

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K10143

研究課題名(和文) 抗claudin-4抗体による口腔癌に対する化学療法の増強効果

研究課題名(英文) Synergistic effect of anti-claudin-4 antibody on chemotherapy for oral cancer

研究代表者

山本 一彦 (Yamamoto, Kazuhiko)

奈良県立医科大学・医学部・研究員

研究者番号：20243842

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)：抗claudin-4抗体はヒト口腔扁平上皮癌株において濃度依存性に増殖阻害、浸潤抑制、アポトーシスの促進効果を示し、スフェアを用いた系でも幹細胞性への阻害作用が示された。さらに抗claudin-4抗体は5-FUおよびセツキシマブの作用を増強することが示された。claudin-4はより進行したヒト口腔扁平上皮癌において発現が亢進していることが確認されており、抗claudin-4抗体を抗がん剤と併用することにより抗腫瘍効果の増強が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗claudin-4抗体を用いることにより口腔癌に対する既存の化学療法の効果の増強が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Anti-claudin-4 antibody dose-dependently inhibits growth and invasion of oral squamous cell carcinoma line and promotes apoptosis. In sphere analysis, anti-claudin-4 antibody also shows inhibitory effect on stemness. Furthermore, anti-claudin-4 antibody shows synergistic effect on 5-FU and cetuximab. Claudin-4 strongly expressed in advanced oral cancer, and therefore synergistic antitumor effect is expected by combination of anti-claudin-4 antibody with anti-cancer drugs.

研究分野：口腔外科学

キーワード：抗claudin-4抗体 口腔がん 化学療法

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

口腔癌の治療成績は外科療法、放射線療法の進歩により向上しているが、化学療法については現在でも主に 5-FU や CDDP を中心とした治療が選択されている。口腔癌に対する分子標的治療薬は 2 種類しかない。ひとつは EGF receptor に対するモノクローナル抗体である cetuximab であるが、その効果は限定的であり、一部の患者にしか長期的な効果はみられていない。最近になって免疫療法である PD-L1 receptor に対するモノクローナル抗体である pembrolizumab や nivolumab が導入されたが、口腔癌の治療成績を向上させることができる、より効果的な化学療法の開発が必要である。

近年、Hippo-YAP pathway についての研究が進み、この過程を標的とした薬剤の開発ががん治療の新たな戦略として有望視されている。特に、YAP/TAZ (transcriptional co-activator with a PDZ-binding domain) と TEADS (TEA domain transcription factors) の interaction を抑制することは興味深いアプローチと考えられている。なぜなら TAP/TAZ の下流にある腫瘍発生に関わるシグナルは TEADS family に属する転写因子によって制御されているからである。たとえば verteporfin は乳がんで臨床試験が行われており、口腔癌においても実験的研究が行われている。また YAP の TEAD 結合領域に類似したペプチドが YAP と TEAD の結合を抑制し胃癌や大腸癌のモデルにおいて効果的であることが報告されている。一方で TAP/TAZ の活性化につながる pathway を標的とした戦略も興味深い。dasatinib と statin のコンビネーションが TAP/TAZ の活性化抑制に効果的であるとの報告がある。実際 simvastatin が口腔扁平上皮癌の実験モデルで増殖を抑制することが報告されている。したがって、Hippo-YAP pathway を標的とした分子標的治療の開発はがん治療に新たな展開をもたらすことが期待される。

Hippo-YAP pathway は細胞内シグナルに加えて細胞の微小環境からの情報のインプットを受ける。この pathway に影響を与える主な微小環境因子は周囲の細胞とのコンタクトや細胞のオリエンテーション、細胞外マトリックスや増殖因子等である。上皮細胞では apical basolateral polarity は厳密に規定されており、細胞の極性の消失は異形成につながる。それは上皮間葉転換への最初のステップであり、上皮細胞が遺伝子レベルで形質転換して変化し、線維芽細胞のような形態と浸潤能を獲得するもので、癌細胞の指標となる性質である。上皮細胞の apical-basal axis には Hippo-YAP pathway を制御する 3 種のモジュールが異なった位置に存在する。apical 側に存在する tight junction は物質の透過性、細胞極性、増殖等を制御する。tight junction は claudin (CLDN)、裏打ちタンパク質の zona occludings (ZO-1, ZO-2) などで構成される、CLDN には 27 種のサブタイプが存在しており、健全組織での発現パターンは異なっている、また癌においてはその発現パターンが変化することが明らかとなっている。

われわれは先行研究において、CLDN-4 が口腔扁平上皮癌に発現されており、clostridium perfringens enterotoxin が CLDN-4 の核内移行を引き起こし、上皮間葉転換、stemness、細胞増殖、浸潤能を促進することを報告した (Nakashima C et al; Oncotarget 11(4): 309-321, 2020)。CLDN-4 は tight junction を形成し、癌の微小環境を維持し、細胞増殖因子を蓄積し、抗癌剤の細胞内への移行を制御するが、tight junction を形成しない CLDN-4 は integrin シグナルの

ligand として作用し、survival signal や stemness を促進する。さらにわれわれのグループは、胃癌、大腸癌、膵臓癌、乳癌において CLDN-4 に対する抗体により既存の抗癌剤への感受性が増強することを報告している。したがって、口腔扁平上皮癌においても CLDN-4 に対する抗体が Hippo-YAP pathway へのシグナルを制御することにより抗癌剤の効果を増強する可能性が推察される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、抗 CLDN-4 抗体を用いることにより口腔癌に対する既存の化学療法の効果の増強をめざすものである。抗 CLDN-4 抗体による癌化学療法の増強作用は他臓器の癌においてもその効果が示されつつあり、将来広く臨床応用されることが期待される。われわれは tight junction 構成分子である CLDN-4 が細胞内、さらに核内に移行し Hippo-YAP pathway の活性化を制御することを報告してきた。tight junction は物質の透過性を制御しており、癌微小環境における増殖因子や抗癌剤の濃度、それらの細胞内への取り込みにも関わっている。このことより CLDN-4 を標的とすることにより Hippo-YAP pathway による癌の悪性形質を抑制することのみならず、抗癌剤の細胞内への取り込みを促進させることにより、口腔癌の化学療法の効果を増強することができるとの発想に至った。

3. 研究の方法

(1) 口腔癌における CLDN-4 の発現

69 例の口腔扁平上皮癌に対して免疫染色により CLDN-4 の発現を検討した。染色強度は 0~3 の 4 段階で判定し、これに各染色強度の面積(%)を積算し 0~300 の発現強度とした。さらに、ヒト口腔扁平上皮癌細胞株、KCN、HSC3、HSC4 における CLDN-4 の mRNA 発現を検討した。

(2) 抗 CLDN-4 抗体単剤での効果

抗 CLDN-4 細胞外ドメイン抗体 (4D3) を用いて in vitro における口腔扁平上皮癌細胞への効果を検討するため、ヒト口腔扁平上皮癌細胞株 HSC3 (高転移株) および HSC4 (低転移株) を 4D3 で単独処理し、増殖、浸潤、アポトーシス、スフェア形成に対する効果と tight junction 障害について transepithelial electroresistance (TER) にて評価した。さらに CLDN-4 を siRNA によりノックダウンし、同様の評価を行った。

(3) 抗 CLDN-4 抗体と抗がん剤の併用による効果

抗 CLDN-4 細胞外ドメイン抗体 (4D3) と抗がん剤 (5FU) および分子標的薬 (セツキシマブ) との相乗効果について検討を行った。

4. 研究結果

(1) 口腔癌における CLDN-4 の発現

口腔扁平上皮癌 69 例の CLDN-4 平均発現強度は 83 ± 87 であり、32 例 (46%) は発現強度 50 未満であったのに対し、19 例 (28%) は発現強度 100 以上であった。また、CLDN-4 の発現

強度は、T 因子 (P = 0.0060)、N 因子 (P = 0.0489) および、ステージ (P = 0.0055) と有意な相関を示したが、これに対し、同じ上皮性 CLDN である CLDN-1 は、CLDN-4 のよりも発現強度は低く、T 因子、N 因子、ステージとの相関は認められなかった。ヒト口腔扁平上皮癌細胞株、KCN、HSC3、HSC4 における CLDN-4 の mRNA は、高転移株である KCN、HSC3 では HSC4 よりも高い発現が認められた。これらの結果から、口腔扁平上皮癌は、より進行した症例で CLDN-4 発現が亢進しており、抗 CLDN-4 抗体治療の適応になると考えられた。

(2) 抗 CLDN-4 抗体単剤での効果

ヒト口腔扁平上皮癌細胞株 HSC3 (高転移株) および HSC4 (低転移株) をまず抗 CLDN-4 細胞外ドメイン抗体 (4D3) で単独処理すると、抗体濃度依存性に約 20% の増殖阻害、40% の浸潤抑制、10% のアポトーシスの促進が両細胞で認められた。スフェアを用いた系でも、4D3 単独処理によりスフェア数の減少と増大の抑制が見られ、幹細胞性への阻害作用が示された。癌細胞を重層した Boyden chamber を用いて TER を計測すると抗体により TER の低下が認められ、tight junction 障害効果が確認された。スフェアにおける EGF、HIF-1、乳酸について測定すると、4D3 によりいずれも発現レベルの低下が見られた。核内 YAP も 4D3 により低下した。これに対し、CLDN-4 を siRNA によりノックダウンすると、CLDN-4 mRNA 発現は 5-10% に抑制されたが CLDN-7 の発現が増加した。増殖・浸潤の抑制やアポトーシス促進は認められず、スフェアや幹細胞性の抑制も認められなかった。TER の低下も認められず、CLDN-7 などの他の上皮性 CLDN により tight junction 機能が保持されていると考えられた。核内 YAP の低下も CLDN-4 ノックダウンでは認められなかった。このように、抗 CLDN-4 細胞外ドメイン抗体は口腔扁平上皮癌細胞に抗腫瘍効果を示した。

(3) 抗 CLDN-4 抗体と抗がん剤の併用による効果

抗 CLDN-4 細胞外ドメイン抗体 (4D3) を 5FU と併用することにより、5FU 単剤と比較に 35% の上乗せ効果が認められた。セツキシマブについても 4D3 との併用により 25% の上乗せ効果が認められた。さらにスフェアアッセイにより、併用効果を検討すると 5FU では 40%、セツキシマブでは 31% の上乗せ効果が見られ、2D よりも 3D でより併用効果が強く認められた。スフェア内への薬剤移行は、5FU では 1.8 倍に、セツキシマブでは 1.6 倍に増大していた。さらに、スフェア形成能も抗癌剤単独に比較し併用では 5FU では 1.6 倍、セツキシマブでは 1.4 倍に亢進し、幹細胞性抑制効果も促進されることが認められた。これらのことから、生体内においても、4D3 の併用は抗がん剤の腫瘍内移行を促進し、高度の抗腫瘍効果と抗がん幹細胞作用を示すことが示唆された。

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 Nakashima C, Fujiwara-Tani R, Mori S, Kishi S, Ohmori H, Fujii K, Mori T, Miyagawa Y, Yamamoto K, Kirita T, Lou Y, Kuniyasu H	4. 巻 23
2. 論文標題 An axis between the long non-coding RNA HOXA11-AS and NQOs enhances metastatic ability in oral squamous cell carcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 10704
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms231810704	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6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中嶋千恵、谷 里奈、森 汐莉、大森 斉、川原 勲、岸 真五、山本一彦、桐田忠昭、 國安弘基
2. 発表標題 がん悪液質モデル動物におけるベルベリンによる舌萎縮予防効果
3. 学会等名 第113回日本病理学会総
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 中嶋千恵、谷 里奈、森 汐莉、大森 斉、藤井 澄、岸 真五、山本一彦、桐田忠昭、 國安弘基
2. 発表標題 ヒト口腔扁平上皮癌の転移に対するHOXA11-ASの機能
3. 学会等名 第82回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中嶋千恵、谷 里奈、森 汐莉、岸 真五、山本一彦、桐田忠昭、 國安弘基
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌におけるHXA11-AS-NQO1/NQO2 axisの役割
3. 学会等名 第112回日本病理学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中嶋千恵、山本一彦、山川延宏、柳生貴裕、上田順宏、國安弘基、桐田忠昭
2. 発表標題 ME1は低酸素にある口腔扁平上皮癌においてbuddingと関わる
3. 学会等名 第60回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中嶋千恵、谷 里奈、岸 真五、森 汐莉、山本一彦、桐田忠昭、國安弘基
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌においてME1はbuddingと関わる
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中嶋千恵、谷里奈、岸真五、森汐莉、山本一彦、桐田忠昭、國安弘基
2. 発表標題 Malic enzyme 1 は口腔扁平上皮癌における腫瘍のbuddingと関連する
3. 学会等名 第111回日本病理学会総会
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	國安 弘基 (Kuniyasu Hiroki) (00253055)	奈良県立医科大学・医学部・教授 (24601)	

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