

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18791223
 研究課題名 (和文) 頭頸部癌における EGFR 遺伝子変異の EGFR 阻害剤感受性への影響についての研究
 研究課題名 (英文) Influence of EGFR gene mutation in the response of anti-EGFR drug for squamous cell carcinoma of the head and neck
 研究代表者
 田口 享秀 (TAGUCHI TAKAHIDE)
 横浜市立大学・医学部・助教
 研究者番号：60315786

研究成果の概要：頭頸部扁平上皮癌において、遺伝子変異 (Exon20 での SNP) と EGFR 蛋白および EGFR mRNA 発現量が EGFR 阻害剤である gefitinib の感受性への効果予測因子として関連している可能性が示唆された。また、gefitinib と HER2 阻害剤である trastuzumab との併用効果に関しては、幾つかの細胞で gefitinib 単剤と比較して 2 剤併用による感受性の増強が認められた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,100,000	0	1,100,000
2007 年度	500,000	0	500,000
2008 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,100,000	150,000	2,250,000

研究分野：頭頸部外科

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 耳鼻咽喉科学

キーワード：頭頸部癌、EGFR、遺伝子変異、gefitinib、HER2、遺伝子コピー数

1. 研究開始当初の背景

固形癌に対する従来の治療法である手術と放射線治療の組み合わせのみでは、進行癌の生存率は十分とはいえない。そこで生存率の改善および臓器・機能の温存を目的として集学的治療に化学療法が取り入れられ、生存率や臓器温存率の改善は示されてきているものの、固形癌に対する効果は限られ、かなりの有害事象を伴ってきた。そのため癌の増殖を引き起こしている分子経路の異常を標的とし癌細胞と正常細胞を見分け、少ない副作用で高い奏効率を達成しようとする治療法として分子標的治療が考えられている。

種々の癌に高発現している epidermal growth factor receptor (EGFR) は、癌の進行度、転移および予後に関係していると報告されている。また EGFR のシグナルは細胞増殖だけでなく血管新生や DNA 修復にも関与していると考えられており、分子標的治療への応用が行われている。頭頸部扁平上皮癌や非小細胞肺癌において EGFR 阻害剤により増殖抑制効果のあることが示されており、EGFR tyrosine kinase inhibitor や EGFR antibody が臨床に導入されてきている。しかし、その臨床効果には性別、人種、組織型あるいは喫煙歴などにより違いがみられており、また抗腫瘍作用

の機序については十分に解明されていない。このような EGFR 阻害剤の効果の違いに関与するものとして、EGFR 遺伝子変異に関心がもたれている。

当科で樹立した多くの培養細胞においても EGFR 阻害剤への感受性の違いがあり、EGFR 遺伝子変異が腫瘍増殖および EGFR 阻害剤への感受性に関与している可能性がある。

2. 研究の目的

頭頸部扁平上皮癌培養細胞において EGFR 阻害剤(gefitinib)による抗腫瘍効果を検討する。頭頸部扁平上皮癌培養細胞における EGFR 遺伝子の解析、および蛋白質、mRNA の発現量を同定する。これら培養細胞の EGFR 遺伝子変異、蛋白質および mRNA の発現量と EGFR 阻害剤への感受性との関連性を検討し、その動態を把握する。Tyrosine kinase の反応経路である ERK、AKT および STAT3 の発現を検討し、その作用機序についても検討を行う。

3. 研究の方法

(1) 頭頸部扁平上皮癌培養細胞において EGFR 遺伝子変異の検索と EGFR の mRNA および蛋白質の発現量を確認する。

①培養細胞は当科で樹立した頭頸部扁平上皮癌細胞株(16種)および KB 細胞、A431 細胞を用いる。

②EGFR 遺伝子(exon18-exon23)変異は DNA サイクルシーケンス法にて検索する。

③mRNA の発現・定量は real-time PCR で評価する。

④蛋白質の発現・定量は Western blotting で評価する。

(2) EGFR 阻害剤(gefitinib, trastuzumab)で処理を行い、腫瘍増殖抑制効果を検討する。腫瘍増殖抑制効果の評価は MTT survival assay を用い、IC50 値を求める。

(3) 頭頸部扁平上皮癌培養細胞において EGFR 遺伝子変異の有無による諸因子の発現と EGFR 阻害剤処理後の変動につき検討する。

Tyrosine kinase の反応経路に関与する因子として ERK、AKT および STAT3 の発現と変動を Western blotting で検討する。

(4) gefitinib 感受性に影響する作用機序に関して、EGFR 遺伝子コピー数との関連性について Fish 法を用いて検討する。

4. 研究成果

(1) EGFR 蛋白質は全ての培養細胞において発現しており、EGFR mRNA もまた全ての培養細胞において発現していた。EGFR 蛋白質の発現レベルは mRNA の発現レベルと有意に相関し、gefitinib に対する IC50 値とも有意に相関していた。さらに、EGFR の mRNA 発現レベルも gefitinib に対する IC50 値と有意に相関していた。

Figure 1

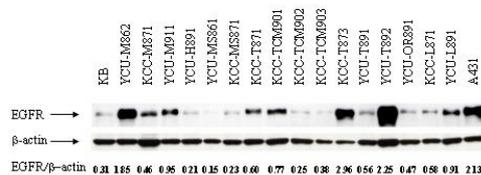
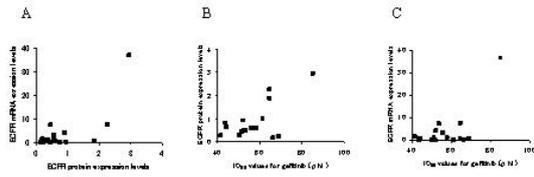


Figure 2



(2) 頭頸部癌培養細胞 16 細胞中 9 細胞 (56.3%) と高頻度に exon 20 での single nucleotide polymorphism (SNP) を認め、これは National Center for Biotechnology Information (NCBI) SNP データベースに rs1050171 として登録されている。この SNP は silent mutation であり蛋白質の一次構造には変化を与えない同義 SNP (synonymous SNP) (Q787Q) と考えられているが、今回の検討では EGFR G/A 遺伝子型群は EGFR G/G 遺伝子型群に比べて高い gefitinib 感受性を示した。但し、頭頸部癌において EGFR G/A 遺伝子型が gefitinib 感受性に影響する作用機序に関しては、EGFR の下流シグナル伝達経路である Ras-MAPK 経路、STAT 経路の検討からは明らかにすることができなかった。

Figure 3

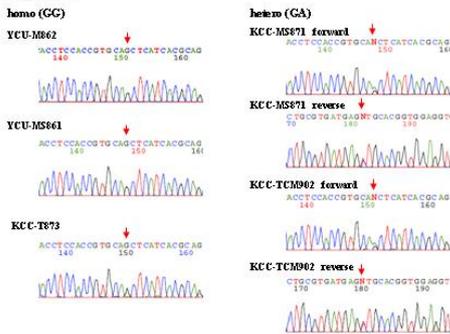
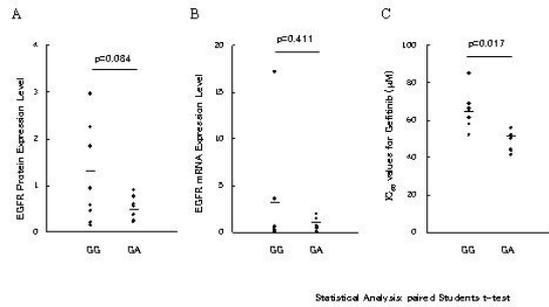


Figure 4



(3) EGFR 蛋白、HER2 蛋白ともに全細胞株で発現していたが、gefitinib、trastuzumab それぞれの腫瘍増殖抑制効果 (IC₅₀ 値) との相関は認められなかった。gefitinib と trastuzumab との併用効果に関しては、幾つかの細胞で gefitinib 単剤と比較して 2 剤併用による感受性の増強 (IC₅₀ 値の低下) が認められた。この効果は作用時間により異なり、24 時間後、48 時間後、および 72 時間後それぞれ有効な細胞株が認められたが、1 細胞においては全ての作用時間において有効性が認められた。

(4) EGFR 遺伝子コピー数と gefitinib に対する感受性においては相関性を認めなかったが、EGFR G/A 遺伝子型群と EGFR G/G 遺伝子型群との比較で有意差が認められた。

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 2 件)

① Taguchi T, Tsukuda M, Imagawa - Ishiguro Y, Kato Y, Sano D: Involvement of EGFR in the response of squamous cell carcinoma of the head and neck cell lines to gefitinib. *Oncol. Rep.*, 19: 65-71, 2008. 査読有り

② Kondo N, Ishiguro Y, Kimura M, Sano D,

Fujita K, Sakakibara A, Taguchi T, Toth G, Matsuda H and Tsukuda M: Antitumor effect of gefitinib on head and neck squamous cell carcinoma enhanced by trastuzumab. Oncol Rep, 20: 373-378, 2008.
査読有り

〔学会発表〕(計 1件)

①中崎浩一(湘南病院 耳鼻咽喉科), 稲山嘉明, 田口享秀, 佃 守、FISH法による頭頸部扁平上皮癌培養細胞における epidermal growth factor receptor (EGFR) 遺伝子増幅の検討、第109回日本耳鼻咽喉科学会、2008年5月、大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田口 享秀 (TAGUCHI TAKAHIDE)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：60315786

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし