



# HOKKAIDO UNIVERSITY

|                     |                                                                                   |
|---------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| Title               | 頭頸部扁平上皮癌におけるDNA障害型抗がん薬の効果予測マーカーとしてのSLFN11の有用性に関する研究<br>[全文の要約]                    |
| Author(s)           | 浜田, 誠二郎                                                                           |
| Description         | この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。<br>配架番号：2709 他                                 |
| Degree Grantor      | 北海道大学                                                                             |
| Degree Name         | 博士(医学)                                                                            |
| Dissertation Number | 甲第14971号                                                                          |
| Issue Date          | 2022-03-24                                                                        |
| Doc URL             | <a href="https://hdl.handle.net/2115/86055">https://hdl.handle.net/2115/86055</a> |
| Type                | doctoral thesis                                                                   |
| File Information    | HAMADA_Seijiro_summary.pdf                                                        |



# 学 位 論 文 （ 要 約 ）

## 頭頸部扁平上皮癌における DNA 障害型抗がん薬の効果予測マーカーとしての SLFN11 の有用性に関する研究

(Studies on SLFN11 as the prognostic marker of  
head and neck squamous cell carcinoma patients  
treated with platinum-based chemoradiotherapy)

2022 年 3 月

北 海 道 大 学

浜田 誠二郎



# 学 位 論 文 （ 要 約 ）

## 頭頸部扁平上皮癌における DNA 障害型抗がん薬の効果予測マーカーとしての SLFN11 の有用性に関する研究

(Studies on SLFN11 as the prognostic marker of  
head and neck squamous cell carcinoma patients  
treated with platinum-based chemoradiotherapy)

2022 年 3 月

北 海 道 大 学

浜田 誠二郎

## 【緒言】

頭頸部癌は希少癌と位置付けられているものの、世界的には毎年 65 万人が発症し、33 万人が死亡している疾患である。頭頸部扁平上皮癌は、口腔・鼻副鼻腔・上咽頭・中咽頭・下咽頭・喉頭などの扁平上皮から生じる。重要な発癌リスク因子として、喫煙、飲酒、そしてヒトパピローマウイルス (Human papilloma virus, HPV) 感染が挙げられる。頭頸部扁平上皮癌に対しては、手術、放射線治療、薬物療法、およびそれらを組み合わせた治療が行われる。薬物療法として、近年、分子標的治療薬や免疫チェックポイント阻害薬が臨床応用されているが、依然として白金製剤（シスプラチン、カルボプラチン）を用いた化学療法が最も多く施行されている。

シスプラチンは癌細胞の DNA に結合し複製を阻害することで、癌細胞をアポトーシスへと導く DNA 障害型抗がん薬である。多くの症例で抗腫瘍効果が確認される一方、一定の割合で治療抵抗性を示す症例が存在することが課題である。これまで、DNA を標的とした抗がん薬の効果の予測に使用できるバイオマーカーは存在しなかった。2012 年、独立した二つの大規模な癌データベースである NCI-60 および Cancer Cell Line Encyclopedia の解析により、DNA 障害型の抗がん薬への感受性と mRNA の発現量が最も強く相関する遺伝子として *Schlafen family member 11* (*SLFN11*) 遺伝子が報告された。SLFN11 が DNA 障害型抗がん薬の感受性を増強させる機構の解明も進んでおり、癌細胞の DNA が障害されると、SLFN11 が DNA の複製フォークに結合してクロマチンの構造を変化させ、永続的な複製阻害を引き起こすことが報告された。また、SLFN11 の発現は免疫組織化学染色法 (Immunohistochemistry, IHC) により簡便に検出できるため、バイオマーカーとしての臨床応用に適している。

## 【本研究の目的】

頭頸部扁平上皮癌に対して、シスプラチンが抗がん薬の第一選択薬として用いられているにも関わらず、未だ治療の効果予測マーカーは臨床応用されていない。そこで私は、SLFN11 発現が頭頸部癌患者において、DNA 障害型抗がん薬を用いた化学療法と放射線治療を組み合わせた化学放射線療法 (Chemoradiotherapy, CRT) の治療効果予測の有用なバイオマーカーとなるかどうかを、臨床検体および細胞株を用いた実験で検討し明らかにすることを目的として、本研究を実施した。

## 【実験方法】

### 1. 臨床検体における検討

北海道大学病院耳鼻咽喉科において、2008 年 1 月から 2019 年 12 月までにシスプラチンを用いた化学放射線療法 (cisplatin-based chemoradiotherapy, CDDP-CRT) が施行された頭頸部扁平上皮癌患者 161 症例を解析対象とした。対象症例 161 例の治療前の生

検組織のホルマリン固定パラフィン包埋ブロック切片を用いて、IHC により SLFN11、Ki-67、p53 のタンパク質発現の評価を行った。また、中咽頭癌に対しては p16 タンパク質発現も解析した。これらタンパク質発現量の情報と、年齢、性別、疾患名、臨床病期、治療内容、治療効果、転帰などを集積し、頭頸部癌の発生部位別の全生存率や無増悪生存率の評価を行った。全生存期間、無増悪生存期間の比較にはそれぞれ logrank 検定を用いた。また、SLFN11 陽性と評価した症例のうち、CDDP-CRT 後に再発もしくは残存を認め、かつ、腫瘍組織を入手できた 10 症例に対しても、IHC により治療前組織と SLFN11 陽性割合の比較検討を行った。

## 2. 頭頸部扁平上皮癌細胞株における検討

5 つのヒト頭頸部扁平上皮癌細胞株 (HSC-2、HSC-3、HSC-4、SCC-9、SCC-25) を用いて、定量 PCR により SLFN11 の mRNA 発現量を、ウェスタンブロッティング法により SLFN11 のタンパク質発現量をそれぞれ測定した。また、これらの細胞株の薬剤感受性試験を行い、SLFN11 発現と薬剤感受性の関連を検討した。さらに、CRISPR/Cas9 によるゲノム編集技術を用いて、SLFN11 ノックアウト (SLFN11-KO) 細胞を樹立し、同様に薬剤感受性試験を行った。さらに、細胞倍加時間の測定やフローサイトメトリーを用いた細胞周期の解析を行い、SLFN11 ノックアウトが細胞に与える影響を検討した。

### 【実験結果】

#### 1. 臨床検体における検討

癌細胞における SLFN11 陽性細胞の割合の最小値、中央値、最大値は、それぞれ 0%、15%、95%であった。したがって本研究では、SLFN11 の陽性割合が 15%以上を SLFN11 陽性と定義した。

臨床病理学的因子 (年齢、性別、Karnofsky performance status [KPS]、原発部位、病期分類、T 分類、N 分類、病理組織学的分化度、シスプラチン投与方法、Ki-67、p53) と SLFN11 発現の関連を検討したところ、いずれの因子においても有意差は得られなかった。しかし、中咽頭癌 61 症例のみを対象とした検討では、p16 陽性症例は p16 陰性症例と比較して有意に SLFN11 陽性の割合が高かった (Fisher の正確検定:  $p = 0.03$ )。

全対象症例に対して、全生存期間を SLFN11 陽性群と陰性群に分けて解析したところ、SLFN11 陽性群が SLFN11 陰性群と比較して有意に良好だった (logrank 検定:  $p = 0.002$ 、5 年全生存率 89.9% vs. 80.2%)。また、無増悪生存期間に関しても統計学的な有意差を認めた ( $p < 0.001$ 、5 年無増悪生存率 78.8% vs. 52.8%)。部位別の検討においては、鼻副鼻腔癌、p16 陽性中咽頭癌において SLFN11 陽性例の無増悪生存期間が有意に良好であった。

治療前生検組織では SLFN11 陽性であったが、CDDP-CRT 後に再発もしくは残存した 10

症例を検討したところ、8 症例で治療前の腫瘍と比較して治療後の再発もしくは残存腫瘍で SLFN11 発現が低下していた。

さらに、個々の症例の SLFN11 免疫染色を注意深く観察すると、多くの症例(147 症例、91.3%)では腫瘍組織内において SLFN11 陽性細胞は比較的均一に分布していたが、一部の症例(14 症例、8.7%)では、陽性細胞の集塊と陰性細胞の集塊が明瞭に区分されていた(腫瘍内不均一性)。SLFN11 発現の腫瘍内不均一性の有無で無増悪生存期間を比較したところ、有意差は認めなかった。

## 2. 頭頸部扁平上皮癌細胞株における検討

頭頸部癌細胞株を用いた実験において、HSC-2、HSC-3、HSC-4 細胞の SLFN11 mRNA 発現量とタンパク質発現量は、SCC-9、SCC-25 よりも高値であった。各種薬剤存在下における細胞生存率の測定では、シスプラチンとカルボプラチンの投与では SLFN11 高発現細胞(HSC-2、HSC-3、HSC-4)で高い感受性を認めたが、ドセタキセルの投与では SLFN11 発現との相関は認めなかった。

樹立した SLFN11-KO 細胞とそれぞれの親細胞の細胞数を毎日測定し、細胞倍加時間を計算した。HSC-3 と HSC-3-KO、HSC-4 と HSC-4-KO は、培養日数毎に計測した細胞数、細胞倍加時間に有意差は認められなかったが、HSC-2-KO は HSC-2 と比較して培養 4 日目の細胞数が有意に少なく、また、細胞倍加時間の延長を認めた。フローサイトメトリーを用いた解析では、HSC-2-KO 細胞は HSC-2 細胞と比較して G2-M 期の細胞割合が上昇していた。一方、HSC-3-KO 細胞と HSC-3 細胞は各細胞周期の分画比率に差を認めず、HSC-4-KO 細胞は HSC-4 細胞と比較して G1 期のピークの上昇を認めたが、各細胞周期の分画比率自体に顕著な変化は認めなかった。各種薬剤存在下における細胞生存率の測定では、SLFN11-KO 細胞では DNA 障害型抗がん薬に対する感受性の低下を認めたが、非 DNA 障害型抗がん薬であるドセタキセルに対する感受性の低下は認められなかった。

### 【考察】

今回私は、頭頸部扁平上皮癌検体を用いて SLFN11 の発現が CDDP-CRT の治療効果と関連することを世界で初めて明らかにした。特に鼻副鼻腔癌において SLFN11 陽性群は陰性群と比較して有意に良好な無増悪生存率を認めた。本研究で検討した全ての鼻副鼻腔癌症例にはシスプラチンの超選択的動注療法が行われていた。経動脈投与は経静脈投与と比較してより高濃度のシスプラチンを腫瘍へ選択的に投与できることから、SLFN11 の発現の有無がより強く治療効果に反映された可能性があると考えられた。また、p16 陽性中咽頭癌は p16 陰性中咽頭癌と比較して、有意に SLFN11 陽性症例の割合が高かった。SLFN11 はインターフェロン刺激によって誘導され、抗ウイルス反応に重要な役割を果たすことが報告されており、ヒトパピローマウイルス感染が SLFN11 発現の上昇に

関与している可能性が推察された。また、CDDP-CRT 後の再発もしくは残存腫瘍では、治療前の組織と比較して有意に SLFN11 発現が低下していた。本症例の SLFN11 免疫染色において、一部の症例では組織内において SLFN11 発現に明らかな不均質、いわゆる intratumor heterogeneity を認めていた。このことから、SLFN11 低発現の細胞群が CDDP-CRT に耐性を示して残存し、再増殖した可能性が示唆された。

頭頸部癌細胞株を用いて、SLFN11 発現がシスプラチンを含め、カルボプラチンやオラパリブなど DNA 障害型抗がん薬の感受性と有意に相関することを確認した。一方、非 DNA 障害型抗がん薬であるドセタキセルに対する感受性とは相関がなかった。さらに、HSC-3 細胞や HSC-4 細胞の SLFN11 ノックアウト細胞を用いた実験でも、同様の結果が得られた。したがって、SLFN11 は DNA 障害型抗がん薬に特異的に関与することが示唆された。

本研究では、SLFN11 の発現量を生検検体の IHC で評価した。IHC は日常診療の病理診断において汎用されている手法であり、治療効果予測バイオマーカーの検査として臨床応用しやすい手技である。したがって、今後臨床において頭頸部癌の生検組織の診断の際に SLFN11 発現の確認を行うことで、より効果的な治療法の選択を行うことができると思われる。課題としては、SLFN11 発現の適切な陽性閾値が定まっていないことである。本研究においては、染色強度によらず SLFN11 が染色された細胞の割合で評価し、全症例の中央値である 15%以上を SLFN11 陽性、15%未満を SLFN11 陰性と定義した。これまでの他癌腫に関する報告では、Pietanza らは、肺小細胞癌組織における SLFN11 の発現評価に H-score を用いて、1 以上を陽性と定義している (Pietanza et al., 2018)。H-score は腫瘍細胞の染色強度を 0 (染色なし)、1 (弱陽性)、2 (中等度陽性)、3 (強陽性) の 4 段階に分類し、それぞれの染色強度に陽性細胞の分布割合 (0-100%) を掛け合わせた値 (範囲は 0-300) である (Detre et al., 1995)。また、高島らは、さまざまな癌組織や正常組織を SLFN11 の陽性細胞の割合に応じて 1+ (1%-10%)、2+ (11%-50%)、3+ (51%-100%) の 3 段階に分類して SLFN11 発現を評価する方法を用いている (Takashima, et al., 2021)。この報告では、腫瘍の原発部位や組織型によって、SLFN11 発現にはかなりの違いがあるとされており、全ての癌で共通した閾値を設定することは容易ではないと考えられる。陽性閾値を設定する上で、SLFN11 発現の腫瘍内不均一性をどの程度考慮に入れるかも課題である。今後、腫瘍量の大きい舌癌の手術検体を用いて SLFN11 の腫瘍内不均一性に関してさらに検討を進める予定である。

さらに、多施設共同研究などより多くの症例数で解析し、そこで得られた陽性閾値を用いた前向きな臨床試験を実施したいと考えている。



## 【結論】

- 頭頸部扁平上皮癌の組織標本の IHC による解析により、全体として SLFN11 陽性群は SLFN11 陰性群と比較して有意に良好な全生存期間と無増悪生存期間を示した。
- 原発部位別の解析では、特に鼻副鼻腔癌で SLFN11 陽性群の予後が良好であった。これは、鼻副鼻腔癌症例がシスプラチンを経動脈投与した CRT によって治療されたことが理由である可能性がある。
- p16 陽性中咽頭癌では p16 陰性中咽頭癌と比較して SLFN11 陽性症例の割合が有意に高かった。HPV 感染が SLFN11 の高発現に関与している可能性や、HPV 関連中咽頭癌の良好な治療感受性に SLFN11 が関与している可能性がある。
- 頭頸部癌細胞株を用いた実験によって、SLFN11 発現と DNA 障害型抗がん薬の感受性が相関することが示された。