発生を通してDNAに損傷を与えることにより引き起こされる(Zhou et al. Crit Rev Oncol Hematol 2013)。DNA鎖の損傷は二本鎖の片側だけに切断が起こる場合(DNA一本鎖切断)と両側が切断される場合(DNA二本鎖切断)とがあるが、二本鎖切断の方がより致命的な損傷である。ヒトの細胞に1GyのX線を照射すると、1細胞あたり約40個のDNA二本鎖切断と約1000個のDNA一本鎖切断が生じるとされている(Vilenchik et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2003)。これらの知見から、癌細胞により多くの損傷およびDNA二本鎖切断を生じさせることが放射線治療の治療効果向上に寄与するものと考えられる。

今回着目したPARPは主にDNA一本鎖切断の修復に関与しており、DNA損傷部位に結合し修復タンパクの誘導、活性化を行っている(Karolina et al. Menopause Rev 2016)。オラパリブはそのPARPを阻害することでDNA一本鎖切断の修復を妨げ、修復されなくなったDNAの一本鎖切断はより重篤な二本鎖切断へ至り、これらが蓄積することで細胞死を招く。

PARP阻害剤であるオラパリブはBRCA1/2遺伝子に変異を有する卵巣癌や乳癌でその有効性が示されており、今後も適応の拡大が予想される。OSCCにおいてはオラパリブとシスプラチンの併用による相乗効果についての報告(Yasukawa et al. Int J Mol Sci 2016)があるが、放射線との併用効果や他の悪性形質との影響についてはまだ明らかになっていない。

2. 研究の目的

上述のような学術的背景と問いを出発点として、本研究ではOSCC患者に対するより有効性の高い治療法の開発を目指してPARP阻害剤オラパリブのOSCCへの応用に向けた基礎的情報を蓄積することが目的である。

3. 研究の方法

(1) OSCC細胞株、腺様嚢胞癌(Adenocystic carcinoma; ACC)細胞株におけるオラパリブ感受性の検討

OSCC細胞株(SAS, KON)とACC細胞株(ACC-S, ACC-3)に各濃度のOlaparibを加え72時間培養後、生存細胞の活性をWST-8で測定し評価した。

(2) OSCC細胞株、ACC細胞株におけるオラパリブ投与による抗癌剤感受性変化の検討

OSCC細胞株とACC細胞株に各濃度のOlaparibを加え12時間培養後、さらに各濃度のCDDPまたは5-FUを培養細胞に加え72時間培養し、生存細胞の活性をWST-8(Cell Counting kit-8, Dojindo)で測定し評価した。

(3) OSCC細胞株、ACC細胞株におけるオラパリブ投与による放射線感受性変化の検討

OSCC細胞株とACC細胞株(ACC-S, ACC-3)を用いて、modified high-density survival assay(径60mmの培養皿に細胞を 2.5×10^5 個播種し、48時間培養後、放射線を5または10Gy照射し、その6日後に生存細胞数を測定)で放射線感受性を評価した。

(4) オラパリブ投与による放射線照射後のDNA二重鎖切断への影響の検討

OSCC細胞株にOlaparib $10 \mu\text{g/ml}$ を投与して24時間後に放射線10Gy照射し、照射後30分と24時間で細胞を固定し、DNA二重鎖切断マーカーであるH2AXを免疫蛍光染色法で染色し、その発現を確認した。

4. 研究成果

(1) OSCC細胞株、ACC細胞株におけるオラパリブ感受性について

OSCC細胞株ではオラパリブ濃度依存的に細胞増殖抑制効果を認めたと、ACC細胞株では明らかな増殖抑制効果は認められなかった(図1)。

(2) OSCC細胞株、ACC細胞株におけるオラパリブ投与による抗癌剤感受性変化について

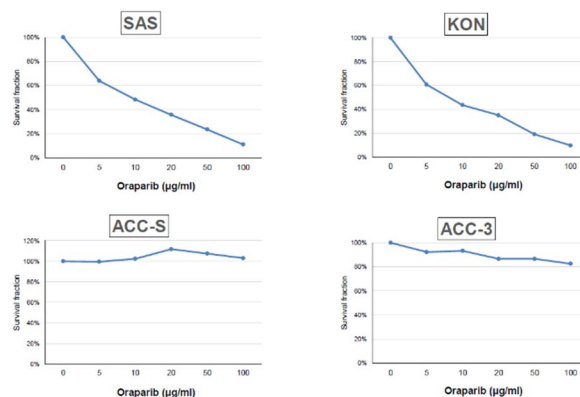


図1 オラパリブ単剤での効果

OSCC 細胞株、ACC 細胞株ともオラパリブによる放射線の増強効果を認めた (図 2)

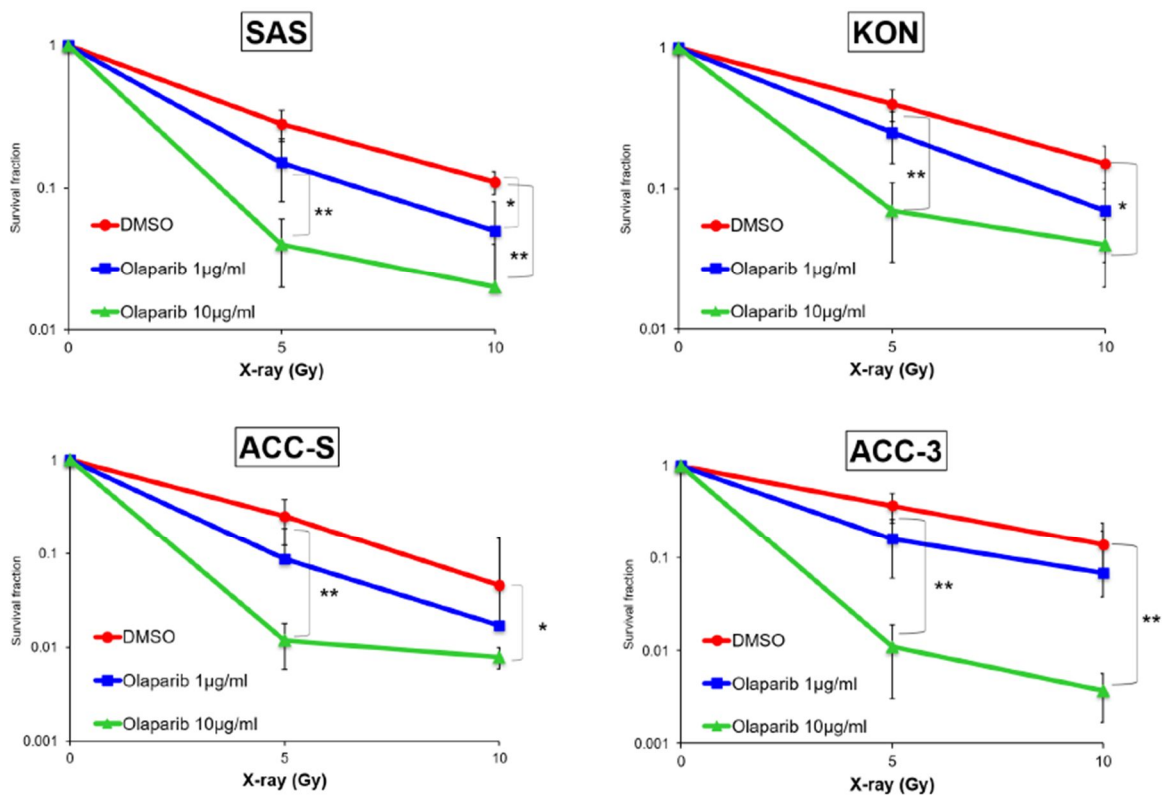
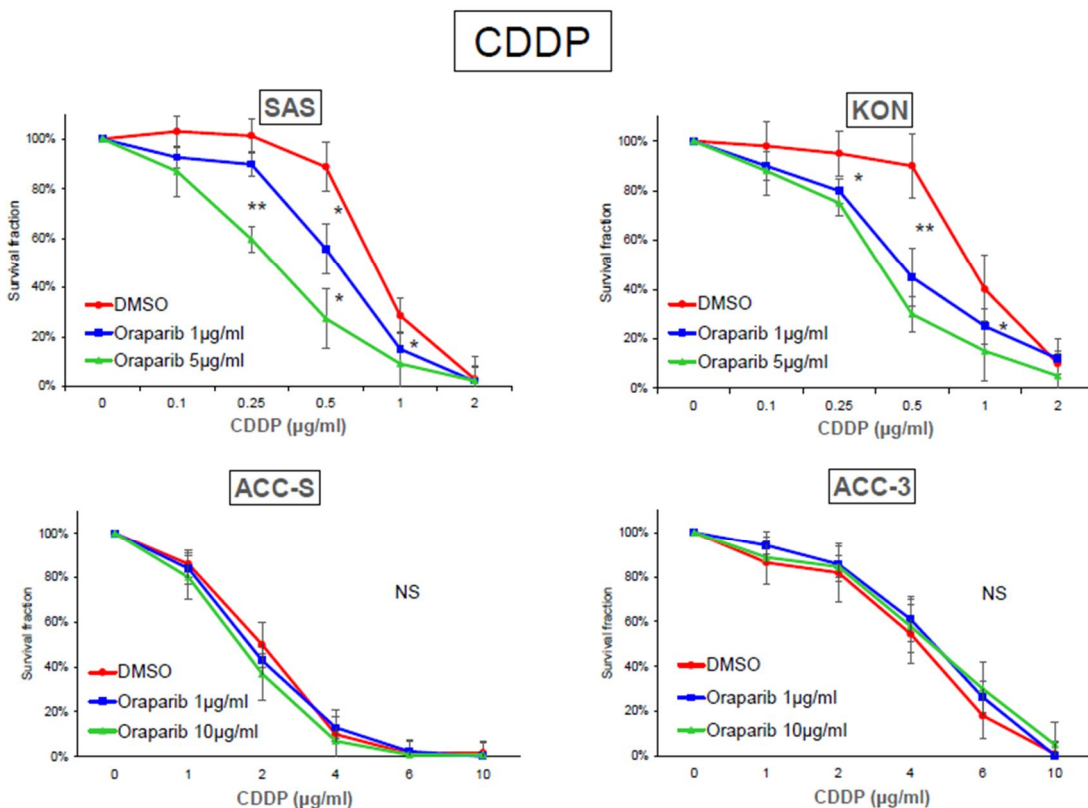


図 2 オラパリブによる放射線感受性変化

(3) OSCC 細胞株、ACC 細胞株におけるオラパリブ投与による放射線感受性変化について OSCC 細胞株においてオラパリブにより CDDP の増強効果を認めた。一方、ACC 細胞株では明らかな CDDP の増強効果は認められなかった。また OSCC 細胞株、ACC 細胞株ともにオラパリブによる 5-FU の増強効果は認められなかった (図 3)



5-FU

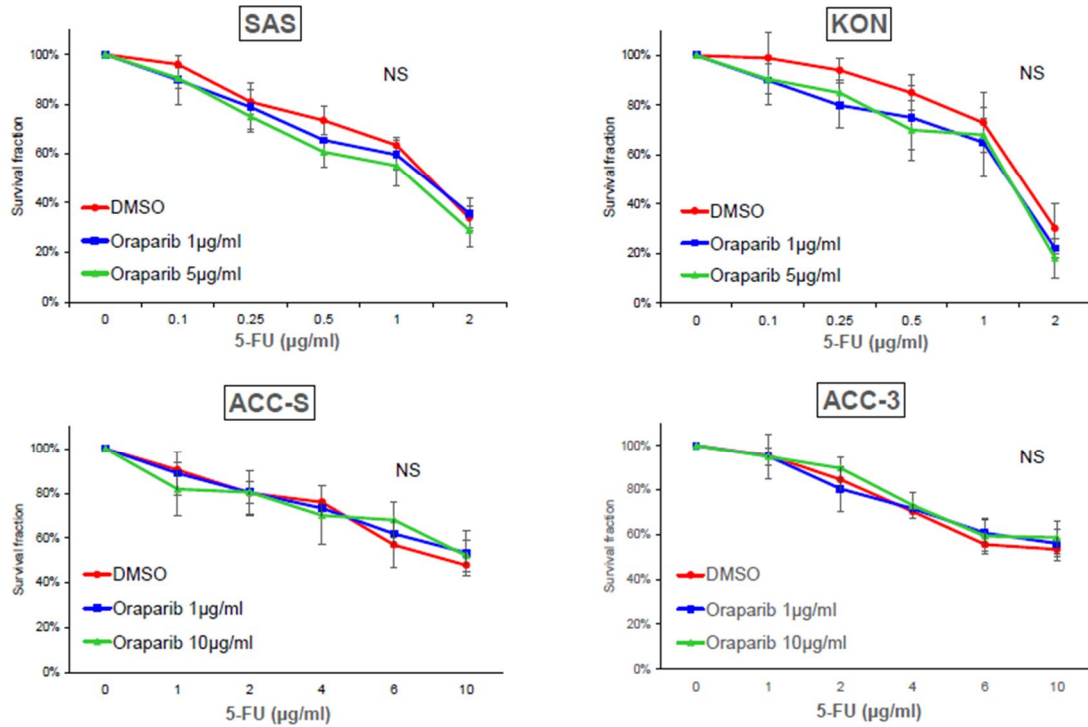


図3 オラパリブによる抗癌剤感受性変化

(4) オラパリブ投与による放射線照射後の DNA 二重鎖切断への影響について
 オラパリブを投与した細胞において、放射線照射 24 時間も DNA 二重鎖切断マーカーである γ -H2AX 発現の残存を認めた (図4)。

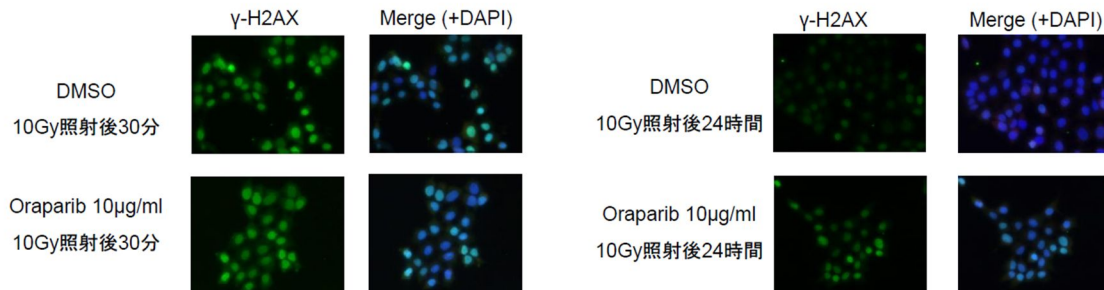


図4 放射線照射後の細胞における γ -H2AX の発現変化

以上の結果より、OSCC において、オラパリブ併用により CDDP および放射線の治療効果が向上する可能性が示された。ACC において、オラパリブ併用により放射線の治療効果が向上する可能性が示された。治療効果増強の機序として、抗癌剤や放射線照射により障害を受けた DNA がオラパリブにより DNA 単鎖修復が阻害され、より致命的な DNA 二重鎖切断が生じている可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Sakata Junki, Hirose Akiyuki, Yoshida Ryoji, Matsuoka Yuichiro, Kawahara Kenta, Arita Hidetaka, Nakashima Hikaru, Yamamoto Tatsuro, Nagata Masashi, Kawaguchi Sho, Gohara Shunsuke, Nagao Yuka, Yamana Keisuke, Toya Ryo, Murakami Ryuji, Kuwahara Yoshikazu, Fukumoto Manabu, Nakayama Hideki | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 Enhanced Expression of IGFBP-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 494 ~ 494 |
| 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 オープンアクセスとしている(また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Yamamoto Tatsuro, Hirose Akiyuki, Nakamoto Masafumi, Yoshida Ryoji, Sakata Junki, Matsuoka Yuichiro, Kawahara Kenta, Nagao Yuka, Nagata Masashi, Takahashi Nozomu, Hiraki Akimitsu, Shinohara Masanori, Nakao Mitsuyoshi, Saitoh Noriko, Nakayama Hideki | 4. 巻 123 |
| 2. 論文標題 BRD4 promotes metastatic potential in oral squamous cell carcinoma through the epigenetic regulation of the MMP2 gene | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 British Journal of Cancer | 6. 最初と最後の頁 580 ~ 590 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41416-020-0907-6 | 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 Yoshida Ryoji, Gohara Shunsuke, Sakata Junki, Matsuoka Yuichiro, Hirose Akiyuki, Kawahara Kenta, Kawaguchi Sho, Nagao Yuka, Yamana Keisuke, Nagata Masashi, Fukuma Daiki, Toya Ryo, Murakami Ryuji, Hiraki Akimitsu, Shinohara Masanori, Nakayama Hideki | 4. 巻 13 |
| 2. 論文標題 Onodera's prognostic nutritional index correlates with tumor immune environment and survival in patients with oral squamous cell carcinoma undergoing chemoradiotherapy | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Translational Oncology | 6. 最初と最後の頁 100850 ~ 100850 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tranon.2020.100850 | 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 坂田純基、廣末晃之、井上淳貴、有田英生、松岡祐一郎、平山真敏、川原健太、永田将士、吉田遼司、中山秀樹 |
| 2. 発表標題 口腔癌に対するPARP阻害剤オラパリブと抗癌剤および放射線併用効果の検討 |
| 3. 学会等名 第34回日本口腔診断学会・第31回日本口腔内科学会 合同学術大会 |
| 4. 発表年 2021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 |
|---------|---------|
|---------|---------|