

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24792236

研究課題名(和文) 口腔扁平上皮癌におけるHSP90 とHIF-1 に対する分子標的治療の基礎的研究

研究課題名(英文) The basic research of molecular target therapy HSP90a and HIF-1a for oral squamous cell carcinoma

研究代表者

山田 慎一 (YAMADA, Shin-ichi)

長崎大学・病院(歯学系)・講師

研究者番号：50380853

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：FOXC2の発現は浸潤様式、N分類、VEGF-A、VEGF-Cとの発現との関連が認められた。過剰発現例での疾患特異的生存率の有意な低下、多変量解析の結果、独立した予後因子なる可能性が示唆された。FOXC2はFOXC2-VEGFシグナリングを介して舌扁平上皮癌細胞の増殖、浸潤に関与している可能性が明らかとなった。セツキシマブ療法を施行した切除不能再発。進行口腔癌症例においてp16、EGFRv の発現とセツキシマブの治療効果を検討したところ、EGFRv の発現は43.8%で、p16の発現は18.8%であった。治療効果との関連ではEGFRv の発現と治療効果との間にのみ有意な相関が認められた。

研究成果の概要(英文)：FOXC2 expression was associated with pattern of invasion, N classification, VEGF-A and VEGF-C expression. FOXC2 overexpression was also associated with poor disease specific survival rate. FOXC2 expression may be involved in the potential of invasion and progression of oral tongue squamous cell carcinoma via FOXC2-VEGF signaling pathway.

The expression levels of p16 and EGFRv in oral cancer patients to elucidate the association between these expression and the efficacy of the cetuximab treatment was performed. EGFRv expression was detected in 43.8% in the oral cancer patients and p16 in 18.8%. The significant relation was detected only between EGFRv expression and the treatment efficacy with cetuximab.

研究分野：外科系歯学

キーワード：FOXC2 分子標的治療薬 EGFRv

### 1. 研究開始当初の背景

われわれの研究グループでは、これまでに HSP90 についての構造や分子シャペロンの作用機構について解析を行い、また癌細胞の転移・浸潤に関係する分子に着目し、口腔扁平上皮癌での分子標的治療薬開発への基礎的検討を行ってきた。多数のクライアントプロテインと結合しシャペロン機能を行う HSP90 と癌細胞の低酸素環境への適応に寄与する HIF-1 について分子標的治療のターゲットとなることが示されれば、癌細胞の転移・浸潤能の抑制、低酸素環境下での治療抵抗性の改善が期待される。また、従来化学療法での中心である CDDP との結合部位の相違から、より少量で薬剤の効果が期待でき、また、有害事象の出現を抑え低侵襲で効果的な加療が行えるようになるものと考え。加えて、HSP90 分子シャペロン機構ならびに HIF-1 による低酸素応答機構の更なる解明に寄与するものと考え。

### 2. 研究の目的

HSP90 と HIF-1 について口腔扁平上皮癌での発現形態を検討し、加えてそれらの細胞生物学的特徴を明らかにすることで、これらをターゲットとした分子標的治療の可能性を探索する。従来化学療法の中心である CDDP とは HSP90 阻害薬であるゲルダナマイシンは作用部位が異なるために、HSP90 に対し有害事象を減じた有効な治療となりうる。加えて、低酸素誘導因子の HIF-1 をも標的とするものを開発することで、より一層の治療効果が期待でき、口腔癌患者の予後の改善が期待できる。

### 3. 研究の方法

(1)パラフィン包埋標本から薄切切片を作成する。  
(2)in situ hybridization 法による遺伝子発現の検討:HSP90、HIF-1 の cDNA プローブを設計・作成し、non-R1 法で in situ hybridization を行う。

(3)免疫組織化学的染色法による蛋白発現の検討:HSP90、HIF-1 について薄切切片を抗 HSP90 抗体、抗 HIF-1 抗体を用いて免疫組織化学的染色を行う。

(4)上記の結果と各症例の臨床病理学的因子との関連性について検討過去、われわれが口腔扁平上皮癌において転移・浸潤に関する分子について検討したもの (Yamada S., et al., Int J Oral Maxillofac Surg., 2010, Pathol Oncol Res., 2010, Cancer Lett., 2011) と同様に T 分類、N 分類等の通常の臨床所見に加え、組織学的悪性度、浸潤型、放射線および各種抗癌剤への感受性、臨床経過などの因子との関連性について検討する。

(5)半定量的 RT-PCR 法による mRNA 発現量の検討:口腔扁平上皮癌由来培養細胞 (SAS、OSC20、Ca9-22、HSC-2、HSC-3、HSC-4) から RNA を抽出し、HSP90、HIF-1 について半定量的 RT-PCR を行う。これらの培養細胞を用いて通常酸素条件下および低酸素環境下にて MTT assay、Matrigel invasion assay を行い、増殖能、浸潤能と mRNA の発現との相関性の検討を行う。

(6) HSP90、HIF-1 発現抑制細胞株を確立し、細胞生物学的特性の検討:上記の口腔扁平上皮癌由来細胞を用いて、HSP90、HIF-1 の発現抑制を siRNA により行うために、発現ベクターを構築し、siRNA 安定発現細胞株を樹立する。siRNA 安定発現細胞株を用いて、通常酸素条件下および低酸素条件下それぞれにおいて、MTT assay により増殖能を、Matrigel Invasion assay により浸潤能を、Wound healing assay により遊走能を検討し、それぞれを抑制した場合の細胞生物学的特性の変化を検討する。また、HIF-1 の核内への移行への影響を蛍光免疫染色法にて確認する。また、MMP-2、VEGF に対する影響も RT-PCR、immunoblotting により検討を行う。  
(7) 阻害剤 17-AAG、ラパマイシン作用させた場合の細胞生物学的特性への影響の検

討:HSP90、HIF-1 それぞれを阻害する17-AAG、ラパマイシンを作用させて、上記と同様に細胞生物学的特性への影響を検討する。

(8) HSP90 と HIF-1 の結合部位の検討:以前、作製した HSP90 の deletion mutant を用い、リコンビナント蛋白を精製し (Yamada S., et al., Eur J Biochem.2003) HIF-1 との結合部位を特定する。

(9) ラット口腔癌モデルの作製:HSP90、HIF-1 の siRNA による発現抑制細胞株を用いて、蛋白発現抑制群と非抑制群のラット舌癌モデルを作製する。

(10)ラット口腔癌モデルでの発現抑制による腫瘍形成能への影響の検討:上記作製の舌癌モデルを用いて、発現抑制による影響を形態的变化(ダブルタイム、転移巣形成能など)を観察、免疫組織化学的染色法、in situ hybridization 法を行い、評価・検討する。

#### 4. 研究成果

上皮間葉移行を誘導する因子の一つとされているFOXC2の舌扁平上皮癌での発現意義について検討を継続した。これまでにFOXC2の発現はstage分類、浸潤様式、T分類、N分類、VEGF-A、VEGF-Cとの発現との関連が認められた。また、FOXC2過剰発現例での疾患特異的生存率の有意な低下、単変量解析、多変量解析の結果、独立した予後因子なる可能性が示唆された。FOXC2はFOXC2-VEGFシグナリングを介して舌扁平上皮癌細胞の増殖、浸潤に関与している可能性が明らかとなった。

また、頭頸部癌において分子標的治療薬が認可され、著明な治療効果の報告がある反面、重篤なインフュージョンリアクション、薬剤性間質性肺炎の発症などの有害事象の報告もあり、治療効果を予測する因子の探索は重要である。セツキシマブ療法を施行した切除不能再発。進行口腔癌症例において p16、

EGFRv の発現とセツキシマブの治療効果を検討したところ、EGFRv の発現は43.8%で、p16の発現は18.8%であった。それぞれの分子の発現と治療効果との関連ではEGFRv の発現と治療効果との間にのみ有意な相関が認められ、疾患特異的生存率および無増殖生存率との間には相関がみられなかったが、EGFRv の発現はセツキシマブ療法の治療効果の予測因子となり得る可能性が示唆された。

セツキシマブに加えて新たな分子標的治療薬の創薬の可能性を探るためにナトリウム利尿ペプチド受容体A(NPRA)の舌扁平上皮癌での発現の意義についても検討を開始し、舌扁平上皮癌症例での免疫組織化学染色を行った。現在、発現の解析、病理組織学的因子、生存率、VEGFとの発現の関連について検討を行っているところである。

#### 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 4件)

1)Imayama N, Yamada S, et al. FOXC2 expression is associated with tumor proliferation and invasion potential in oral tongue squamous cell carcinoma. 査読有、ology and Oncology Research in press, 2015.

2)Yamada S, et al. Co-overexpression of cortactin and CRK II increases migration and invasive potential in oral squamous cell carcinoma. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology. 査読有、-21, 2014.

3)山田慎一, 他. 口腔扁平上皮癌の頸部リンパ節転移おける被膜外浸潤の進展度分類の検討. 頭頸部癌、査読有、40 巻、437-442 頁、2014 年.

4)山田慎一, 他. 当科における再発・進行口腔癌に対するセツキシマブ療法の知慮経験-

特に重篤な有害事象を認めた症例の検討  
日本口腔腫瘍学会誌，査読有，26 巻，177-1  
86 頁，2014 年.

〔学会発表〕(計 2 件)

1)山田慎一，他．口腔扁平上皮癌の頸部リンパ節転移における被膜外浸潤の進展度分類の検討．第 38 回日本頭頸部癌学会，2014 年 6 月 12-13 日，東京都.

2)山田慎一，他．口腔扁平上皮癌浸潤能におけるSkp2によるSp1を介してのMMP-2，MMP-9の発現制御．第32回日本口腔腫瘍学会総会・学術集会，2014年1月23-24日，札幌市.

〔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：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

山田 慎一 (YAMADA, Shin-ichi )

長崎大学・病院・講師

研究者番号：50380853

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし