

令和 6 年 6 月 1 日現在

機関番号：32661

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2023

課題番号：18K16908

研究課題名(和文) 癌生存シグナルを標的とした外耳道癌に対する新規保存的治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel conservative treatment for targeting survival signaling in the External auditory canal squamous cell carcinoma.

研究代表者

穠山 直太郎 (Akiyama, Naotaro)

東邦大学・医学部・講師

研究者番号：90554238

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：Epidermal growth factor receptor (EGFR)のエフェクター分子、phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1)は頭頸部扁平上皮癌で抗アポトーシス作用による癌生存シグナルへ関与する。外耳道EGF過剰発現マウスモデルを用いてEGFR/PDK1シグナル阻害効果を検討した結果、EGF、EGFR、PDK1、Ki67陽性率が低下し、免疫組織化学により、アポトーシス誘導を認めた。外耳道扁平上皮癌ではEGFR/PDK1シグナル阻害はアポトーシスが誘導により抗腫瘍効果を発揮する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

外耳道扁平上皮癌は希少がんであり、その病態については不明な点が多い。治療法は手術を第一選択として放射線治療や化学療法が挙げられるが、十分な治療法が確立しているとは言い難い。本研究成果により、新規治療法の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1), an effector molecule of epidermal growth factor receptor (EGFR), is involved in cancer survival signaling through anti-apoptotic effects in head and neck cancers. Using a mouse model overexpressing EGF in the external auditory canal, we investigated the inhibitory effect of EGFR/PDK1 signaling and revealed that EGF, EGFR, PDK1, and Ki67 were significantly decreased immunohistochemically and apoptosis was in an apoptotic analysis. It was suggested that EGFR/PDK1 signal inhibition may exert an anti-tumor effect by induction of apoptosis in squamous cell carcinoma of the external auditory canal.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：癌生存シグナル 外耳道扁平上皮癌 EGF PDK1 エレクトロポレーション

## 1. 研究開始当初の背景

外耳道癌の罹患率は人口 100 万人あたり 1%と希な疾患であり、病態については未だ不明な点も多いため、治療法は外科的切除が基本となっている。進行癌では側頭骨(亜)全摘などの拡大手術と遊離皮弁による再建が必要となる場合が多く聴力喪失だけでなく整容的にも大きな負担をかけることが問題である。生命予後については早期 (T1-2N0) であれば低侵襲の手術で比較的制御可能である (5 年生存率>80%) もの、進行癌 (T3-4N1-3) は拡大手術に化学放射線療法を併用しても 5 年生存率は 60%未満という報告 (Morita S, *et al.*, *Otology & Neurotology*. 2017) もあり非常に不良である。そこで、動物実験モデルを用いた発癌機構の解明および新規保存的治療の開発が早期に望まれる。

上皮成長因子、Epidermal Growth Factor (EGF) は 53 アミノ酸残基及び 3 つの分子内ジスルフィド結合から成る約 6.0kDa のタンパク質で細胞表面の上皮成長因子受容体 (EGFR) に結合し細胞増殖を誘導し、上皮の恒常性維持や組織修復などに関わるが、様々な上皮系悪性腫瘍において癌細胞増殖、血管新生、転移との関連性が強く示唆されている (Tomas A, *et al.*, *Trends Cell Biol.* 2014)。頭頸部癌においても EGF は治療ターゲットとして着目されている (Liao YH, *et al.*, *Oncogene*. 2017, Hsu JY, *et al.*, *FASEB*. 2017) が生体内における EGF による発癌・進展機構については未だ不明な点が多く治療制御も十分とは言い難い。

頭頸部扁平上皮癌を含め、癌細胞では EGFR の過剰発現と予後不良群との関連性を示唆する報告が多い (Tomas A, *et al.*, 2014)。EGFR は受容体型チロシンキナーゼであり、リガンドが結合すると 2 量体化し細胞内ドメインが自己リン酸化を受け、MAPK シグナリングカスケードや PI3K 経路を介し、細胞増殖を誘導する。リガンドと結合した EGFR は細胞膜のクラスリン被覆小胞から細胞内に取り込まれ (インターナリゼーション)、エンドソームに取り込まれユビキチン化などにより代謝された場合はシグナルが抑制されるが、エンドソームから EGFR が再び細胞膜上にリクルートされた場合は逆にシグナルが増強する (Tomas A, *et al.*, 2014)。一般的に EGF 濃度依存的にリガンド依存的なシグナルは増強するが前述 EGFR 制御に加え、リガンド非依存的なシグナル経路が複数存在することが示唆されており (Tomas A, *et al.*, 2014)、EGFR をターゲットとした治療法の難しさの一因となっている。さらに、癌組織や癌細胞株では EGFR の遺伝子変異が認められるため受容体をターゲットとした分子標的治療を一層困難にしている。EGF シグナルによる癌発症のメカニズムおよび治療法を考案する上ではカスケードのより上流での阻害が重要と考えられるが EGF 誘導性の発癌動物モデルは報告が少なく外耳道癌については未だ存在しない。われわれは非公表ながら先行研究で EGF ベクターを用いたエレクトロポレーション法 (Yamamoto-Fukuda, *et al.*, *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2015) による EGF 誘導性外耳道癌誘発モデルの作製に成功した。本モデルを用い、EGF 過剰発現による外耳道癌発症機構を解明できる可能性があり、新たな治療ターゲット因子の同定および外耳道癌に対する新規保存的治療の開発につながる可能性が期待される。

## 2. 研究の目的

上皮成長因子、Epidermal Growth Factor (EGF) は頭頸部癌の発症に関わることが示唆されているが生体内における発癌機構については未だ不明な点が多い。外耳道扁平上皮癌の治療法は手術療法が主体であり、早期であれば外科的切除により局所制御が可能な場合も多いが進行癌については高率にリンパ節転移をきたし、拡大手術と化学放射線療法を施行しても制御困難である場合が多く未だ予後不良である。われわれは非公表ながら EGF 発現ベクターを用いて外耳道癌誘導マウスモデルの作成に成功した。そこで、本モデルを用い外耳道扁平上皮癌の生体内における分子生物学的制御機構を解析することで新規保存的治療の開発を目指すことが本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

ヒト外耳道扁平上皮癌のパラフィン包埋切片を用いて抗 EGFR 抗体および抗 PDPK1 抗体による蛍光二重染色を行い、EGFR/PDPK1 の発現および局在解析を行った (倫理承認番号: 31-139 9638)。また、6 週齢、雄の BALB/c マウスを用い、外耳道に EGF 発現ベクターをエレクトロポレーション法で導入し、外耳道 EGF 過剰発現マウスモデルを作製した (動物実験承認番号: 2015-139C5)。さらに、PDPK1 阻害剤投与群 (n=4) および phosphate buffered saline (PBS) 投与群 (コントロール) (n=4) を作製した。外耳道の観察に内視鏡を用い、形態学的解析に HE 染色を行った。薬剤を 5 日間腹腔内投与した後、マウスを安楽死させ、外耳道を含めた側頭骨を採取した。4% paraformaldehyde/PBS (pH=7.4) で固定後、10% ethylenediaminetetraacetic acid (4、7 日間) で脱灰し、パラフィンに包埋し、

5  $\mu\text{m}$  の連続切片を作成し解析に用いた。免疫組織学的解析に抗 EGF 抗体、抗 EGFR 抗体、抗 PDPK1 抗体、抗 Ki67 抗体を用い、3,3'-diaminobenzidine-4HCl により発色した。アポトーシス解析は抗 cleaved caspase-3 抗体を用いた免疫組織化学および terminal deoxy(d)-UTP nick end labeling (TUNEL)法を用いた。

#### 4 . 研究成果

ヒト外耳道扁平上皮癌切片において EGFR および PDPK1 は共局在し、過剰発現していた。外耳道 EGF 過剰発現マウスモデルでは内視鏡下に全例で外耳道に隆起性病変を認め、HE 染色で上皮の肥厚を認めた。免疫組織学的解析では EGF、EGFR、PDPK1、Ki67 すべての陽性率が上昇した。さらに、PDPK1 阻害剤投与後に EGF、EGFR、PDPK1、Ki67 陽性率はすべて低下し、cleaved caspase-3 陽性率および TUNEL 陽性率は上昇した。以上の結果から外耳道扁平上皮癌における EGFR/PDPK1 シグナルの重要な役割を果たしており、EGFR/PDPK1 シグナル阻害によりアポトーシスが誘導され抗腫瘍効果を発揮する可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Naotaro Akiyama, Tomomi Yamamoto Fukuda, Hiromi Kojima.	4. 巻 142
2. 論文標題 miR-34a predicts the prognosis of advanced-stage external auditory canal squamous cell carcinoma.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Acta Otolaryngol.	6. 最初と最後の頁 537-541
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/00016489.2022.2086292.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto-Fukuda T, Akiyama N, Hirabayashi M, Shimmura H, Kojima H.	4. 巻 44
2. 論文標題 Epigenetic Regulation as a New Therapeutic Target for Middle Ear Cholesteatoma.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Otol Neurotol.	6. 最初と最後の頁 273-280
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/MAO.00000000000003795.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Naotaro Akiyama, Tomomi Yamamoto Fukuda, Mamoru Yoshikawa, Hiromi Kojima	4. 巻 -
2. 論文標題 Analysis of the epidermal growth factor receptor/phosphoinositide-dependent protein kinase-1 axis in tumor of the external auditory canal in response to epidermal growth factor stimulation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Laryngoscope Investigative Otolaryngology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto-Fukuda Tomomi, Akiyama Naotaro, Kojima Hiromi	4. 巻 190
2. 論文標題 L1CAM-ILK-YAP Mechanotransduction Drives Proliferative Activity of Epithelial Cells in Middle Ear Cholesteatoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The American Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 1667 ~ 1679
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ajpath.2020.04.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Akiyama N, Yamamoto-Fukuda T, Yoshikawa M, Kojima H.	4. 巻 35
2. 論文標題 Regulation of DNA Methylation Levels in the Process of Oral Mucosal Regeneration in a Rat Oral Ulcer Model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Histology and Histopathology	6. 最初と最後の頁 247-256
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14670/HH-18-147	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 穠山直太郎、福田智美、吉川 衛、小島博己
2. 発表標題 外耳道EGF過剰発現マウスモデルを用いたEGFR/PDPK1シグナル阻害効果の解析
3. 学会等名 第32回日本耳科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 穠山直太郎、福田智美
2. 発表標題 後天性真珠腫発症メカニズムの解析 ~ 中耳陰圧の観点から ~
3. 学会等名 第31回日本耳科学会総会・学術講演会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Naotaro Akiyama, Tomomi Yamamoto-Fukuda, Mamoru Yoshikawa, Hiromi Kojima
2. 発表標題 EGFR/PDPK1 axis in squamous cell carcinoma of the external auditory canal
3. 学会等名 The 7th East Asian Symposium on Otology (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 穂山直太郎、福田 智美、高橋 昌寛、吉川 衛、小島 博己
2. 発表標題 ラット中耳陰圧モデル鼓膜上皮および中耳真珠腫上皮における ILK-YAP シグナルの解析
3. 学会等名 第29回日本耳科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 穂山直太郎、福田 智美、高橋 昌寛、吉川 衛、小島 博己
2. 発表標題 中耳真珠腫間質におけるYAPシグナルの解析
3. 学会等名 第28回日本耳科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Naotaro Akiyama, Tomomi Yamamoto-Fukuda, Masahiro Takahashi, Mamoru Yoshikawa, Hiromi Kojima
2. 発表標題 Evaluation of YAP signaling in a Rat Tympanic Membrane Under a Continuous Negative Pressure Load and in Human Middle Ear Cholesteatoma
3. 学会等名 ARO 42nd Annual MidWinter Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------