

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：32701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20619

研究課題名(和文) 犬の頭頸部扁平上皮癌におけるアファチニブを用いた新規治療戦略の確立

研究課題名(英文) Establishment of new therapeutic strategy using afatinib in canine head and neck squamous cell carcinoma.

研究代表者

宮本 良 (Miyamoto, Ryo)

麻布大学・大学病院・特任助手

研究者番号：30822580

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、アファチニブは犬の扁桃扁平上皮癌株化細胞の増殖を強く抑制することを示した。この株化細胞では他の扁平上皮癌株化細胞と比べてEphB3およびリガンド分子Ephrin-B2が高発現しており、またEphB3のリン酸化が増強していた。アファチニブはこのリン酸化を抑制することで増殖を抑制することが示された。EphB3およびEphrin-B2の相互作用の解析において、Ephrin-B2が直接的にEphB3のリン酸化を増強することを示した。アファチニブの臨床試験では犬扁平上皮癌症例5頭中1頭で腫瘍縮小効果を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では人の肺がん治療薬であるアファチニブが一部の犬の扁平上皮癌細胞の増殖を強く抑制することを明らかにした。さらにアファチニブの作用機序は従来のものと異なり、新規標的分子であるEphB3を標的とすることを示した。今回明らかとなった扁平上皮癌細胞の増殖機構およびアファチニブ抑制機構の解明は、犬扁平上皮癌および人肺がんにおける新たな治療戦略の確立に発展する重要なデータと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Afatinib showed the strongly cell growth inhibition activity in canine tonsil squamous cell carcinoma cell line. In this study, a new therapeutic target of afatinib, EphB3, was identified. In afatinib-sensitive cell line, high expression of EphB3 and Ephrin-B2, and enhanced phosphorylation of EphB3 were observed among six canine squamous cell carcinoma cell lines. No EphB3 or Ephrin-B2 mRNA mutation was found in nucleotide analysis. In contrast, analysis of interaction between EphB3 and Ephrin-B2 showed that Ephrin-B2 induced directly enhanced phosphorylation of EphB3, and which played an important role in the growth of afatinib-sensitive cell line. In a clinical trial of afatinib, tumor shrinkage was found in one of five canine squamous cell carcinoma cases.

研究分野：がん分子生物学

キーワード：扁平上皮癌 犬 アファチニブ 分子標的療法 株化細胞 増殖機構 ドライバー EphB3

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

扁平上皮癌は犬および人における発生頻度の高い悪性腫瘍である。一般的に転移率が低く、外科的手術および放射線治療により長期生存できる可能性がある腫瘍である。しかし、扁桃に発生する犬の扁平上皮癌は極めて進行性であり、転移率が高い為、これらの治療法だけでは制御できず予後不良である。この為、新たな内科的治療戦略が必要であるが、扁平上皮癌は抗がん剤に耐性を示すことから、有効な内科的治療法は確立していない。分子標的療法はがん細胞の増殖に重要な分子 (ドライバー分子) を阻害する治療法であり、ドライバー分子を保有している患者では高い治療効果を示すことが知られている。これまでの研究においても扁平上皮癌細胞のドライバー分子の同定を試みられているが未だ同定できていない。このことから申請者は扁平上皮癌細胞に新規のドライバー分子が存在する可能性を考えた。

2. 研究の目的

犬の扁平上皮癌細胞における新規治療戦略の確立の為、以下の 3 点に焦点を絞り研究することとした。

- 1) 犬扁平上皮癌株化細胞における高感受性分子標的薬の検出
- 2) 高感受性分子標的薬の増殖抑制効果および作用機序の解析
- 3) 犬の扁平上皮癌を対象とした分子標的薬の臨床試験による抗腫瘍効果の評価

3. 研究の方法

本研究では以下の 4 点について研究することとした。

- 1) 犬の扁平上皮癌株化細胞を樹立し、420 種の阻害剤感受性をスクリーニング
これにより有望な新規治療薬を検出する。
- 2) 1) で検出した阻害剤の作用機序の解析
 - A. 犬の扁平上皮癌株化細胞 6 種における阻害剤の増殖抑制効果を解析し、IC50 を算出する。阻害剤の既知の標的分子における塩基配列および蛋白質発現を解析し、ドライバーとなる遺伝子変異の有無と過剰発現の有無を評価する。さらに、標的分子の蛋白質におけるリン酸化状態を解析する。
 - B. 標的分子が同定できない場合、リン酸化蛋白質の抗体アレイを用いて、標的分子の同定を行う。標的分子同定後は、塩基配列解析、蛋白質発現解析、リン酸化状態解析を実施する。遺伝子変異が認められた場合は、変異保有プラスミドを作製し 293T 細胞へ遺伝子導入、標的分子のリン酸化状態の変化を解析する。
- 3) ノードマウスにおける阻害剤の抗腫瘍効果の評価
阻害剤感受性扁平上皮癌株化細胞をノードマウスへ移植し、阻害剤の in vivo での抗腫瘍効果の評価する。
- 4) 犬の扁平上皮癌を対象とした阻害剤の臨床試験を実施し、抗腫瘍効果の評価
阻害剤の適切な用量および安全性の決定の為、申請者が所属している研究室が保有している健常犬 3 頭に対し、安全性試験を実施する。臨床試験については申請者が所属する施設のガイドラインに従い、承認を得た後に実施する。

4. 研究成果

- 1) 犬の扁桃扁平上皮癌株化細胞において EGFR 阻害剤であるアファチニブに対する高感受性が認められた。6 種の犬扁平上皮癌株化細胞 (扁桃 1 種、非扁桃 5 種) におけるアファチニブの効果を解析したところ、アファチニブは扁桃の扁桃扁平上皮癌の増殖を著しく抑制した (図 1)。
- 2) 高感受性扁平上皮癌株化細胞におけるアファチニブの既知標的分子 (EGFR, HER2, HER3, HER4, TXK, BTK, BRK) の塩基配列あるいは蛋白質を解析したが、これらはいずれも治療標的分子ではなかった。そこで、1325 種類のリン酸化抗体を用いた抗体アレイによる標的分子の網羅的解析を実施した。アファチニブによりリン酸化が強く抑制された 16 種類の分子を選出し、これらを siRNA によりノックダウンし、増殖抑制効果を解析した。その結果、受容体型チロシンキナーゼである EphB3 のノックダウンにより感受性細胞の増殖が抑制された。この結果から、EphB3 がアファチニブの新規治療標的である可能性を考え、犬扁平上皮

癌株化細胞における EphB3 の塩基配列解析を実施したところ、アファチニブ感受性扁平上皮癌株化細胞において、遺伝子変異は認められなかった。一方で、蛋白質解析において感受性細胞の EphB3 の高発現および EphB3 のリン酸化増強が認められ (図 2A)、アファチニブはこのリン酸化を強く抑制することを示した (図 2B)。このリン酸化増強のメカニズムを解析する為、EphB3 のリガンド分子 Ephrin-B2 の発現を解析したところ、感受性細胞において蛋白質の高発現が認められた。また Ephrin-B2 のノックダウンにより、EphB3 のリン酸化が抑制され、細胞死が誘導された。さらに、感受性細胞の細胞死は EphB3 リコンビナント蛋白質を用いた EphB3 と Ephrin-B2 の結合阻害でも認められた。このことから、Ephrin-B2 と EphB3 の結合によるリン酸化増強が増殖に重要であり、増強したリン酸化をアファチニブが抑制したと考えられた。

- 3) ノードマウスにアファチニブ感受性の扁桃扁平上皮癌株化細胞を移植し、アファチニブの抗腫瘍効果を評価した。この結果、アファチニブの著しい腫瘍縮小効果が認められた (図 3)。さらに、マウスの腫瘍組織における免疫染色では EphB3 のリン酸化が認められた。
- 4) 日本獣医生命科学大学 (申請者の前所属場所) の附属動物医療センターにおいて犬の扁平上皮癌症例を対象としてアファチニブの臨床試験を実施した (認証番号, R1-1)。全 5 頭症例中、1 頭において、腫瘍の縮小効果が見られた。

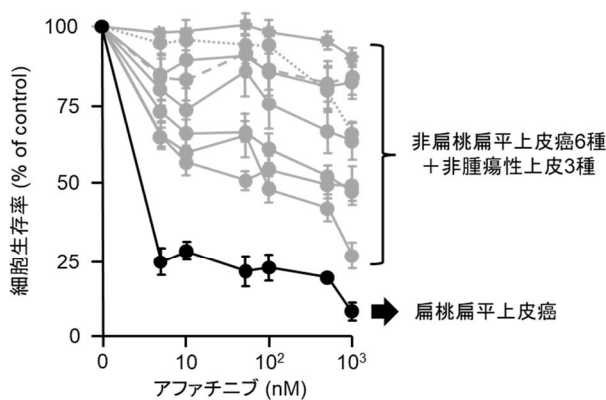


図1 アファチニブの細胞増殖抑制効果

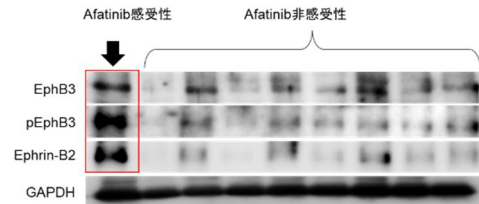


図2A 扁平上皮癌細胞におけるEphB3、Ephrin-B2発現レベルとEphB3のリン酸化状態

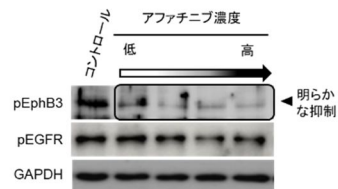


図2B アファチニブによるEphB3のリン酸化抑制

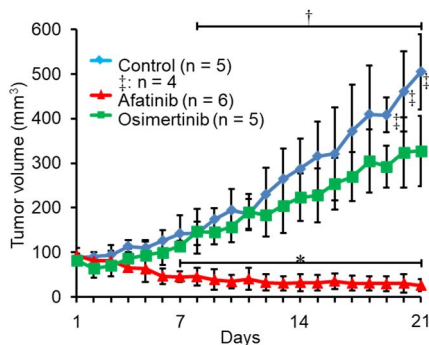


図3 ノードマウスにおけるアファチニブの細胞増殖抑制効果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Tani Hiroyuki, Miyamoto Ryo, Miyazaki Teruki, Oniki Shingo, Tamura Kyoichi, Bonkobara Makoto	4. 巻 18
2. 論文標題 A feline case of multiple myeloma treated with bortezomib	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Veterinary Research	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） 10.1186/s12917-022-03484-1	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宮本 良
2. 発表標題 犬の扁桃扁平上皮癌株化細胞におけるアフチニブの増殖抑制効果とその作用機序
3. 学会等名 獣医がん分子生物学会
4. 発表年 2023年～2024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
---------	---------