

令和元年6月10日現在

機関番号：31602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11760

研究課題名(和文) 口腔癌に対するEGFR阻害剤の効果予測因子を探る

研究課題名(英文) Biomarker to predict the efficacy of inhibitors of EGFR tyrosine kinase in oral squamous cell carcinoma

研究代表者

馬場 優 (Baba, Yuh)

奥羽大学・歯学部・教授

研究者番号：40597663

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)：特異的EGFR阻害剤AG1478添加により歯肉癌細胞株Ca9-22細胞(PIK3CA遺伝子：野生型)においてアポトーシスが誘導されたが、舌癌細胞株HSC4細胞(PIK3CA遺伝子：G1633A変異)においてはアポトーシスが誘導されなかった。Ca9-22にG1633A変異型PIK3CA遺伝子を導入すると、AG1478による死細胞数が有意に減少した。HSC4においてAG1478とデグエリンとの併用効果が確認された。PIK3CA遺伝子変異は口腔癌に対するEGFR阻害剤の効果予測因子の一つでありデグエリンとEGFR阻害剤の併用療法がPIK3CA遺伝子変異口腔癌に対する新たな治療であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔扁平上皮癌の90%以上に上皮成長因子受容体Epidermal growth factor receptor(EGFR)が過剰発現しており、EGFRシグナル伝達系は口腔癌における重要な治療標的である。これまで、切除不能な進行・再発口腔癌において放射線療法や化学療法に対するEGFR阻害剤の上乗せ効果が証明されているが、EGFR阻害剤の効果を予測する因子に関してはいまだに不明であった。本研究によって口腔癌に対するEGFR阻害剤の効果予測因子の一つがPIK3CA遺伝子変異であることが明らかになり、口腔癌に対する個別化医療の可能性が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to study whether combinatorial treatment using AG1478(EGFR tyrosine kinase inhibitor) and deguelin could enhance the anti-tumor effects of AG1478 in oral squamous cell carcinoma(SCC). For Ca9-22 cells with PIK3CA wild types, AG1478 alone suppressed AKT and induced apoptosis. On the contrary, for HSC-4 cells with PIK3CA mutant, AG1478 alone did not suppress the phosphorylated level of AKT nor induce apoptosis. Forced expression of constitutively active PIK3CA (G1633A mutation) significantly reduced the apoptotic effect of AG1478 on the PIK3CA wild-type Ca9-22 cells. When HSC-4 cells with the PIK3CA G1633A mutation were treated with a combination of AG1478 and deguelin, combination effects on apoptosis induction were observed through the inhibition of the AKT pathway. These results suggest that the combination of EGFR tyrosine kinase inhibitor with deguelin is a potential therapeutic approach to treat PIK3CA-mutated oral SCC.

研究分野：口腔癌

キーワード：口腔癌 EGFR PIK3CA AKT バイオマーカー デグエリン 食道癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

口腔扁平上皮癌の90%以上に上皮成長因子受容体 Epidermal growth factor receptor (EGFR) が過剰発現しており、EGFR シグナル伝達系は口腔癌における重要な治療標的である。これまで、切除不能な進行・再発口腔癌において放射線療法や化学療法に対する EGFR 阻害剤の上乗せ効果は証明されているが、EGFR 阻害剤の効果を予測する因子に関してはいまだに不明である。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、口腔扁平上皮癌に対する EGFR 阻害剤のバイオマーカーを探索し、口腔癌に対する個別化医療が可能か否かを明らかにすることにある。

### 3. 研究の方法

(1) 異なった PI-3kinase 遺伝子を有する2株のヒト口腔癌由来細胞株における EGFR 阻害剤に対する感受性の比較: PI-3kinase 遺伝子変異を有しているヒト舌癌由来細胞株 HSC4 (G1633A 変異) と Wild-type PI-3kinase 遺伝子を有しているヒト歯肉癌細胞株 Ca9-22 において、特異的 EGFR 阻害剤である AG1478 に対する感受性の違いを細胞増殖測定系 (トリパンプルー) にて比較する。また、Ca9-22 細胞と HSC4 細胞において、AG1478 が Akt の活性化に与える影響を、Western blot 法により磷酸化型 Akt 蛋白発現を計測することにより解析する。

(2) 変異型 PI-3kinase 遺伝子導入による EGFR 阻害剤に対する感受性に与える影響についての解析: Wild-type PI-3kinase 遺伝子を有しているヒト歯肉癌細胞株 Ca9-22 に変異型 PI-3kinase 遺伝子 (G1633A 変異) を導入し、親株と遺伝子導入株とを、AG1478 に対する感受性の違いに関して、細胞増殖測定系 (トリパンプルー) にて比較する。

(3) HSC4 細胞における EGFR 阻害剤とデグエリンの併用効果: デグエリンが変異型 PI-3kinase 遺伝子を有している口腔扁平上皮癌細胞株 (HSC4) において AG1478 の抗腫瘍効果を増大させるか否かを細胞増殖測定系 (トリパンプルー) にて解析、また、デグエリンが AKT 活性を抑制することにより AG1478 の抗腫瘍効果を高めることを Western blot 法にて解析する。

### 4. 研究成果

(1) 10  $\mu$ M の AG1478 を 72 時間添加すると、PIK3CA 遺伝子が野生型である Ca9-22 細胞において磷酸化型 AKT 蛋白発現減少に伴いアポトーシス現象が誘導された。一方、PIK3CA 遺伝子が G1633A 変異を示す HSC4 細胞においては磷酸化型 AKT 蛋白発現は有意には減少せずアポトーシス現象はおこらなかった。また、細胞増殖測定系において、PIK3CA 遺伝子が野生型である Ca9-22 細胞において生細胞率は約 70% にまで減少したが、PIK3CA 遺伝子が G1633A 変異を示す HSC4 細胞において生細胞率は明らかに減少しなかった。この結果から、PIK3CA 遺伝子変異と AG1478 に対する感受性に相関関係があることが明らかになった。

(2) PIK3CA 遺伝子が野生型である Ca9-22 細胞に G1633A 変異型 PIK3CA 遺伝子を導入し、親株と遺伝子導入株とを、AG1478 に対する感受性の違いに関して細胞増殖測定系にて比較したところ、親株に比べて G1633A 変異型 PIK3CA 遺伝子導入株では AG1478 による死細胞数が有意に減少していた (図1)。この事実から、PIK3CA 遺伝子変異は口腔癌に対する EGFR 阻害剤の効果予測因子の一つであることが明らかになった。

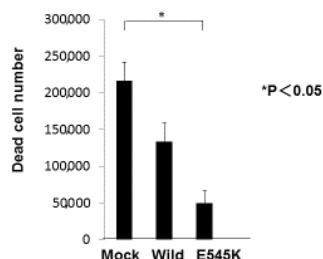


図1 The sensitivity of Oral SCC cells to AG1478 depends on PIK3CA gene status

(3) 添加時間 2 時間では、コントロール、デグエリン単剤、AG1478 単剤、および併用群においてリン酸化型 AKT 蛋白発現レベルは有意差がなかった。リン酸化型 ERK 蛋白発現レベルに関し

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

では、併用群では明らかにデグエリン単剤と比較して有意に低下していた。添加時間 12 時間ではリン酸化型 AKT 蛋白発現レベルは、併用群では明らかに AG1478 単剤と比較して有意に低下していた。また、リン酸化型 ERK 蛋白発現レベルに関しては、デグエリン単剤、AG1478 単剤、併用群はそれぞれコントロールと比較して明らかに有意に低下していた。さらに、デグエリンと AG1478 の併用効果がアポトーシスアッセイにおいて確認された。また、デグエリンと AG1478 の併用効果が生細胞数計測アッセイにおいても確認された。PIK3CA 遺伝子変異は口腔癌に対する EGFR 阻害剤の効果予測因子の一つであり、デグエリンと AG1478 の併用療法が PIK3CA 遺伝子変異を有する口腔癌を治療する際の新たなオプションの一つになることが示唆された。

### 5 . 主な発表論文等

#### [雑誌論文](計 9 件)

Yuh Baba, Yasumasa Kato. Concomitant Crown and Piece of Tray Ingestion: A Case Report. Journal of medical cases, 7: 478-479, 2016, <http://dx.doi.org/10.14740/jmc2654w>

Toyonobu Maeda, Satoshi Yuzawa, Atsuko Suzuki, Yuh Baba, Yukio Nishimura, Yasumasa Kato. RhoA mediates the expression of acidic extracellular pH-induced matrix metalloproteinase-9 mRNA through phospholipase D1 in mouse metastatic B16-BL6 melanoma cells. International Journal of Oncology, 48: 1251-1257, 2016, 103892/ijo.2016.3322

Yuh Baba, Yasumasa Kato. Promising Biomarkers to predict the efficacy of inhibitors of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase in head and neck squamous cell carcinoma. Biomarkers Journal, 3: 1, 2017, 10.21767/2472-1646.100028

Yuh Baba, Toyonobu Maeda, Atsuko Suzuki, Satoshi Takada, Masato Fujii, Yasumasa Kato. Deguelin potentiates apoptotic activity of an EGFR tyrosine kinase inhibitor (AG1478) in PIK3CA-mutated head and neck squamous cell carcinoma. International Journal of Molecular Science, 18: 262, 2017, 10.3390/ijms18020262.

Yuh Baba, Yasumasa Kato. Deguelin, a novel anti-tumorigenic agent in human esophageal squamous cell carcinoma. EBioMedicine, 26: 10, 2017, 10.1016/j.ebiom.2017.11.010.

Yuh Baba, Yasumasa Kato. Neutrophil to lymphocyte ratio as biomarkers in head and neck squamous cell carcinoma. Biomarkers Journal, 4: 14, 2018, 10.21767/2472-1646.100052

Yasumasa Kato, Yuh Baba et al. Cancer metabolism: new insights into classic characteristics. Japanese Dental Science Review, 54: 8-21, 2018, 10.1016/j.jdsr.2017.08.003

Yuh Baba, Yasumasa Kato. An unexpected accidental ingestion of dental crown with loop: a clinical image. Journal of Case Reports and Medical Images, 1: 1004, 2018, 10.33582/2639-9237/1003

Mikiko Suzuki, Keiso Takahashi, Yasumasa Kato, Yuh Baba. A maxillary sinusitis after sinus lift surgery. Journal of Dentistry and oral disorders, 4: 1100, 2018, 10.26420/jdentoraldisord.2018.1100

#### [学会発表](計 2 件)

馬場優, デグエリンは PI3kinase 変異を有する頭頸部癌細胞株にて EGFR 阻害剤の抗腫瘍効果を増強させる, 第 40 回日本頭頸部癌学会, 2016 年

Yuh Baba, Satoshi Takada. Deguelin potentiates apoptotic activity of an EGFR inhibitor (AG1478) in PIK3CA-mutated oral squamous cell carcinoma, 71th Japanese Stomatological Society, 2017.

#### [その他]

ホームページ等

[http:// www.ohu-u.ac.jp/](http://www.ohu-u.ac.jp/)

### 6 . 研究組織

#### (1)研究分担者

研究分担者氏名：高田 訓

ローマ字氏名：(TAKADA, satoshi)

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

所属研究機関名：奥羽大学

部局名：歯学部

職名：教授

研究者番号(8桁): 40254875

研究分担者氏名：加藤 靖正

ローマ字氏名：(KATO, Yasumasa)

所属研究機関名：奥羽大学

部局名：歯学部

職名：教授

研究者番号(8桁): 50214408

研究分担者氏名：藤井 正人

ローマ字氏名：(FUJII, masato)

所属研究機関名：独立行政法人国立病院機構(東京医療センター臨床研究センター)

部局名：その他部局等

職名：研究員

研究者番号(8桁): 70129633

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、研究者個人に帰属されます。