

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592930

研究課題名(和文) HPV陽性腫瘍に対する効率的な分子標的薬投与の可能性について

研究課題名(英文) Investigation of effective use of molecular targeting on HPV related tumors

研究代表者

砂川 元 (SUNAKAWA, Hajime)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・名誉教授

研究者番号：30112452

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円、(間接経費) 1,290,000円

研究成果の概要(和文)：何十年にもわたって、白金剤が抗癌剤治療の主流をなしてきた。しかしながら、徐々に耐性が生じ、打つ手がなくなってしまうのが現状である。本研究で我々は、PDGF受容体がHGF受容体、Metの発現を上昇させ、この過程がシスプラチン耐性化に関与している可能性を提示した。PDGF受容体を阻害した結果、HPV陽性腫瘍においてシスプラチン依存的なMetの発現上昇が抑制された。PDGF受容体阻害剤は臨床分野で幅広く使用されている薬剤であり、本研究によって、HPV陽性腫瘍に生じるシスプラチン耐性化にPDGF受容体阻害剤が有効である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：For decades, platinum drugs have been the mainstay of cancer treatment. However, over time, drug resistance develops, leaving few treatment options. Here, we show that, PDGFR-mediated signaling plays a key role in HGF receptor (c-Met) upregulation, which in turn is thought to play an important role in chemotherapy resistance. PDGFR inhibition eliminates cisplatin dependent Met expression in HPV positive cancer cell lines. PDGFR inhibitors are widely used in clinical settings, suggesting that the clinical translation of our findings could reduce the suffering people from drug resistance in HPV positive cancer cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：HPV

1. 研究開始当初の背景

近年、喫煙歴や飲酒歴とは無関係な若年層(20 - 49歳)の口腔癌患者が著しく増えてきている。これら若年層の口腔癌患者の腫瘍形成にはHPV(ヒトパピローマウイルス)の関与が疑われてきている。HPVは子宮頸癌や一部の口腔癌の原因となる癌ウイルスである。しかしながら、HPV感染は健康人一般にも広く観察される。このことよりHPV感染から発癌にいたるには、また別のリスクファクターの存在が想定される。

2. 研究の目的

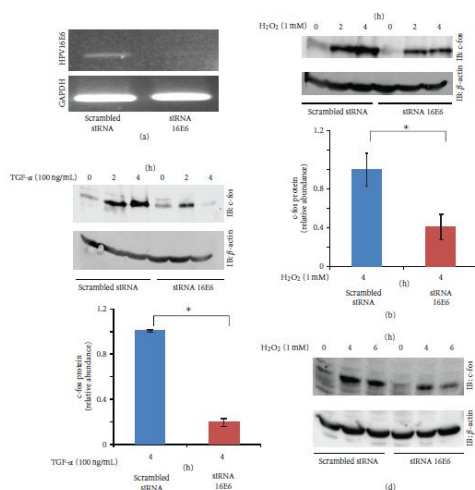
HPV感染細胞を癌化へと導くリスクファクターを見出し、そのメカニズムを解明する。得られた知見からHPV感染腫瘍に適した、治療薬、抗癌剤の使用を提案することを目的とする。

3. 研究の方法

HPV18感染細胞、HPV16感染細胞に酸化ストレスを加える。分子標的薬のターゲットとなっている様々なチロシンキナーゼ群に着目する。HPVウイルス感染依存的に活性が上昇する受容体型チロシンキナーゼの活性化機構の詳細を検討する。HPVウイルス感染特有な受容体型チロシンキナーゼの活性化を、現在幅広く臨床分野で使用されている様々な分子標的薬が阻害するか細胞生物学的手法で検討する。

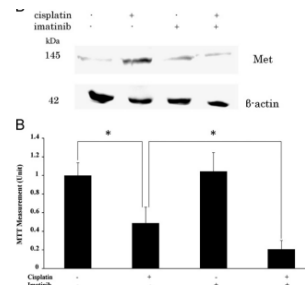
4. 研究成果

(1) HPV16E6蛋白質が酸化ストレス環境下において、癌遺伝子産物c-fosの発現上昇を促し、AP-1複合体の形成を促進させていることが判明した。さらにこの反応はEGFRの下流で制御されていることも明らかになった。この結果により、HPV感染腫瘍が酸化ストレス環境下で癌細胞としての機能を発揮する際にはEGFRを使用していることが判明した(下図)。

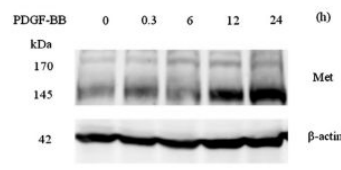


(2)シスプラチン曝露がPDGF受容体とHGF受容体Metの経路に与える影響

シスプラチン依存的な受容体型チロシンキナーゼの活性化の意義を解明するために受容体型チロシンキナーゼ阻害剤を用いた実験を行った。シスプラチン60 μMで癌細胞を曝露する直前にPDGF受容体阻害剤で前処理を行った。シスプラチン依存的なMetの発現上昇は、imatinibの前処理により抑制された。シスプラチンとimatinibを併用した場合、シスプラチン単独と比較して、相乗的に癌細胞死が誘導された。この結果は、HPV陽性腫瘍において活性酸素依存的なPDGF受容体の活性化が抑制された結果であると考えられた。興味深いことにimatinib単独では癌細胞死は、ほとんど誘導されなかった。このことより、imatinibによるPDGF受容体の阻害は、シスプラチン曝露により誘導されるMetの発現上昇や、癌細胞の生存に重要な役割を有していることが判明した(下図)。

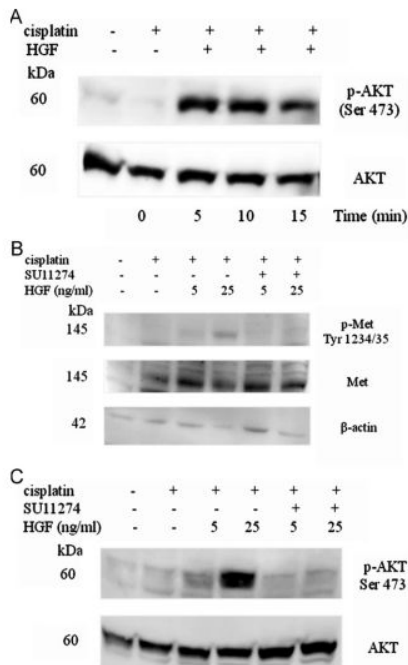


(3)PDGF存在下におけるMetの発現を検討した。PDGF-BBはPDGF受容体の主要なリガンドの一つである。HPV陽性癌細胞においてPDGF-BB刺激後のMetタンパクの発現を経時的に観察した。PDGF-BB刺激後にErkやAktの活性化が生じていることを確認した後、Metタンパク検出のためのウェスタンブロットを行った。Met蛋白質は、PDGF-BB刺激後、24時間後に最も発現が上昇していた(下図)。



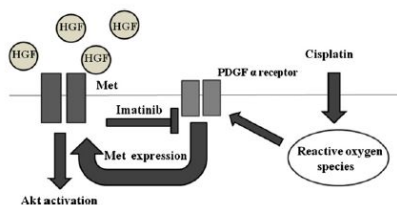
(4) HPV陽性腫瘍に対して、血清を除去した場合と、除去した後にHGFを添加した培地のそれぞれの条件でcisplatinを曝露した。HGFの添加は、シスプラチン曝露後、二日後に行った。HGFを添加した細胞では、Aktの活性化が観察されたが、無添加の細胞ではAktの活性化はみられなかった。Metの阻害剤を加えた結果、Aktの活性化は抑制された。Metの発現上昇は、血清除去下でも観察されたことより、cisplatin依存的なMetの発現上昇には血清は関わっていないことが判明した。一方、Metのリン酸化はHGF添加後のみ観察された。HGF依存的なAktの活性化は、Met阻害剤を加えると阻害されたことより、cisplatin依存的なMet経路の活性化は、autocrineの経路で生じていることが判明した。

した(下図)。



これらの実験結果から、得られるスキームを下図に示す。PDGF-BB 刺激後に Met の発現上昇までに時間がかかることより、PDGF 受容体から Met の発現制御は転写により担われていると類推できる。

活性酸素は、癌細胞に対して相反する二つの作用を有している。活性酸素は、癌細胞にアポトーシスを誘導するのみならず、受容体型チロシンキナーゼを介した生存シグナルも活性化する。我々は、本研究により、抗癌剤治療後に生じる活性酸素がアポトーシスを誘導するのみならず、PDGF 受容体を介した生存シグナルも活性化することを見出した。この結果は、抗癌剤治療と同様に活性酸素が産生される、放射線治療にも応用できると考えられる。活性酸素依存的な PDGF 受容体の活性化は、生存に関与していることが既に報告されている。HPV 陽性腫瘍において、シスプラチン曝露後に生じる活性酸素が PDGF 受容体を介して生存シグナルが誘導しているとする今回の知見は、抗癌剤と PDGF 受容体阻害剤である Imatinib の併用療法が肺癌において相乗的な効果が観察されていることの原因解明の一助になるものと考えられる。これらをまとめると、我々は本研究において、抗癌剤曝露後に生じる活性酸素は、癌細胞の周囲の微小環境から提供される HGF 等と協調的に、抗癌剤耐性を促していると推察している。



## 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 Eur J Pharmacol. 2013 Jan 15;699(1-3):227-32. "PDGF  $\alpha$  receptor is a mediator for Cisplatin-induced Met expression.". Kina S, Phonaphonh T, Liang F, Kuang H, Arasaki A, Arakaki K, Nakasone T, Sunakawa H(査読あり)
- 2 Mediators of Inflammation. Volume 2011 (2011), Article ID 263216, 7 pages. "HPV16E6-Dependent c-Fos Expression Contributes to AP-1 Complex Formation in SiHa Cells". Feixin Liang, Shinichiro Kina, Hiroyuki Takemoto, Akira Matayoshi, Thongsavanh Phonaphonh, Nao Sunagawa, Keiichi Arakaki, Akira Arasaki, Hai Kuang, and Hajime Sunakawa (査読あり)

[学会発表](計 1件)

- 1 第56回社団法人日本口腔外科学会総会・学術大会 2011年10月21日(金) ~ 23日(日)大阪国際会議場  
最新の臨床研究  
[HPV感染細胞の活性酸素感受性について]  
喜名振一郎

[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

<http://www.ryukyu-oms.jp/index.jsp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

砂川 元 (SUNAKAWA HAJIME)

琉球大学・大学院医学研究科・名誉教授

研究者番号：30112452

(2) 研究分担者

喜名 振一郎 (KINA SHINICHIRO)

琉球大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：40422422

仁村 文和 (NIMURA HUMIKAZU)

琉球大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50457678

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：