

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：31602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592546

研究課題名(和文) 頭頸部扁平上皮癌におけるEGFRインヒビター耐性機構の解明とその克服法

研究課題名(英文) Overcoming Resistance to EGFR inhibitor in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma

研究代表者

馬場 優 (BABA, YUH)

奥羽大学・歯学部・准教授

研究者番号：40597663

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：頭頸部扁平上皮癌患者に対する治療の進歩にもかかわらず、その生存率は有意に改善されていない。それゆえ、今回、私はアフリカの食物Mundulea sericea由来の天然物デグエリンの抗腫瘍効果を調査した。デグエリンは舌癌由来細胞株においてEGFで活性化されたAKTを阻害することに伴いアポトーシスを誘導することを示した。また、デグエリンは舌癌由来細胞株においてIGF1R-AKT pathwayを抑制することによりアポトーシスを誘導することを示した。IGF1R-AKT pathwayがEGFR阻害剤耐性機構の一つであると推察されているため、デグエリンがEGFR阻害剤耐性を克服する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Despite advances in the management of head and neck squamous cell carcinoma (HNSC C) patients, the survival has not been significantly improved. Therefore, the search for potential alternative therapies is encouraging. In the current study, we examined the effect of deguelin, a rotenoid from the African plant Mundulea sericea on head and neck squamous cell carcinoma cell lines. The results demonstrated that deguelin induced apoptosis by inhibiting constitutive and EGF-stimulated AKT activation. We further demonstrated that deguelin inhibited IGF1R-AKT pathway.

Cetuximab, antibody of EGFR, is applicable for HNSCC therapy. However, a mechanism of cetuximab resistance for HNSCC is thought to be IGF1R-AKT signaling in addition to EGFR-AKT pathway. Therefore, these results suggested that deguelin may overcome resistance to EGFR inhibitor in HNSCC. Further work is needed.

研究分野：医歯薬学

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 デグエリン EGFR IGF1R AKT ERK EGFR阻害剤耐性

### 1. 研究開始当初の背景

これまで、我々は、頭頸部癌に対して、PI 合成を阻害することによって、a, cyclin D1 合成阻害に伴う増殖抑制効果 (Baba, et al. Cell Biol Int 25, 2001) b, MMP 合成阻害に伴う浸潤抑制効果 (Baba, et al. Clin Exp Metastasis 18, 2000) c, VEGF による血管新生に対して抑制効果が起こることを報告し (Baba, et al. Clin Exp Metastasis 21, 2004)、頭頸部癌における PI 回路の重要性を報告してきた (Baba, et al. Cell Biol Int, 2010)。頭頸部癌においては、EGFR の過剰発現が認められており、EGFR の下流の PI - 3kinase/Akt シグナルが癌の生存、増殖、浸潤転移などに関与すると言われており、EGFR を Target とする分子標的治療薬の臨床応用がおおいに期待されていた。近年、変異型 EGFR と EGFR のチロシンキナーゼ阻害剤として開発されたゲフィニチブ (イレッサ) の感受性獲得には、L858R (エクソン 21) 15 塩基欠損 (エクソン 19) 18 塩基欠損 (エクソン 19) の関与が知られている。これらは、PI - 3kinase/Akt シグナル、および STAT シグナルの選択的活性化により、survival signal が活性化され、イレッサが、この survival signal を選択的に阻害すると言われていた (Sordella R, et al. Science 305, 2004)。すなわち、EGFR チロシンキナーゼ阻害剤を頭頸部癌患者に投与する前に、EGFR 遺伝子の変異を調べることが重要であることが示唆された。これまでの、頭頸部癌患者の EGFR 変異体に関する研究においては、白人においては、変異型 EGFR の頻度は 1/100(1%) (Loeffler-Ragg J, et al. Eur J Cancer 42, 2006) アジアにおいては、韓国では 3/41(7.3%) (Lee JW, et al. Cancer Res 11, 2005) 日本では、0/91(0%) (Sheikh Ali MA, et al. Cancer Sci 99, 2008)、6/82(7.3%) (Hama et al. Oncologist 14, 2009) と報告しており、頻度としては一般に低い傾向にある。また、我々の施設においても変異型 EGFR の頻度は 0/86(0%) であり、EGFR インヒビター耐性と関連性があるといわれている T790M 変異の頻度も 0/86(0%) であった。(Baba, et al. Journal of Oncology, 2012)。海外での臨床試験における、EGFR インヒビター単剤の奏効率は 4% (Soulieres D, et al. J Clin Oncol 22, 2004)、11% (Cohen EE, et al. J Clin Oncol 21, 2003) と低値である。理論的には、EGFR インヒビターは、EGFR の下流に存在する、PI3 - kinase/Akt 経路、STAT 経路、Ras - MAPK 経路を阻害し、EGFR が発現している頭頸部扁平上皮癌に対して、奏効するはずである。これまで、EGFR と IGF1R との、PI3 - kinase/Akt 経路を介しての cross talk の存在が、示唆されている (Jones, et al. Endocrine-Related Cancer 13, 2006)。そこで、我々は、臨床試験における、EGFR インヒビター単剤が奏効しない理由の一つと

して、EGFR に加えて、IGF1R により PI-3kinase/Akt シグナルが活性化されるのが、原因ではないかと推察した。

### 2. 研究の目的

デグエリンは、African plant *Mundulea sericea* (Leguminosae) から抽出された天然物であり、これまで、前立腺癌 [Chen HB, et al. Zhonghua Nan Ke Xue 19, 2013]、乳癌 [Mehta R et al. PLoS One 8, 2013]、食道癌 [Bai ML, et al. Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi 33, 2013] 等、様々な癌で、抗腫瘍効果が報告されている。デグエリンの抗腫瘍効果の機序としては Akt の活性化を阻害する [Chun KH, et al. J Natl Cancer Inst 95, 2003] また、Heat Shock Protein [Hsp] - 90 を阻害する [Oh SH, et al. J Natl Cancer Inst 99, 2007] などが言われている。頭頸部癌に対する抗腫瘍効果の機序としては、セラミドの合成、Akt 活性化阻害、Cyclin Dependent Kinase (CDK) 4 蛋白発現低下、およびサバイビン蛋白発現低下に伴うアポトーシスの誘導が挙げられている [Yang YL, et al. PLoS One 8, 2013]。しかしながら、頭頸部扁平上皮癌においてデグエリンの、EGFR - Akt および IGF1R-Akt pathway に対する影響については、まだわかっていない。HSP-90 は、癌の増殖・生存に関する多くのクライアント蛋白質の機能維持に必須であり、Hsp-90 阻害によって、これらクライアント蛋白質はユビキチン化され、さらに、これらのクライアントタンパク質は分解され、様々な癌細胞に対して抗腫瘍活性を示すと言われている。Hsp-90 のクライアント蛋白質の中には EGFR, Akt, および IGF1R が含まれる。このような理由から、我々は、デグエリンが、EGFR - Akt および IGF1R-Akt pathway を阻害し、頭頸部癌由来細胞株に対してアポトーシスを誘導すると予測した。

### 3. 研究の方法

(1) ヒト舌癌由来細胞株 SCC-4、および HSC-4 において、デグエリンの cell viability に与える影響について trypan blue exclusion 法により計測した。

(2) ヒト舌癌由来細胞株 SCC-4 においてデグエリンがアポトーシスをおこしうるかを Annexin 染色を用いて調査した。

(3) デグエリンの細胞周期に与える影響についてフローサイトメトリーを用いて調査した。

(4) デグエリンの、Akt, ERK, EGFR, および IGF1R 蛋白発現に与える影響につき Western blotting 法により調査した。

### 4. 研究成果

(1) SCC-4 にデグエリン 100  $\mu$ M, 24 Hr 添加すると有意差を持って viable cell が減少していた。また、デグエリン添加によって最初にまいた細胞数よりも viable cell が減少していたので、このことはデグエリンが SCC-4 において細胞死を誘導していることを示している。

(2) デグエリンは時間依存性にアポトーシスを誘導していた。

(3) デグエリンは時間依存性に細胞周期を sub G1 phase に集積させていた。これらのことは、デグエリンは SCC-4 においてアポトーシスを誘導していることを示している。

(4) デグエリン添加によって、Total AKT, 磷酸化型 AKT, および磷酸化型 ERK 蛋白発現の低下がみられた。

(5) 特異的 MEK インヒビターである UO 126 を SCC-4 に添加し、磷酸化型 ERK を阻害すると、アポトーシスの指標である Cleavage-PARP の up-regulation は認められなかった。また、LY294002 添加により磷酸化型 AKT を阻害すると Cleavage-PARP の up-regulation は認められた。この結果はデグエリンのアポトーシス誘導能に磷酸化型 ERK の阻害よりはむしろ磷酸化型 AKT の阻害が関与していることを示唆している。

(6) また、デグエリン添加により、Total EGFR 蛋白発現の低下が認められた。しかしながら、舌癌由来細胞株には constitutive に磷酸化型 EGFR 蛋白発現は認められなかった。

(7) デグエリン添加によって磷酸化型 IGF1R 蛋白発現の低下が認められた。このことは、デグエリンが IGF1R-AKT pathway を阻害することによりアポトーシスを誘導することを示唆している。

(8) HSC-4 に EGF を添加し、それに対するデグエリンの影響を検討すると、デグエリンは EGF で刺激された AKT 活性化を阻害することに伴い、アポトーシスを誘導した。

(9) IGF1R-AKT pathway が EGFR 阻害剤耐性機構の一つであると推察されているため、デグエリンが EGFR 阻害剤耐性を克服する可能性が示唆された。

#### 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3件)

Kato Y, Ozawa S, Miyamoto C, Maehata Y, Suzuki A, Maeda T, Baba Y

Acidic extracellular microenvironmental and cancer. Cancer Cell International 査読有、2013 Sep 3;13(1):89.

DOI: 10.1186/1475-2867-13-89.2013

Baba Y, Fujii M, Tokumaru Y, Kato Y

Present and future of EGFR inhibitors for head and neck squamous cell cancer. Journal of oncology, 査読有 Volume 2012, Article ID 986725, 9 pages 2012.

DOI: 10.1155/2012/986725

Baba Y, Fujii M, Tokumaru Y, Kato Y

Cetuximab for Head and Neck Cancer from bench to clinic. Journal of Solid Tumors, 査読有, Vol. 2, No. 6 2012

DOI: 10.5430/jst.v2n6p16

[学会発表](計3件)

馬場 優, デグエリンは頭頸部癌細胞株において IGF1R-AKT pathway を抑制しアポトーシスを誘導する。第 38 回日本頭頸部癌学会、2014 年 6 月 12 日~2014 年 6 月 13 日

馬場 優, デグエリンは頭頸部扁平上皮癌細胞株において AKT を抑制することに伴いアポトーシスを誘導する。第 115 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会、2014 年 5 月 14 日~2014 年 5 月 17 日

Baba Y Deguelin promotes apoptosis, accompanied with suppression of AKT pathway in head and neck squamous cell carcinoma cell lines.

The 12<sup>th</sup> Taiwan-Japan Conference on Otolaryngology-Head and Neck surgery 2013 年 12 月 5 日~2013 年 12 月 7 日

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

馬場 優 (BABA, Yuh)

奥羽大学・歯学部・准教授

研究者番号: 40597663

(2) 研究分担者

藤井 正人 (FUJII, Masato)

国立病院機構東京医療センター・聴覚平衡

覚研究部・部長

研究者番号: 70129633

(3) 連携研究者

加藤 靖正 (KATO, Yasumasa)

奥羽大学・歯学部・教授  
研究者番号： 50214408