

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 21 日現在

機関番号：87102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861567

研究課題名(和文) 頭頸部癌における新規治療ターゲット CIN85の機能解析

研究課題名(英文) Functional Analysis of c-Cbl Interacting Protein of 85 kDa in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma.

研究代表者

若崎 高裕 (Wakasaki, Takahiro)

独立行政法人国立病院機構(九州がんセンター臨床研究センター)・その他部局等・その他

研究者番号：10608871

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：今回の研究では頭頸部扁平上皮癌細胞株では、CIN85が増殖能以外に浸潤能にも正に相関していることを示した。EMT関連遺伝子には有意な変化を証明できなかった。頭頸部扁平上皮癌細胞株のマイクロアレイおよびウエスタンブロッティング実験結果から、PI3K/Akt経路の関与が新たに示すことができた。CIN85はアダプター遺伝子であり、その接合分子は多岐にわたる。多様な経路をたどり、表現型に寄与していると考えられる。

今回の研究結果から、CIN85は頭頸部扁平上皮癌においてMAPK経路以外にPI3K/Akt経路も介して腫瘍増勢、進展に寄与していることが考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, it was suggested that CIN85 went through the PI3K/Akt pathway as well as Ras/MAPK pathway, which contributes to a tumor progress in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC).

I showed that CIN85 right related to elevating invasion ability other than increasing proliferative ability in the HNSCC cell line in this study. However, I was not able to prove a meaningful relationship between CIN85 and EMT-related genes. According to both gene expression analyses and western blotting analyses of HNSCC cell lines (control v. s. CIN85 knock down), it is elucidated the participation of the PI3K / Akt pathway. CIN85 is an adapter gene, and the joint molecule diverges into many branches. CIN85 may contribute to the phenotype of cancer by various pathways.

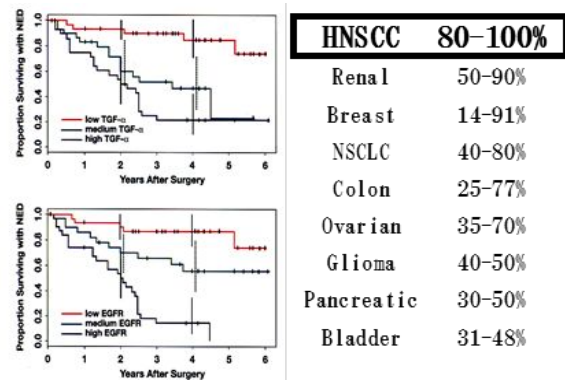
研究分野：Head and Neck Carcinoma

キーワード：CIN85 Head and Neck Squamous Cell Carcinoma

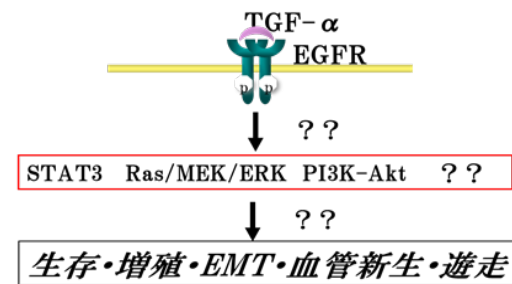
1. 研究開始当初の背景

頭頸部扁平上皮癌研究の背景

頭頸部扁平上皮癌(以下、頭頸部癌と略す)は全世界で6番目に多い癌である。手術、放射線療法、化学療法を含めた近年の治療法の進歩にもかかわらず、頭頸部癌の進行癌患者の生命予後は概して不良である [Grandis et.al. *J Natl Cancer Inst* 1998]。この観点から、近年これらの患者に対する分子標的治療の開発が注目されている。特に、epidermal growth factor receptor (EGFR) とそのリガンドの transforming growth factor (TGF)- は頭頸部癌患者の大部分 (80-100%) で発現し、それらの発現と予後との相関が報告されている(右上図)。しかし、現在までにEGFR阻害薬を用いた分子標的治療は、単独あるいは従来の治療法との併用では一定の成果を挙げつつも限定的である [Bernier J et.al. *Nat Rev Clin Oncol* 2009]。その理由として、EGFR下流シグナルが他の成長因子やサイトカインにより同様に活性化されている可能性がある。このような治療不応性を克服する代替治療の開発を阻む最も大きな問題は、頭頸部癌の悪性度を維持するのに必須のEGFRの下流シグナルに関する我々の理解不足にある。われわれは、STAT3の活性化がTGF /EGFRの下流において種々の段階で重要な役割を果し、この活性化が頭頸部癌の発生や進展にかなり関与することを示してきた [Masuda M et. al. *Cancer Res* 2002, *Curr Cancer Drug Targets* 2010]。しかし、STAT3の活性化は頭頸部癌患者の半数未満しか認められず、TGF /EGFRはSTAT3非依存性の下流経路を介して増殖シグナルを伝達していると考えられる。これらの候補となるシグナルカスケードとしては、Ras/Raf/ERK、PI3K/Aktなどが挙げられ、新たな治療ターゲットが模索されている [Bernier J et.al. 2009] (右上図/2段目)。



頭頸部扁平上皮癌の必須のTGF α /EGFRの下流シグナルの詳細はいまだ不明

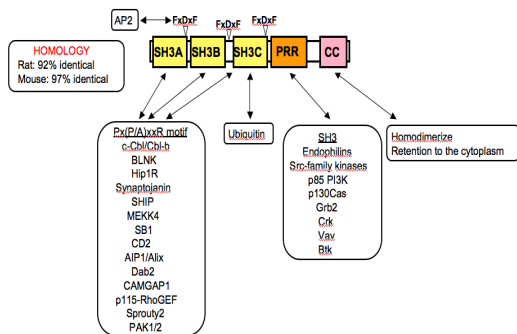


CIN85の研究背景

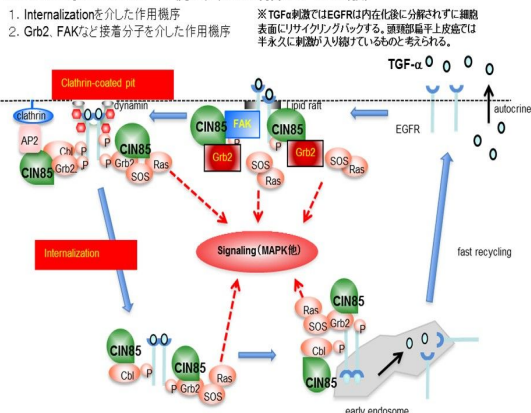
EGFR 特異的インヒビターによる治療効果は限定的だった原因として、EGFRシグナル下流での恒常的シグナル伝達などが一因と考えられ、レセプターの内在化とシグナルの両方を統合しうるアダプター蛋白 c-Cbl-Interacting Protein of 85 kDa (CIN85)に着目した。CIN85は様々な細胞に発現し、N末端にある3つのSH3ドメインと中心にある一つのプロリンリッチモチーフ、C末端にあるコイルドコイルドメインから構成される [Take H et.al. *BBRC* 2000] (次頁図)。アダプタードメインを介して上流シグナルを統合し下流分子につなぎ、機能発現をおこなう。その結合蛋白のリストは急速に増えている。CIN85の特徴的な機能のひとつのEGFRを含む receptor tyrosine kinases (RTKs) のリガンド結合後の内在化を促進する機能はすでに指摘されており、内在化後のEGFR分解に関与する腫瘍増勢に負に寄与する因子と考えられてきた。しかし近年、悪性黒色腫、子宮頸癌、

乳癌において腫瘍増勢を促進させることを示唆する報告が相次いでいる。申請者は、CIN85 発現量と臨床パラメーターの関係性の解析を行い、進行した臨床病期患者から採取した頭頸部癌組織では CIN85 が高発現していることを見だし、ヒトの癌において CIN85 発現量と腫瘍進展に関係性がある初めての証拠を示した[Neoplasia, 2010]。さらに、頭頸部癌細胞株の実験において、CIN85 は TGF- 刺激による Ras 活性化およびその下流分子である c-Raf, MEK, ERK の活性化を促進し、頭頸部癌の持続増殖に必須な c-Myc の発現量を増加、細胞増殖を促進させることを示した(下図)。最近の報告では乳がんにおいて CIN85 は PI3-Akt 経路を通じて腫瘍浸潤能を高めたとの知見が得られた。CIN85 はその結合分子からも EMT 関連遺伝子にも影響する可能性が予想される。

CIN85 (c-Cbl-interacting protein of 85 kDa)



CIN85によるTGF-α/EGFR下流シグナルの制御メカニズム(仮)



2. 研究の目的

注目した c-Cbl Interacting Protein of 85 kDa(CIN85)は細胞表面 EGFR の内在化とそれに伴う分解を促進させる分子と想定されてきた。しかし、代表者は頭頸部扁平上皮癌における CIN85 の働きを解析し、CIN85 が腫瘍増勢に関与することを報告した。近年、他の癌腫(乳癌および子宮頸癌)において同様の報告は続いており、新規治療ターゲットとして CIN85 の機能解析を進める

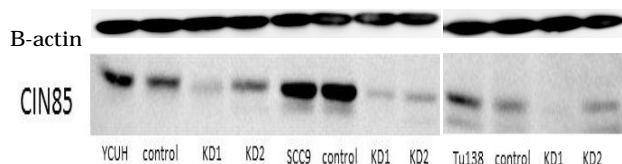
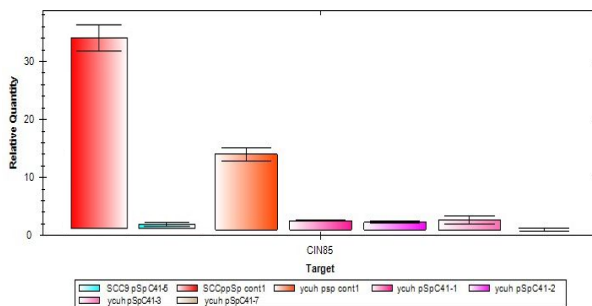
3. 研究の方法

・CIN85 発現抑制した頭頸部扁平上皮癌細胞株を複数用いて、浸潤能(invasion assay)および遊走能(scratch assay)に与える影響を検討する。

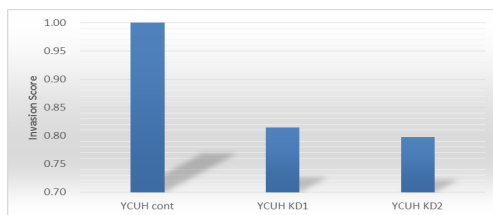
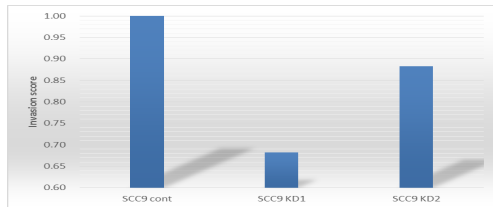
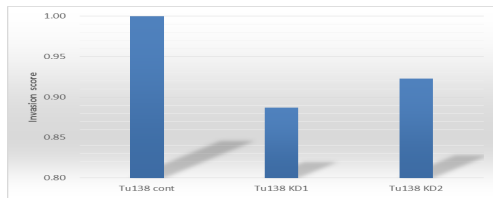
・CIN85 KD クローンとコントロールを比較した。前回の論文発表では増殖能を検討したが、今回は浸潤能及び遊走のに関して表現型を検討した。ウェスタンブロッティングにより関連遺伝子のタンパク発現を検討した。cDNA マイクロアレイにより発現解析を行い、未知の関連遺伝子の検討を行った。

4. 研究成果

CIN85KO(および一部 over expression)細胞株を樹立した。(SCC9, YCUH, Tu-138)



細胞株 CIN85KD 細胞株はコントロールに比較し、浸潤能が低下した。
BD invasion assay kit



遊走能に関しては scratch assay を行った。コントロール株と CIN85KD 株において、有意な変化は認めなかった。

cDNA マイクロアレイによるコントロール株と CIN85Knock down 株の発現比較
SCC9/cont vs SCC9/KD1 及び YcuH/cont vs YcuH/KD1

・抽出した RNA 品質は nano DROP および Agilent 2100 バイオアナライザ-で確認した。SurePrint G3 Human Gene Expression 8x60K v3 チップを使用した。

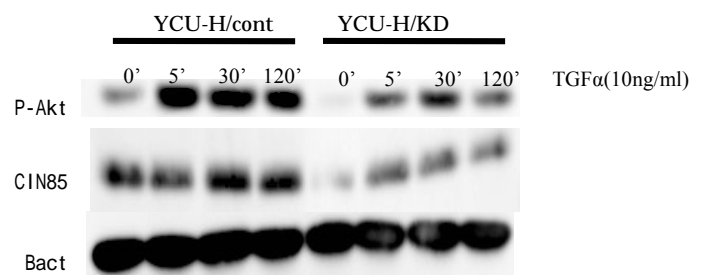
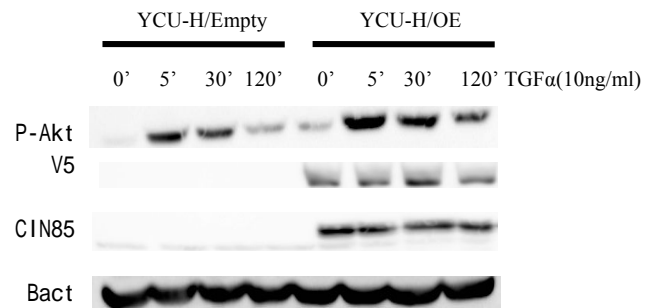
・PI3K/Akt 経路遺伝子の発現量と CIN85 は 正の相関：CIN85 ノックダウン株では、PI3K/Akt 経路および MAPK 経路の遺伝子発現量の低下を認めた。

・EMT 関連遺伝子
ICAM の一部はノックダウン株で発現量低下していた。TWIST / Vimentin / Snail / Bmi1 / Cadherin の発現量に有意差は認めなかった。

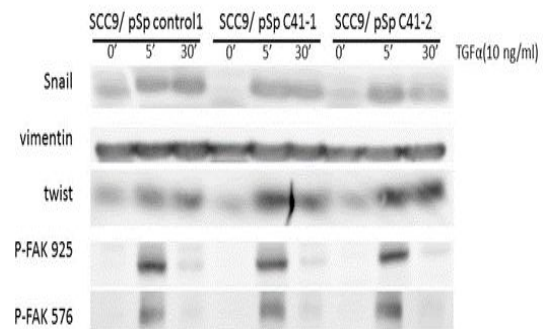
・幹細胞マーカー：CIN85 ノックダウン株で SOX2 および CD44 が発現低下を認め、CIN85 と正の相関の可能性を認めた。Nanog, oct4, ALDH, HIF1A はほぼ横ばいだった。

・多くの lncRNA の変化が生じていた。

PI3-Akt 経路には正の相関がある可能性が示唆された。YCUH CIN85 ノックダウン株、オーバーエクスペクション株で、軽度の変化ではあるが、p-Akt は正の相関を示した。



EMT 関連遺伝子 vimentin, twist, p-FAK にの発現量と CIN85 発現量はタンパクレベルで有意な相関は認めなかった。



<まとめ>

今回の研究では頭頸部扁平上皮癌細胞株では、CIN85 が増殖能以外に浸潤能にも正に相関していることを示した。EMT 関連遺伝子には有意な変化を証明できなかった。頭頸部扁平上皮癌細胞株のマイクロアレイおよびウエスタンブロットング実験結果から、PI3K/Akt 経路の関与が新たに示す

ことができた。CIN85 はアダプター遺伝子であり、その接合分子は多岐にわたる。多用な経路をたどり、表現型に寄与していると考えられる。

今回の研究結果から、CIN85 は頭頸部扁平上皮癌において MAPK 経路以外に PI3K/Akt 経路も介して腫瘍増勢、進展に寄与していることが考えられた。近年注目度の高いエピジェネティック経路である lncRNA の関与は明らかでないが、今後の研究課題としたい。

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)

1: Wakasaki T, Gotoh S, Tomonobe E, Mihara T, Fukushima J. Posterior Reversible Encephalopathy Syndrome During Combined Modality Therapy for Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. Ann Otol Rhinol Laryngol. 2016 Jun 16. pii:0003489416654710. PubMed PMID: 27317313.

2: Kubota M, Wakasaki T, Mihara T, Fukushima J. [A case of hypopharyngeal ulceration due to cytomegarovirus infection]. Nihon Jibiinkoka Gakkai Kaiho. 2014 Oct;117(10):1258-63. Japanese. PubMed PMID: 25735128.

3: Masuda M, Toh S, Wakasaki T, Suzui M, Joe AK. Somatic evolution of head and neck cancer - biological robustness and latent vulnerability. Mol Oncol. 2013 Feb;7(1):14-28. doi: Review. PubMed PMID: 23168041.

〔学会発表〕(計8件)

1: 頭頸部癌集学的治療中に PRES を発症した症例 (第 115 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会) 若崎高裕ら 2014/5

2: 唾液腺多形腺腫由来筋上皮癌の二例 (第 38 回頭頸部癌学会) 若崎高裕ら 2014/6

3: 同時性甲状腺未分化癌/直腸癌症例の治療経過と問題点 (九州がんフォーラム) 若崎高裕ら 2014/11

4: 頭頸部進行がん治療における chemoradioselection 現状と展望 益田宗幸、麻生丈一郎、若崎高裕ら (第 53 回癌治療学会) 2015/9

5: 同時性頭頸部癌食道癌症例に対する治療アルゴリズム 九州がんセンター試案 益田宗幸、大森裕文、若崎高裕ら (第 116 回日本耳鼻咽喉科学会) 2015/5

6: アルゴリズムに基づいた chemoradio-selection による進行喉頭・下咽頭癌の治療戦略 (第 39 回頭頸部癌学会) 2015/6

7: S-1 投与により重篤な小腸炎が出現した 1 例 (第 39 回頭頸部癌学会) 2015/6

8: 当科にて加療を行った下顎骨区域切除術症例の検討 (第 39 回頭頸部癌学会) 2015/6

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

若崎 高裕 (Wakasaki Takahiro)

独立行政法人国立病院機構(九州がんセンタ
ー臨床研究センター) 頭頸科 医師

研究者番号:10608871