

令和 6 年 5 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K17087

研究課題名（和文）口腔癌幹細胞に対する第三世代がん治療用ウイルスの治療効果の検討

研究課題名（英文）The examination of therapeutic efficacy of third generation oncolytic HSV-1 for cancer stem cell in oral cancer

研究代表者

栗岡 恭子（KURIOKA, Kyoko）

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：60882363

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）：口腔癌は再発、転移症例では根治治療は困難である場合があり、治療抵抗性因子としてがん幹細胞の存在が指摘してされている。本研究ではがん幹細胞において細胞周期やその分布を検証するため、Fucci システムを導入したヒト口腔癌細胞を浮遊培養にてスフェア形成し観察を行った。またSAS-Fucci細胞を浮遊培養し、第三世代がん治療用 HSV-1 である T-01を感染させ、経日的に観察すると濃度依存的に殺細胞効果を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔癌は外科的療法、放射線療法、がん薬物療法を組み合わせた集学的治療で治療されており、近年では免疫チェックポイント阻害薬が適応となった。しかしながら再発、転移症例では未だに根治治療は困難であり、治療抵抗性を示すことが多い。また患者の高齢化や併存疾患の存在irAE等の重大な有害事象を発生し治療の選択や治療継続が困難となる症例がある。治療抵抗性因子としてがん幹細胞の存在が報告されており、この特性を解明することは非常に有用である。また幹細胞性の強い悪性膠芽腫に対し製剤化された第三世代がん治療用 HSV-1 は有害事象が少なく、口腔癌において低侵襲かつADLを保つことが可能な治療法として期待される。

研究成果の概要（英文）：It may be difficult to cure some recurred or metastasized cases of oral cancer, and the presence of cancer stem cells has been pointed out as a factor in treatment resistance. In this study, in order to examine the cell cycle and its distribution in cancer stem cells in oral cancer cells, human oral cancer cells introduced with the Fucci system were cultured in suspension to form spheres and observed. In vitro cytopathic effect of T-01, a third generation oncolytic HSV-1 in spheres in SAS-Fucci cells was a concentration-dependent cell-killing effect was observed when observed over time.

研究分野：口腔外科学

キーワード：口腔癌 がん幹細胞 ウイルス療法

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

口腔癌は外科的療法、放射線療法、がん薬物療法を組み合わせた集学的治療が適応されている。しかしながら局所進行例や再発、転移症例では従来の治療では治療抵抗性を示すことが多く、併存疾病を持ち合わせる患者や高齢者に対しては侵襲的な治療を選択することが困難となること、治療継続が困難となることがしばしば見受けられる。

がん幹細胞はがん組織を形成する「礎」と言われており、放射線、がん薬物療法に抵抗性を有するとの報告があるがそのメカニズムは明らかになっていない。癌細胞の浸潤性の違いについて、細胞に Fluorescent Ubiquitination based Cell Cycle Indicator (Fucci) システムを導入することで蛍光観察により細胞周期の確認が可能となった SAS-Fucci を用いて、東京医科歯科大学大学院渡部徹郎教授らと共同研究を行い、マウス舌癌頸部リンパ節転移モデルにおいて原発巣と頸部リンパ節転移巣内の細胞内の細胞周期の局在の違いから細胞の浸潤性は細胞周期と関連している可能性があることを報告している。(Takahashi K, Kurioka K, Uchihashi T, Miyazono K, Watabe T et al. Cell Reports, 2022) また、東京大学医科学研究所先端医療研究センター先端がん治療分野・藤堂具紀教授は三重変異を有する第三世代がん治療用 HSV-1 を開発し、がん幹細胞性の強い悪性膠芽腫において有効であり、既に製剤化されている。治療抵抗性の口腔癌においては、がん幹細胞の局在およびその細胞周期の分布が関連しており、より侵襲的かつ効果的な治療として第三世代がん治療用 HSV-1 が有効であると考えられる。

2. 研究の目的

近年、免疫チェックポイント阻害薬の適応により口腔癌の治療法は選択肢が増えたものの根治治療は困難であり、治療抵抗性を示すことが多い。また免疫関連有害事象 (irAE) 等の重大な有害事象を発症し治療継続が困難となる症例がある。さらに、患者の高齢化や併存疾患の存在から低侵襲であり ADL を保つことが可能である治療法の開発が望まれる。

これまで口腔癌において治療抵抗性因子として、がん幹細胞の存在が報告されている。しかしながら、口腔癌にてがん幹細胞に対しこれまで明確なメカニズムや決定的なバイオマーカーの発見は報告されていない。これまでにマウス舌癌頸部リンパ節において原発巣と頸部リンパ節転移巣では細胞の細胞周期の違いが報告されており、これとがん幹細胞の分布は関連性があると考えられる。がん幹細胞に効果がある治療法の確立は、外科療法以外での根治治療の確立につながる。第三世代がん治療用 HSV-1 は悪性膠芽腫に対しては製剤化されている。ウイルス療法はより有害事象が少なく、がん幹細胞に対する第三世代がん治療用ウイルスの効果を検討することは、口腔癌において低侵襲かつ根治を期待できる治療法の確立につながり非常に有用であると考えられる。

3. 研究の方法

幹細胞性が強いと言われているヒト口腔癌細胞である SAS および、その他 HSC-2、HSC-3、HSC-4 などに Fucci システムを導入した Fucci 細胞を東京医科歯科大学大学院歯学総合研究科歯科放射線診断・治療学分野 三浦雅彦教授、戒田篤志講師と MTA を交わし供与を受け、浮遊培養でスフェロイド形成し、蛍光顕微鏡にてその蛍光性を観察した。本細胞は細胞周期依存的なタンパク質で蛍光標識されており、蛍光観察により細胞周期の確認が可能となる。

また幹細胞性が強いと言われている SAS-Fucci 細胞において、第三世代がん治療用 HSV-1 である T-01 を用いて殺細胞効果 (cytotoxicity assay) を行い、ウイルスの効果を検証した。また経日的に細胞観察を行い、生細胞の蛍光性を確認した。

4. 研究成果

SAS、HSC-2、HSC-3、HSC-4 に Fucci システムを導入した Fucci 細胞を浮遊培養でスフェロイド形成し、そのスフェロイドをシングルセルに分離し培養すると再びスフェロイド形成し、幹細胞性を示した。スフェロイド形成された細胞は緑色を示す S/G2/M 期と赤色を示す G0/G1 期の細胞に染色可能であり、蛍光顕微鏡にて観察可能であった。

SAS-Fucci 細胞を浮遊培養し、T-01 を MOI:0.1 および 0.01 に希釈しそれぞれ感染させ経日的に細胞数、生細胞の蛍光性の観察を行った。

コントロールと比較し、T-01 感染細胞では濃度依存的に殺細胞効果を示した。また、生細胞の蛍光性は赤色を示す G0/G1 細胞が多く観察される傾向にあった。

このことから治療抵抗性因子と考えられるがん幹細胞に対して第三世代がん治療用 HSV-1 は有効であることが示唆された。また、生細胞が G0/G1 細胞の割合が優位であることから、この特性が治療抵抗性因子として関連性があると考えられる。この細胞について特定のバイオマーカー

ーを検索し、その発現パターンと細胞周期、ウイルス治療との関連性の検索が今後の検討課題である。

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 0件）

1. 著者名 Usta Sena Zeynep, Uchihashi Toshihiro, Kodama Shingo, Kurioka Kyoko, Inubushi Toshihiro, Shimooka Takuya, Sugauchi Akinari, Seki Soju, Tanaka Susumu	4. 巻 24
2. 論文標題 Current Status and Molecular Mechanisms of Resistance to Immunotherapy in Oral Malignant Melanoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	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/ijms242417282	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Uchihashi Toshihiro, Sugauchi Akinari, Kurioka Kyoko, Tanaka Susumu, Todo Tomoki
2. 発表標題 Combination therapy of triple-mutated oncolytic HSV-1 arwith soluble B7-1 and anti-CTLA4 antibody shows synergistic antitumor efficacy for lymph node metastasis in a tongue cancer model med
3. 学会等名 International Association of Oral and Maxillofical Surgeons 2023（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 須河内昭成、内橋俊大、栗岡恭子、日尾清太郎、田中晋、藤堂具紀
2. 発表標題 第三世代がん治療用ヘルペスウイルスを用いた口腔・食道重複癌に対する新規治療法の検討
3. 学会等名 第29回日本遺伝子細胞治療学会学術集会
4. 発表年 2023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
---------	---------