

令和元年9月3日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20625

研究課題名(和文)免疫学的作用機序に着目したセツキシマブ感受性因子の検討

研究課題名(英文)The search of factor which regulate sensitivity to cetuximab focused on immunological alteration

研究代表者

野口 映 (Noguchi, Akira)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・助教

研究者番号：10456395

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：セツキシマブはEGFRを標的とした抗体薬であるが、その作用機序は解明されているとは言いがたい。本研究は、ジェネティクス、エピジェネティクス、Immunologyといった多方面から解析する事で、セツキシマブの作用機序解明を試みた。次世代シーケンサーによる遺伝子変異解析では、対象とした細胞においてEGFRの有意な変異はなく、HRAS変異が一部の細胞で見られる程度であった。エピジェネティックな検討では、ある種のHDAC阻害剤との併用により、EGFRのmRNA値の上昇を認め、セツキシマブ感受性を獲得するものがみられた。特に影響の強くみられた細胞では、形態的に細胞間の結合性の低下がみられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

頭頸部領域は解剖学的に生命活動にとって重要な臓器・感覚器が集中していることにより、治療の際には機能障害や容貌の変化をも見越した戦略が必要となっている。セツキシマブは非常に有用な化学療法剤であるが、その効果を予測する確立した因子は未だない。本研究はこれまで十分検討されていなかった免疫機構やエピジェネティックな変化に着目することにより、セツキシマブの作用機序の解明、新規のサロゲートマーカーの創出を目的とした。本研究結果からは、ある種のHDAC阻害剤を併用することで、セツキシマブの増強効果を示す可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Cetuximab is the chimeric (mouse/human) monoclonal antibody which targetted epidermal growth factor receptor (EGFR). Despite its undeniable therapeutic value, we still do not fully understand the mechanisms of action responsible for cetuximab's anti-tumor effects in the head and neck squamous cancer (HNSCC). In this study, alterations in EGFR and its downstream genes in seven SCC cell lines (B-88, HSC-2, HSC-3, HSC-4, KOSC-2, SAS and A431) were assessed through next generation sequencing. The effect of cetuximab and HDACi, alone and in combination, on the viability of these cells were evaluated. As a result, the cells which indicated cetuximab resistance got susceptibility by treatment with HDACi. Morphologically cellular adhesion is decreased. The mRNA level of EGFR was elevated after treatment with HDACi. Our data suggested that combinations of cetuximab with HDAC inhibitor could be potential novel treatment strategies for HNSCC.

研究分野：口腔癌

キーワード：セツキシマブ EGFR 扁平上皮癌 口腔癌 頭頸部癌

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

頭頸部領域は解剖学的に生命活動にとって重要な臓器・感覚器が集中していることにより、治療の際には機能障害や容貌の変化をも見越した戦略が必要となっている。上皮成長因子受容体（EGFR：Epithelial growth factor receptor）は頭頸部扁平上皮癌（HNSCC）の90%以上で発現しており、重要な増殖因子であるとともに、分子標的の1つである。EGFRに対するモノクローナル抗体であるセツキシマブが、シスプラチン以来約30年ぶりにFDAにレジメンが承認され、頭頸部領域におけるはじめての分子標的薬として、臨床応用が開始された。セツキシマブは非常に有用な化学療法剤であるが、無効予測因子として知られるK-ras変異がHNSCCでは極めて少ないといった問題、免疫染色におけるEGFRの発現強度とセツキシマブの治療効果には相関がみられないという問題があり、その効果を予測する確立した因子は未だない。つまり、高頻度で高発現を示すEGFRの抗体薬に対し、非奏効症例が少なからず存在するのである。

2. 研究の目的

本研究ではこれまでの研究より得られた知見、すなわちジェネティックな変化に加え、今まで検討されていなかった免疫機構やエピジェネティックな変化に着目することにより、セツキシマブの作用機序の解明、新規のサロゲートマーカーを創出することを目的とした。

3. 研究の方法

・EGFRの発現量の確認

ヒト由来扁平上皮癌細胞株（B-88、HSC-2、HSC-3、HSC-4、SAS、KOSC-2、Ca9-22、A431）を対象とし、通常培養条件下（DMEM+10%FBS、5%CO₂、37℃）の各種細胞よりRIPAバッファーを用い、タンパク抽出を行った後、ウエスタンブロット法にてEGFRのタンパクレベルを調べた。

・セツキシマブ感受性の確認

各々2,000個の細胞を、96ウェルのプレートにまき、24時間培養後、各濃度のセツキシマブを添加（0.05、0.15、0.31、0.63、1.25、2.5、5.0、10.0 mg/ml）し、72時間培養したのち、生細胞測定キットWST-8（Dojindo）を加え、37℃にて1時間反応させ、マイクロプレートリーダーにて450nmで吸光度を測定した。

・次世代シーケンシスによる遺伝子変異プロファイルの確認

Ion AmpliSeq Cancer Hotspot Panel v2を用い、Ion torrent（ライフテクノロジー社）にて50種の癌関連遺伝子をターゲットリシーケンシスした。

・HDAC阻害剤とセツキシマブ併用効果の確認

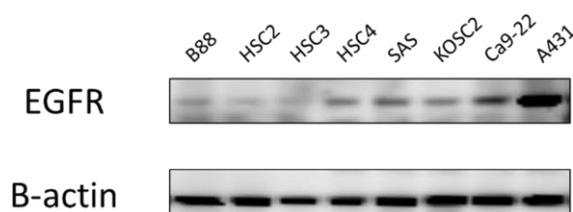
各々2,000個の細胞を、96ウェルのプレートにまき、24時間培養後、5種のHDAC阻害剤（Splitomycin、Apicidin、Valproic acid、Trichostatin A、HDACx）とセツキシマブを添加（5.0 mg/ml）し、24時間培養。非投与群、セツキシマブ単独群、HDAC阻害剤単独群、セツキシマブ+HDAC阻害剤併用群における細胞数の変化を生細胞測定キットWST-8（Dojindo）を用い、450nmで吸光度を測定した。

・HDACxとセツキシマブ併用時のEGFRのmRNA発現量の確認

B-88細胞にてセツキシマブとセツキシマブ+HDACx併用投与時におけるEGFRのRNA発現量をリアルタイムPCR法により、経時的に測定し、比較した。

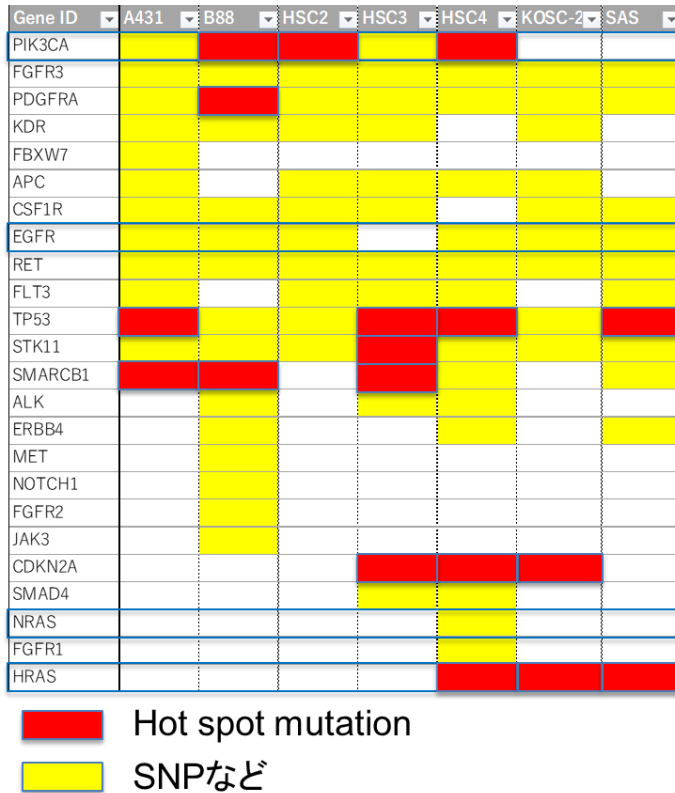
・免疫不全マウスに歯肉癌組織のゼノグラフトし、セツキシマブ0.15ml、セツキシマブ+HDACxを週3回腹腔内投与した。

4. 研究成果



ヒト由来扁平上皮癌細胞株におけるEGFRのタンパクレベルは、多くは低発現で、高発現を示したのはA431細胞のみであった。また、セツキシマブに感受性を示したものはA431細胞のみであった。

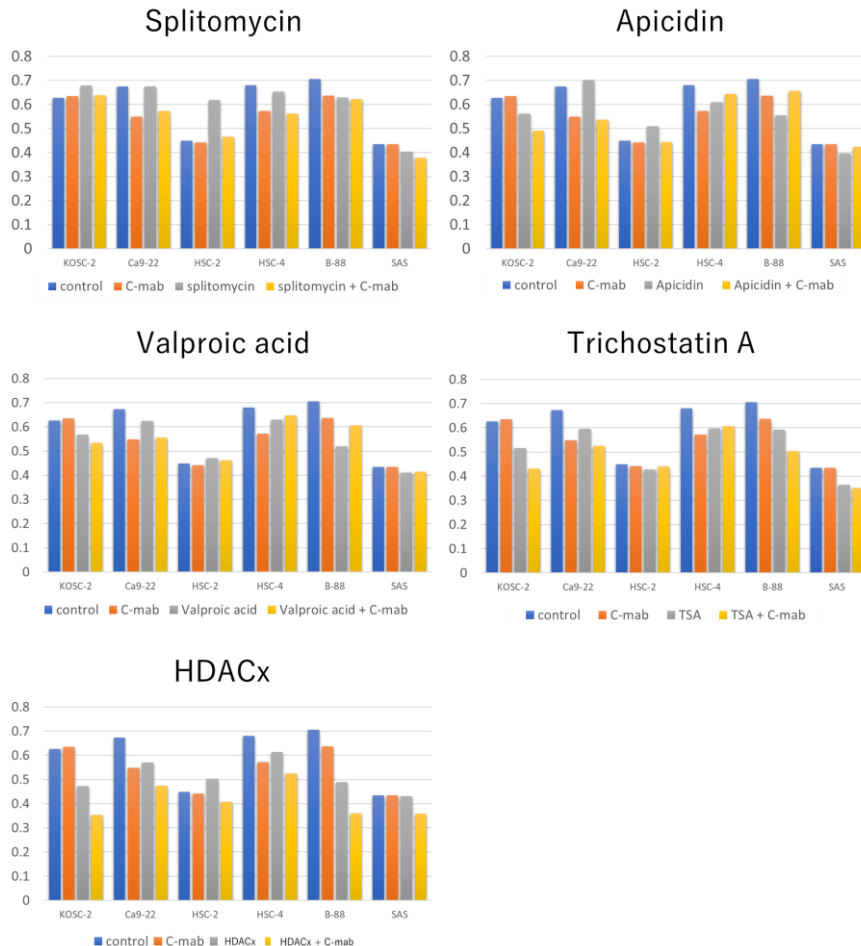
・ヒト由来扁平上皮癌細胞株における遺伝子変異プロファイル結果



各細胞における遺伝子変異プロファイルを左図に示す。EGFR は A431、B88、HSC2、HSC4、KOSC-2、SAS に変異がみられたが、いずれも NC_000007.13:g.55249063G>C という SNP で、有意な変化ではなかった。シグナル伝達系における変化としては頻度の低いもの含めると、HRAS の hot spot mutation (COSM249860 : p.H27H) が、HSC4、KOSC-2、SAS にそれぞれみられた。

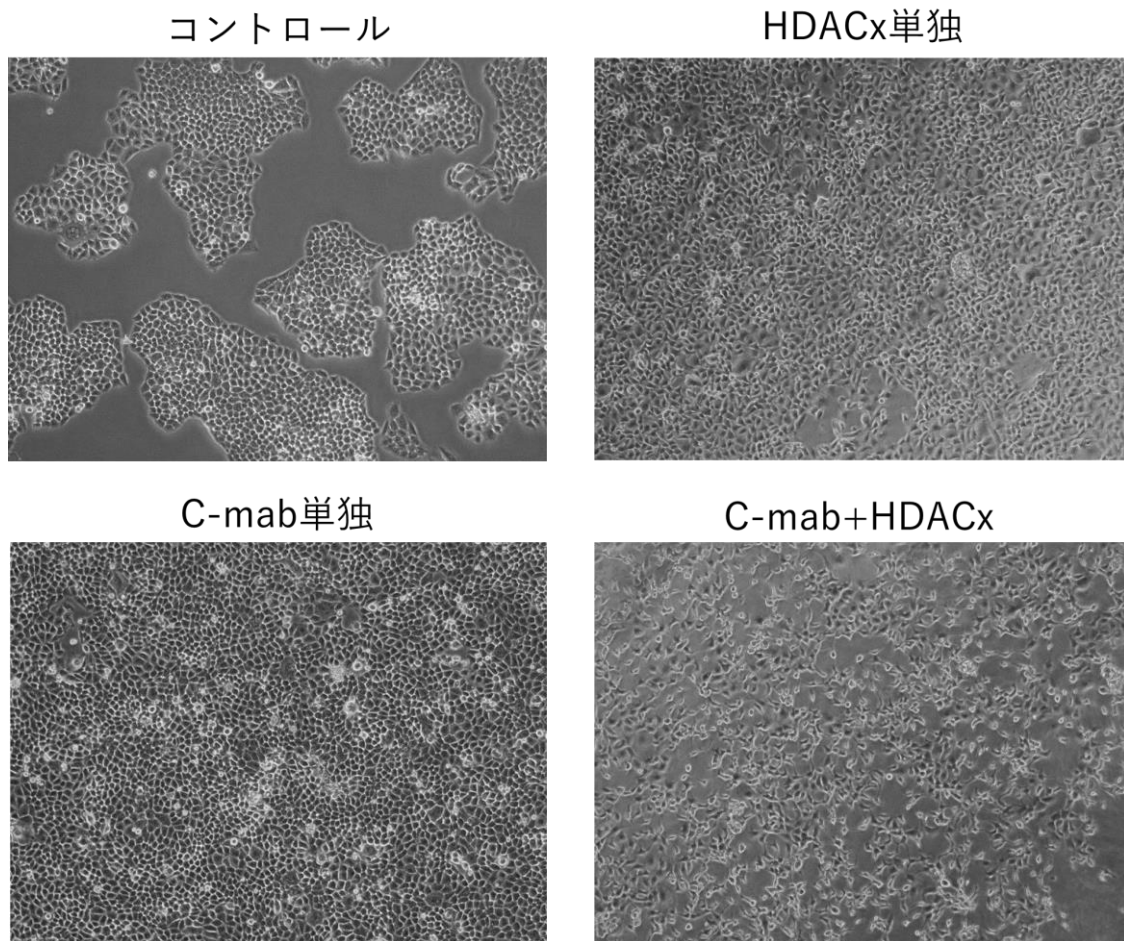
・HDAC 阻害剤とセツキマブ併用効果の確認

Splitomycin、Apicidin、バルプロ酸、トリコスタチン A では有意な変化はみられなかったが、HDACx 投与群ではセツキシマブとの併用により相加・相乗的な効果がみられた。



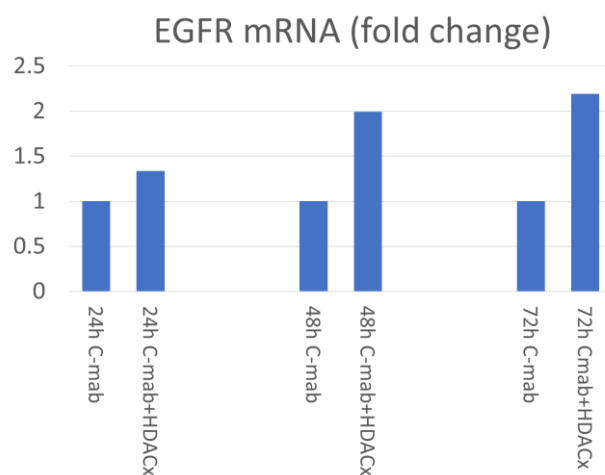
・ B-88 細胞のセツキシマブ、HDACx 投与による形態的な変化

通常培養条件下では胞巣状に増殖する細胞が、セツキシマブと HDACx 併用時では細胞間に結合性が失われ、変性をきたしていた。

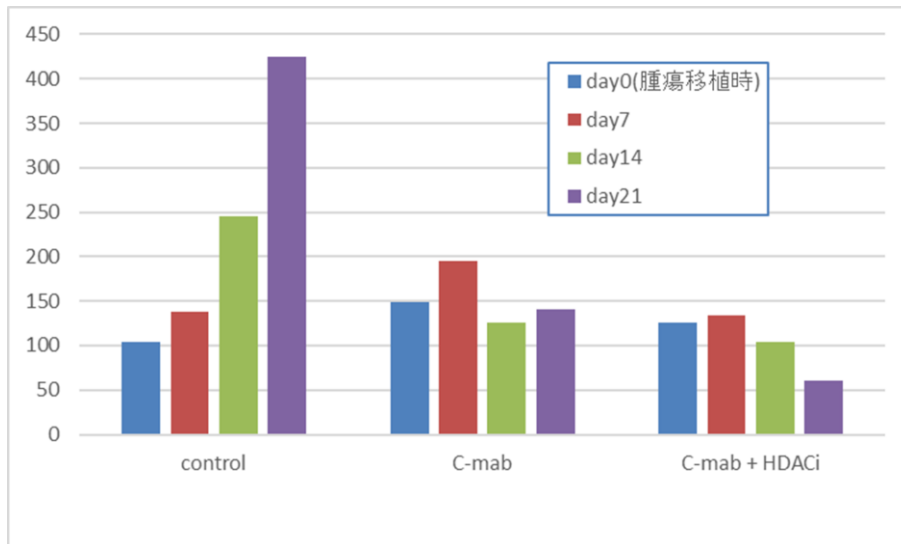


・ HDACx とセツキシマブ併用時の EGFR の mRNA 発現量の確認

セツキシマブ+HDACx 併用投与時において EGFR の RNA 発現量が経時的に上昇していた。

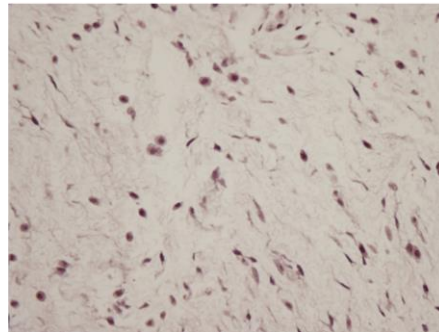
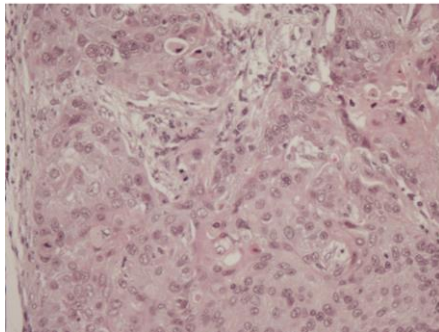


・免疫不全マウスにおけるセツキシマブ+HDACx 併用の評価



Control

C-mab+HDACx



コントロールと比較し、セツキシマブと HDAC 阻害剤を併用した群では著明な腫瘍縮小効果がみられた。

本研究にて調査した扁平上皮癌由来細胞株は EGFR の発現量が低いものが多く、セツキシマブ感受性を示したものは、A431 のみであった。セツキシマブと各種 HDAC 阻害剤との併用効果の検討では、一部の細胞で相加的な効果を示し、EGFR の発現量の増加を認めた。今後はメカニズム解明に向けて、実験を計画中である。具体的には、CRISPR-Cas9 Activation Plasmid を使用し、EGFR 高発現株の作製している。EGFR のシグナル伝達経路 (Ras/Raf/MAPK 経路、PI3K/Akt 経路、Jak/STAT 経路) の評価などを予定している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 件)

〔学会発表〕 (計 1 件)

野口 映、高木正之
エピジェネティック変化に着目したセツキシマブ感受性因子の探索
第 108 回日本病理学会総会、2019 年、東京

〔図書〕 (計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※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。