

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16950

研究課題名（和文）口腔扁平上皮癌における放射線耐性機構解明とスルファサラジン併用療法の有効性の検討

研究課題名（英文）Osteopontin-CD44 pathway confers radioresistance on oral squamous cell carcinoma cells.

研究代表者

中嶋 光（NAKASHIMA, HIKARU）

熊本大学・大学院生命科学研究部（医）・特定研究員

研究者番号：20849103

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：口腔扁平上皮癌(OSCC)において放射線治療は重要な治療戦略だが、放射線抵抗性を示す細胞の存在が患者予後を不良にする。放射線抵抗性メカニズム解明の解明や新規治療法の開発は急務である。OSCCにおけるOsteopontin(OPN)発現と放射線治療の治療効果との相関を明らかにし、基礎実験からOSCCにおけるOPN-CD44経路を介した放射線耐性能獲得の可能性を示した。また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、in vivo担癌マウスモデルにおけるxCT阻害剤スルファサラジン併用放射線療法の有効性の検討、OSCCのOPN-CD44経路を介した放射線耐性機構の検討を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来の放射線治療にOPN-CD44シグナル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たなアプローチとなる可能性を示唆している。またxCT阻害薬スルファサラジンは関節リウマチなどに既に承認されており、高い治療効果を示している。ドラッグリポジショニングを利用した新規治療法により放射線抵抗性OSCCに対する有望かつ創造性に富む治療法の候補となりうる。

研究成果の概要（英文）：The present data suggest that OPN provide from tumor stroma play an important role in radioresistance of OSCC cells. The blockade of CD44 could be considered as novel therapeutic targets for radioresistant OSCC. Further studies will be needed for elucidating the molecular mechanisms of OPN dependent radioresistance in OSCC. The efficacy of radiotherapy combined with the xCT inhibitor sulfasalazine in an in vivo carcinoma-bearing mouse model was investigated.

研究分野：口腔扁平上皮癌

キーワード：口腔扁平上皮癌 Osteopontin CD44 放射線治療

1. 研究開始当初の背景

口腔扁平上皮癌(OSCC)において放射線治療は重要な治療戦略だが、放射線抵抗性を示す細胞の存在が患者予後を極めて不良にする。したがって、放射線抵抗性メカニズム解明の解明や新規治療法の開発は急務である。申請者はこれまで OSCC における Osteopontin(OPN)発現と放射線治療の治療効果との相関を明らかにし、基礎実験から OSCC における OPN-CD44 経路を介した放射線耐性能獲得の可能性を示してきた。従って、OPN を標的とすることは放射線耐性克服と患者予後改善の新たなアプローチになる可能性を秘めている。また OSCC における OPN の役割、特にがん微小環境から供給される OPN と放射線耐性メカニズムについて検討を行った研究はほとんどなく、この点からも本研究は先駆的であり、新規性が高く、OSCC に限らず様々ながん研究の一翼を担うと考えられた。

2. 研究の目的

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、*in vivo* 担癌マウスモデルにおける xCT 阻害剤スルファサラジン併用放射線療法の有効性の検討を根幹とした、OSCC の OPN-CD44 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

OSCC における OPN の放射線治療効果予測バイオマーカーの検討

予備研究において OSCC 組織における OPN 発現と術前化学放射線療法の治療効果に相関関係を認めため、術前化学放射線療法を行った患者の血清中の OPN 濃度を ELISA 法にて測定し、組織中の OPN 発現の相関関係の検討を行う。これにより血清中の OPN 濃度が組織中の OPN 発現を反映するか、また血清 OPN 濃度が治療前の治療効果予測因子となりうるか検討する。

OSCC における OPN-CD44 経路を介した放射線抵抗性機構の解明

OSCC 培養細胞を用いて、放射線照射時に recombinant OPN (rOPN)および CD44 中和抗体を添加し、OSCC 細胞にどのような形質変化が起こるかを、ELISA 法、ウエスタンブロッティング法、免疫沈降、放射線感受性試験、ROS 濃度測定などを用いて検討する。これにより OPN による CD44 を介した ROS 制御が放射線抵抗性メカニズムの解明を目指す。さらに上記の実験結果をもとに、OSCC 培養細胞の放射線照射時に rOPN およびスルファサラジンを添加し同様の実験系を行う。これにより OSCC 細胞培養細胞におけるスルファサラジンの治療効果を *in vitro* において検討する。

in vivo 担癌マウスモデルによるスルファサラジン併用放射線療法の有効性の検討

本研究では OSCC における OPN と放射線耐性に関する知見を *in vivo* 実験系で検証する。まず Cell line derived xenograft (CDX)モデルを用いた検証を行う。免疫不全マウスに腹腔内投与による麻酔を行った後、OSCC 細胞株 (1×10^7)を背部に皮下移植し、① 生理食塩水、② ヒト rOPN (100ng/ml)、③ スルファサラジン (400mg/Kg/日)、④ ヒト rOPN + スルファサラジンの4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 2 Gy/日照射する。X 線は合計 20 Gy (2 Gy/日、10 Gy/週)照射する(MBR-1520R; Hitachi)。8 時間毎に移植腫瘍のサイズ、体積を計測する。照射終了 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い、各種標的分子の免疫組織化学解析および DNA マイクロアレー解析を行う。

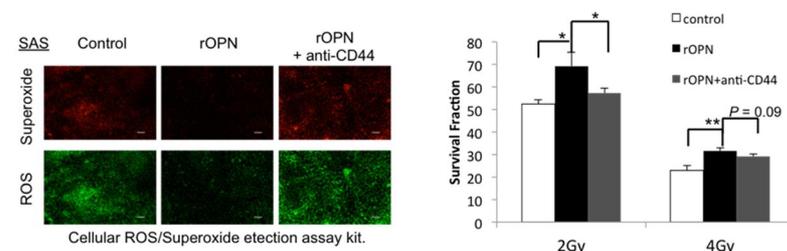
CDX マウスモデルで得られた結果から同様の実験系をがん組織の不均一性を反映した Patient derived xenograft (PDX)モデルを用いて行い、より実際のがん組織に即した実験を行う。

4. 研究成果

OSCC 組織における OPN 発現と術前化学放射線療法の治療効果との相関を示し、*in vitro* において、放射線照射時に rOPN を添加することで放射線抵抗性を獲得し、CD44 中和抗体によりその形質が喪失することを示した。また一連の結果は ROS 制御により生じる可能性が示唆され、OSCC における放射線耐性メカニズムに OPN-CD44 が重要な役割を担っている可能性を示した。またこの経路は CD44 が xCT と複合体を形成、

GSH 生成を増加させることで促推する推測され、xCT 阻害剤であるスルファサラジンを投与することで放射線耐性を強力に阻害できると考えられる。同実験系で rOPN により

OSCC細胞株にOPN添加およびCD44中和抗体投与し放射線照射後の活性酸素種の発現および細胞生存の割合



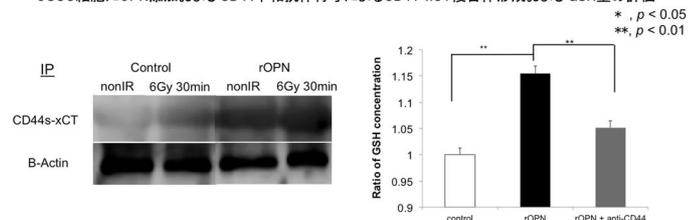
OPN添加により活性酸素種が減少し、また放射線抵抗性を示すが、CD44中和抗体併用により反応がキャンセルされる

CD44-xCT 複合体形成が増加することを認め、さらに rOPN での GSH 増加および、CD44 中和抗体の追加により阻害されることを示し、この機構を標的とした新規治療法の有効性についても十分期待出来る結果を得た。

しかしながら同様のメカニズムが *in vivo* においても証明できるだけの十分な知見は得られていない。また CDX マウスモデルのみならず、実際の腫瘍組織を反映しうる PDX

マウスモデルを用いてスルファサラジンの有効性を示すことが、OPN-CD44 経路を標的とした治療法を臨床応用するにあたって極めて重要であると考えられる。しかしながら動物実験では十分な成果を得ることができなかつた。実験の条件や検体数を調整し検討を重ねる予定である。

OSCC細胞にOPN添加およびCD44中和抗体付与によるCD44-xCT複合体形成およびGSH量の評価



OPN添加によりCD44-xCT複合体形成を促進し、GSH生成も増加させる。GSH生成はCD44中和抗体により阻害される

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
---------	---------