

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20528

研究課題名(和文) セツキシマブ耐性口腔癌におけるPI3K阻害剤併用型セツキシマブ感受性回復法の開発

研究課題名(英文) Development of a method for restoring susceptibility of cetuximab in combination with a PI3K inhibitor for cetuximab resistant oral cancer

研究代表者

藤田 麻里子 (Fujita, Mariko)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：90714535

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：セツキシマブは口腔癌で唯一の抗EGFR抗体分子標的抗癌剤として期待されているが、継続投与によりEGFR遺伝子変異が生じ耐性を獲得した事例や、下流のKRAS遺伝子変異の存在により奏効しない事例が問題となっている。

セツキシマブとの関連を示す癌細胞株9種に対して遺伝子変異解析を行ったところ、Ca9-22株とHSG株ではPIK3CAに対する変異がみられた。この結果により、PIK3CAにおいてはセツキシマブ感受性が低くなる可能性が示唆された。本研究結果から、セツキシマブの投与においては、PIK3CA遺伝子の変異が奏効率に大きく関わっていることが本研究において証明できた。

研究成果の概要(英文)：Cetuximab is expected as an anti-EGFR antibody molecule targeting drug for oral cancer. However, cases in which EGFR gene mutation has occurred due to continued administration and tolerance has been acquired, and cases in which the response is not responded due to the presence of the downstream KRAS gene mutation are problems.

Gene variation analysis was performed on nine cancer cell lines showing association with cetuximab. In Ca9-22 strain and HSG strain mutation was observed against PIK3CA. This result suggested that PIK3CA may be less susceptible to cetuximab. From the results of this study, it was proved in this study that mutation of PIK3CA gene greatly affects response rate in administration of cetuximab.

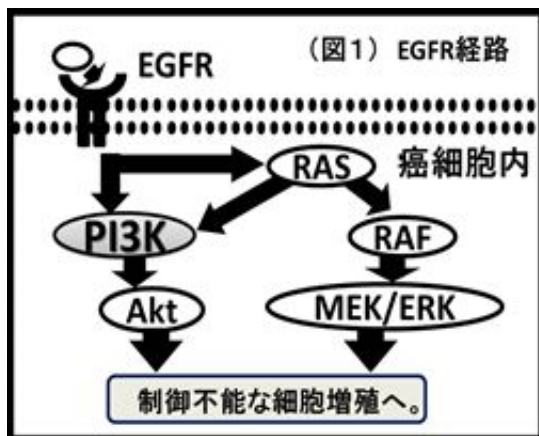
研究分野：歯科放射線学分野

キーワード：セツキシマブ 口腔癌 PI3K阻害剤 PIK3CA Ca9-22

1. 研究開始当初の背景

セツキシマブ(商品名アービタックス®)は、上皮成長因子受容体(Epidermal growth factor receptor:EGFR)を標的とするモノクローナル抗体で、2012年に頭頸部癌の分子標的抗癌剤として厚生労働省の製造販売承認を受け、臨床の現場でその効果を期待されている。EGFRはチロシンキナーゼ受容体であり、癌組織の増殖や浸潤、転移に強く関与し、様々な癌で高発現である。近年、大腸癌を対象として、EGFR伝達経路の構成要素KRASに生じる遺伝子変異がアービタックス抵抗性を惹き起こす事が明らかとなり、KRAS遺伝子変異検査薬が保険収載に至っている。

そのRAS遺伝子が作用する分子の一つにホスファチジルイノシトール3キナーゼ(phosphatidylinositol-3 kinase:以下PI3Kと略)がある(図1)。PI3Kは、細胞膜の構成成分であるイノシトールリン脂質のイノシトール基3位のヒドロキシル基のリン酸化を行う酵素である(文献2)。RASによって活性化したPI3Kは、下流のAktに作用し、アポトーシス阻害、細胞増殖等を惹き起こす。近年、PI3K/Akt経路を標的としたPI3K阻害剤が新規抗癌剤として期待されている。特に頭頸部癌患者ではその40%にPI3K遺伝子増幅が認められるとされ(文献3)、頭頸部癌においてPI3Kは重要な因子と考えられる。そこで申請者は、アービタックス抵抗性口腔癌細胞株を担癌させたマウスモデルを対象に、PI3K阻害剤(BEZ235、PKI-587)を用いて、アービタックス感受性を回復できないか、また、同薬剤とアービタックスを併用し、アービタックス感受性口腔癌に対しても抗腫瘍効果を増強出来ないかとの着想に至った。(図2)



(図1)



(図2)

(参考文献)

- 1) Douillard JY, et al. N Engl J Med.2013; 369(11): 1023-34.
- 2) Whitman M et al. Nature. 1988;332(6165):644-6.
- 3) Markman B et al. Annals. Oncology. 2010;21:683-91.

2. 研究の目的

アービタックスは口腔癌で唯一の抗EGFR抗体分子標的抗癌剤として期待されているが、継続投与によりEGFR遺伝子変異が生じ耐性を獲得した事例や、下流のKRAS遺伝子変異の存在により奏効しない事例が問題となっている。そこで本申請研究でこれまでの研究を進展させ、アービタックス低感受性口腔癌や既に薬剤耐性を獲得した口腔癌に対する感受性の回復療法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

セツキシマブとの関連を示す癌細胞株9種に対する変異解析

セツキシマブとの関連を示す癌細胞株9種(HSC4、HSC3、HSC2、SAS、Hep2、HO-1-u-1、Ca9-22、HSG、HSQ-89)において、KRAS、NRAS、BRAF、PIK3CAの変異解析を行う。解析によりPIK3CAの変異がみられたものは、同薬剤に対する奏功がみられないことを示唆しており、その癌細胞株に対しては、同薬剤の阻害剤を使用して薬効を解析することとする。

KRASにおいては12、13、61、146番目のコドンでの変異を、NRASにおいては12、13、61番目のコドンの変異を、BRAFにおいては600番目のコドンの変異を、PIK3CAにおいては542、545、546、1047番目のコドンの変異をそれぞれの細胞株に対して観察した。

PI3K 阻害剤 NVP BEZ-235 の Ca9-22 および HSG に対する細胞毒性試験

DMEM(10%FBS) 培地に Ca9-22 および HSC-3 を $5 \times 10^4/100 \mu\text{l/well}$ 96 well 播種させ、37℃, CO₂ 5% の条件下で 48 時間培養した。48 時間後、BEZ-235 を 0~20 μM 含む培地に交換した。培地交換の 24 時間後、および 72 時間後、CellTiter-Glo 2.0 (Progega) を用いて ATP 濃度の測定を行った。

セツキシマブの HSC3 および Ca9-22 に対する細胞毒性試験

変異解析において PIK3CA の変異が認められた Ca9-22 と、変異の見られなかった HSC3 を用いて細胞毒性試験を行った。

DMEM(10%FBS) 培地に Ca9-22 および HSC-3 を $5 \times 10^4/100 \mu\text{l/well}$ 96 well 播種させ、37℃, CO₂ 5% の条件下で 48 時間培養した。48 時間後、Cetuximab (Cmabu) 0~1000 nM 含む培地に交換した。培地交換の 24 時間後、および 72 時間後、CellTiter-Glo 2.0 (Progega) を用いて ATP 濃度の測定を行った。

4. 研究成果

セツキシマブとの関連を示す癌細胞株 9 種に対する変異解析

HSC4、HSC3、HSC2、SAS、Hep2、HO-1-u-1、Ca9-22、HSG、HSQ-89 の 9 種の癌細胞株のすべてに対し、変異解析を行ったところ、HSC4、HSC3、HSC2、SAS、Hep2、HO-1-u-1、HSQ-89 株においては、KRAS、NRAS、BRAF、PIK3CA 遺伝子に対していずれも変異はみられなかった(表 1、2)。Ca9-22 と HSG 株では、KRAS、NRAS、BRAF 遺伝子においては変異がみられなかったものの、PIK3CA 遺伝子に対して変異がみられた(表 3)。

Ca9-22 では、1047 番目のコドン(3140 番目の塩基)において、アミノ酸がヒスチジン(H)からアルギニン(R)へと変異していた。すなわち、アデニン(A)からグアニン(G)へと塩基配列が変異していることが判明した。HSG では、542 番目のコドン(1624 番目の塩基)においてアミノ酸がグルタミン酸(E)からリシン(L)へと変異していた。すなわち、グアニン(G)からアデニン(A)へと塩基配列が変異していることが判明した。

同細胞株に対しては、セツキシマブによる奏効がみられない可能性が示唆されたため、PI3K 阻害剤を用いて解析を行った。

検査結果				
細胞株	KRAS			
	コドン			
	12	13	61	146
HSC4	野生型	野生型	野生型	野生型
HSC3	野生型	野生型	野生型	野生型
HSC2	野生型	野生型	野生型	野生型
SAS	野生型	野生型	野生型	野生型
Hep2	野生型	野生型	野生型	野生型
HO-1-u-1	野生型	野生型	野生型	野生型
Ca9-22	野生型	野生型	野生型	野生型
HSG	野生型	野生型	野生型	野生型
HSQ-89	野生型	野生型	野生型	野生型
KRAS遺伝子による変異解析				

(表 1)

検査結果				
細胞株	NRAS			BRAF
	コドン			コドン
	12	13	61	600
HSC4	野生型	野生型	野生型	野生型
HSC3	野生型	野生型	野生型	野生型
HSC2	野生型	野生型	野生型	野生型
SAS	野生型	野生型	野生型	野生型
Hep2	野生型	野生型	野生型	野生型
HO-1-u-1	野生型	野生型	野生型	野生型
Ca9-22	野生型	野生型	野生型	野生型
HSG	野生型	野生型	野生型	野生型
HSQ-89	野生型	野生型	野生型	野生型
NRASおよびBRAF遺伝子による変異解析				

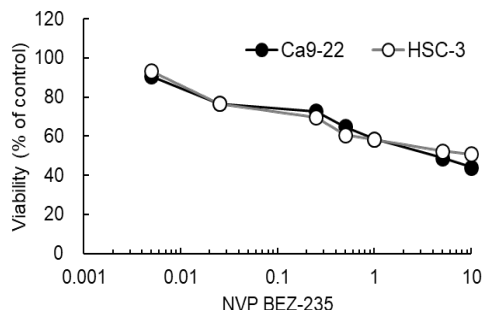
(表 2)

検査結果				
細胞株	PIK3CA			
	コドン			
	542	545	546	1047
HSC4	野生型	野生型	野生型	野生型
HSC3	野生型	野生型	野生型	野生型
HSC2	野生型	野生型	野生型	野生型
SAS	野生型	野生型	野生型	野生型
Hep2	野生型	野生型	野生型	野生型
HO-1-u-1	野生型	野生型	野生型	野生型
Ca9-22	野生型	野生型	野生型	H-1047R
HSG	E542K	野生型	野生型	野生型
HSQ-89	野生型	野生型	野生型	野生型
PIK3CA遺伝子による変異解析				

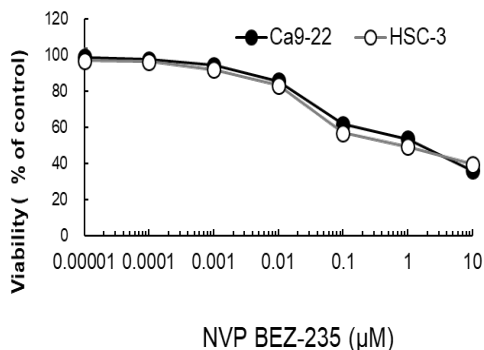
(表 3)

PI3K 阻害 NVP BEZ-235 の Ca9-22 および HSG に対する細胞毒性試験

Ca9-22、HSG 株いずれにおいても濃度依存的に薬剤の効果は認められたが、薬剤投与後 24 時間、72 時間いずれにおいても 2 株での有意差は認められなかった。(図 3, 4)



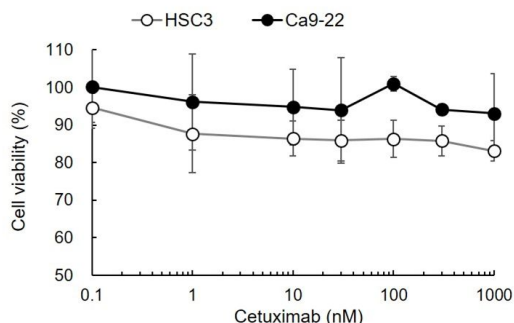
(図 3) 薬剤投与後 24 時間



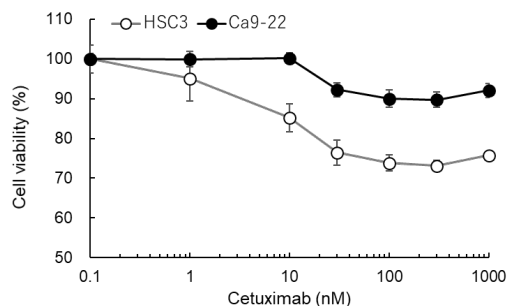
(図 4) 薬剤投与後 72 時間

セツキシマブの HSC3 および Ca9-22 に対する細胞毒性試験

いずれの濃度においても、HSC3 株の方が常にセツキシマブに対する感受性が高かった。また、薬剤投与後 72 時間の方が 24 時間のものよりも有意差がみられた。(図 5, 6)



(図 5) 薬投与後 24 時間



(図 6) 薬剤投与後 72 時間

上記の結果から、セツキシマブの奏功に関わる遺伝子のなかで、Ca9-22 と HSG においては、変異のみられなかった細胞株と比して優位に奏効率が低下することが示唆された。したがって、セツキシマブの投与においては、PIK3CA 遺伝子の変異が奏効率に大きく関わっていることが本研究においても改めて証明できた。

Ca9-22 と HSG に対して、PI3K 阻害剤を用いると、濃度依存的には効果がみられたが、有意な結果がみられるかという点までは本研究では証明できなかった。今後の課題としては、薬剤濃度の検討を行い、セツキシマブと PI3K 阻害剤の併用投与による比較検討が必要になると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田 麻里子 (FUJITA, Mariko)
岡山大学 大学病院 助教
研究者番号: 90714535

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

村上 純 (MURAKAMI,Jun)

岡山大学 大学病院 助教

研究者番号：40362983

十川千春 (SOGAWA, Chiharu)

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

講師

研究者番号：10253022