

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：32703

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870841

研究課題名(和文) EGFR阻害剤の副作用を低減する頭頸部扁平上皮癌併用療法の開発

研究課題名(英文) Development of combination therapy for head and neck squamous cell carcinoma to reduce the side effects of EGFR inhibitors

研究代表者

宮本 千央 (Miyamoto, Chihiro)

神奈川歯科大学・歯学研究科(研究院)・研究員

研究者番号：50633963

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々はこれまでに、血管攣縮治療薬ファスジルが生体の抗腫瘍タンパクBRAKの細胞外分泌促進を介し腫瘍増殖を抑制することから、抗腫瘍薬として応用できることを証明してきた。これはファスジルのBRAK細胞外分泌亢進作用により現在口腔癌で臨床適応されている分子標的薬セツキシマブの効果を増強することができる可能性を示す。そこで本研究ではEGFR阻害剤とファスジルの併用を検討した。その結果、セツキシマブにより合成促進されたBRAKがファスジルにより効率的に細胞外に分泌されることが確認された。この結果はセツキシマブの効果を増強する、若しくはセツキシマブの使用量を減らし副作用を減らすことができる可能性を示す。

研究成果の概要(英文)：We previously reported that fasudil can be used anti-tumor drug via targeted CXCL14/BRAK secretion. This finding indicate that fasudil shows the potential to enhance the effect of cetuximab via increase secretion of BRAK protein. In this study, we examined the combination of cetuximab and fasudil. As a result, BRAK protein generated by cetuximab is to be secreted effectively by fasudil. This result suggests that fasudil reinforces an effect of cetuximab or reduces consumption of cetuximab, and can reduce a side effect.

研究分野：歯科薬理学

キーワード：CXCL14/BRAK 頭頸部扁平上皮癌 ケモカイン 歯科薬理学

1. 研究開始当初の背景

近年の悪性腫瘍治療においては、多数の抗癌剤および分子標的治療薬が開発され、化学療法における治療薬の選択肢が広がっている。また、薬剤の従来の適応症になかった疾患に対する効果も積極的に検討されるようになってきている。

例として、大腸癌治療薬として用いられている上皮成長因子受容体 (EGFR) 阻害剤 (オシメチニブ) は治験により現在では頭頸部扁平上皮癌 (HNSCC) への効果も証明され、わが国では 2012 年 7 月から厚生労働省により頭頸部癌臨床適応の優先審査品目に指定され臨床適用までと一歩の段階まで解析が進んでいる。しかし一方で、EGFR 阻害薬は投与量依存的に間質性肺炎の発症リスクが増大する (Bonner *et al.* N Engl J Med., 2006) という問題を避けて通れないため、副作用の発生を抑えた投薬プロトコルの開発は急務である。

当研究室ではこれまでに、HNSCC において EGFR 阻害剤が抗腫瘍ケモカイン BRAK の合成促進を介し抗腫瘍効果を発揮することを報告してきた (Ozawa *et al.* Cancer Sci., 2009)。また、BRAK は細胞外に分泌されることで腫瘍の血管新生を抑制し、抗腫瘍効果を発揮することが確認されている (Izukuri *et al.* Transgenic Res., 2010)。

一方、申請者はこれまでに分泌性抗腫瘍ケモカイン CXCL14/BRAK (BRAK) の HNSCC における細胞外分泌抑制が悪性腫瘍の増殖に関与することを見出し (Maehata, Miyamoto, *et al.* Free Radical Res., 2010), BRAK の細胞外分泌促進を標的とした分子標的薬の可能性を模索してきた。さらに血管攣縮治療薬として臨床応用されているファスジル (商品名: エリル点滴静注液 30mg) により BRAK の細胞外分泌が亢進し、腫瘍発達が抑制されることを見出している (Miyamoto *et al.* J. of Pharmacological Sci. 2012 *in press*)。

これらの知見から、『セツキシマブにより産生亢進された BRAK がファスジルにより効率的に細胞外に分泌されることで、セツキシマブの抗腫瘍効果がより低用量でも得られるのではないか』という作業仮説の立案に至った。そこで、セツキシマブとファスジルの併用により、セツキシマブの適用用量を減らし、抗腫瘍作用を維持したまま副作用を低減した新規併用療法を開発する本研究課題を着想した。

2. 研究の目的

EGFR シグナル阻害薬セツキシマブによる BRAK 遺伝子発現回復と ROCK 選択的阻害剤ファスジルによる BRAK 分泌促進の相乗効果により、EGFR 阻害剤の適用量を減らし、抗腫瘍効果を維持したまま副作用を低減する新規多剤併用療法の開発を行うことを

目的とする。

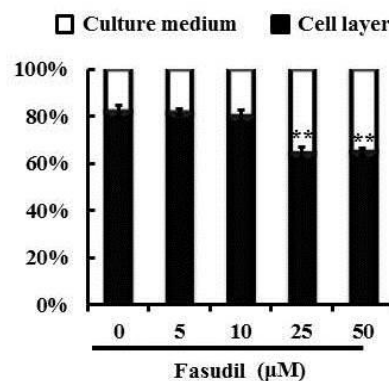
3. 研究の方法

- (1) HNSCC を播種し、ファスジル添加後 24 時間後の培養上清および細胞層を回収し、BRAK タンパク量をサンドイッチ ELISA 法を用いて解析した。また同条件で培養を行い、BRAK 遺伝子発現を RT-PCR 法および RealTime PCR にて解析した。
- (2) HNSCC を播種し、セツキシマブ添加後 48 時間後の BRAK 遺伝子発現を RealTime PCR にて解析した。また同条件で培養を行い、培養上清および細胞層を回収し、BRAK タンパクの合成量をサンドイッチ ELISA 法を用いて解析した。
- (3) HNSCC を播種し、セツキシマブ添加後 24 時間後にファスジルを添加し 24 時間の共添加培養を行ったのち培養上清および細胞層を回収し、BRAK タンパクの合成量をサンドイッチ ELISA 法を用いて解析した。その際の細胞数測定もを行い、細胞毒性の判定も行った。

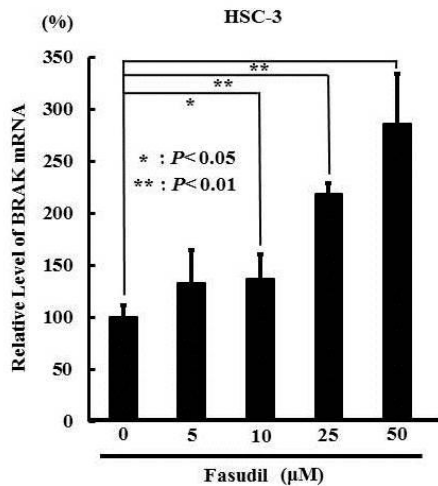
4. 研究成果

(1) HNSCC である HSC-3 を播種し、ファスジル添加後 24 時間後の培養上清および細胞層における BRAK タンパク量をそれぞれ解析した。その結果、培養上清と細胞体の両方において BRAK タンパク量が有意に増加していることが確認された。そこで培養上清と細胞層における BRAK 量の合計を 100% とし、それぞれに存在する BRAK タンパクの割合を算出した結果、ファスジル添加により BRAK の細胞外分泌量が亢進することが確認された【図 1】。

【図 1】細胞内外の BRAK タンパク比



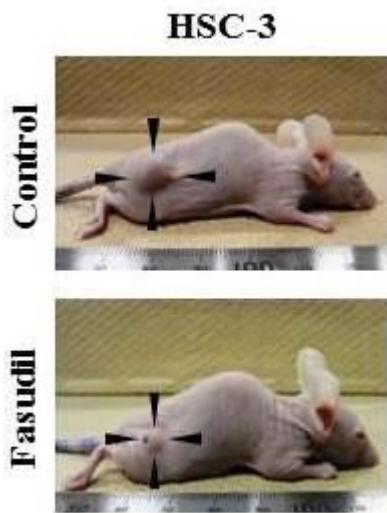
また、培養上清と細胞体の両方において BRAK タンパク量が増加したというのは BRAK の合成亢進を示唆する結果であるため、次に HSC-3 におけるファスジル添加後 24 時間後の遺伝子発現量を RealTime PCR 法を用いて解析した。その結果、ファスジルの添加濃度依存的に BRAK の遺伝子発現量が亢進していることが確認された。【図 2】



【図2】 ファスジル添加による BRAK 遺伝子発現の変化

その際ファスジルの主たる阻害経路である RhoA/ROCK シグナル伝達経路の抑制が BRAK の遺伝子発現に与える影響を RhoA および ROCK の siRNA 導入により解析した。その結果、複数の HNSCC 細胞株において RhoA/ROCK 経路の阻害により BRAK の遺伝子発現が亢進することが初めて明らかとなった。

これらの結果よりファスジル単剤でも BRAK 遺伝子発現が亢進し、BRAK の合成量が増加し分泌も促進するという結果が得られた。そこでヌードマウス背部皮下に HSC-3 を移植し、ファスジル投与群非投与群における腫瘍発達の解析をおこなった。その結果、ファスジル投与群において有意な腫瘍発達の抑制が確認された。【図3】



【図3】 ファスジル投与による腫瘍抑制

これらの結果は Biomedical Research, 35(6): 381-388, にて発表している。

(2) HNSCC である HSC-3 を播種し、セツキシマブ添加後 48 時間後の BRAK 遺伝子発現を Real Time PCR にて解析した。その結果セツ

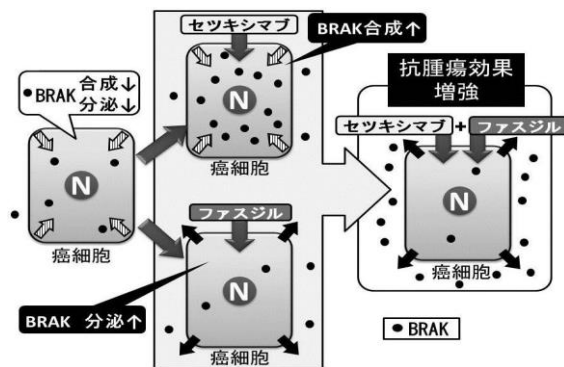
キシマブの添加濃度依存的に BRAK の遺伝子発現が亢進することが確認された

また同条件で培養を行い、培養上清および細胞層を回収し、BRAK タンパクの合成量をサンドイッチ ELISA 法を用いて解析した。その結果、培養上清と細胞体の両方において BRAK タンパク量が有意に増加していることが確認されたが、BRAK の細胞外分泌に関してセツキシマブ添加による影響は見られなかった。

(3) HNSCC である HSC-3 を播種し、セツキシマブ添加後 24 時間後にファスジルを添加し 24 時間の共添加培養を行ったのち培養上清および細胞層を回収し、BRAK タンパクの合成量をサンドイッチ ELISA 法を用いて解析した。その際の細胞外分泌された BRAK の割合も同時に解析した。その結果セツキシマブ存在下に置いては BRAK のタンパク量が増加し、ファスジルの存在下では BRAK タンパクの細胞外分泌量が亢進した。セツキシマブとファスジルの共添加において、それぞれの単剤投与群と比較し細胞外に分泌される BRAK 量が有意に増加していることが確認された。

その際の細胞数測定もを行い、細胞毒性の判定も行った。その際ファスジルとセツキシマブの共添加による HSC-3 細胞増加への影響は認められなかった。

これらの結果から、セツキシマブとファスジルの併用により BRAK の細胞外分泌量が大きく増加することが確認された。BRAK は細胞外分泌されることにより腫瘍周囲の血管新生を抑制する分泌タンパクである。つまりセツキシマブとファスジルの併用が、BRAK の合成・分泌促進を介し、より強力な腫瘍抑制効果のある新たな多剤併用療法として応用できる可能性が示された。【図4】



【図4】 セツキシマブとファスジル併用療法による抗腫瘍効果の模式図

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 7 件)

1. Hata R, Izukuri K, Kato Y, Sasaki S, Mukaida N, Maehata Y, Miyamoto C, Akasaka T, Yang X, Nagashima Y, Takeda K, Kiyono T, Taniguchi M. Suppressed rate of carcinogenesis and decreases in tumour volume and lung metastasis in CXCL14/BRAK transgenic mice. *Scientific Reports* 2015 Mar 13;5:9083.
2. Kobayashi K, Maehata Y, Okada Y, Kusubata M, Hattori S, Tanaka K, Miyamoto C, Yoshino F, Yoshida A, Tokutomi F, Wada-Takahashi S, Komatsu T, Otsuka T, Takahashi S-S, Lee M-C.: Medical-grade collagen peptide in injectables provides antioxidant protection. *Pharmaceutical Development and Technology*, 20(2) : 219-226, 2015.
3. Toyama T, Wada-Takahashi S, Takamichi M, Watanabe K, Yoshida A, Yoshino F, Miyamoto C, Maehata Y, Sugiyama S, Takahashi SS, Todoki K, Lee MC, Hamada N. Reactive oxygen species scavenging activity of Jixueteng evaluated by electron spin resonance (ESR) and photon emission. *Natural Product Communications* 2014 Dec;9(12):1755-9.
4. Yoshida A, Iwata S, Iizuka J, Takahashi S-S, Wada-Takahashi S, Miyamoto C, Maehata Y, Ogura Y, Lee M-C, Yoshino F: Blue light from dental resin curing unit causes light-induced vasoconstriction in isolated rat aorta. *Oral Health and Dental Management*, 13(4): 1147-1151, 2014.
5. Miyamoto C, Maehata Y, Motohashi K, Ozawa S, Ikoma T, Kouki H, Wada-Takahashi S, Takahashi S-S, Yoshino F, Yoshida A, Kubota E, Hata R-I, Lee M-C: Fasudil, a Rho kinase inhibitor, suppresses tumor growth by

inducing CXCL14/BRAK in head and neck squamous cell carcinoma. *Biomedical Research*, 35(6): 381-388, 2014.

6. Hidaka K, Miyamoto C. (equal to 1st author), Wada-Takahashi S, Saita M, Kawata A, Kawamata R, Maehata Y, Minabe M, Takahashi S-S, Mikuni-Takagaki Y: Humoral response to therapeutic low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) treatment of rat maxillary socket after the removal of a molar tooth. *International Journal of Analytical Bio-Science*, 3(1), 17-24, 2015.
7. Kato Y, Ozawa S., Miyamoto C., Maehata Y., Suzuki A., Maeda T, Baba Y.: Acidic extracellular microenvironment and cancer. *Cancer Cell International*. 3;13(1):89.

[学会発表] (計 19 件)

1. Maehata Y, Kobayashi k, Miyamoto C, Takahashi S-S, Yoshino F, Takahashi-wada S, Yoshida A, Masaichi C.-I. Lee, The novel collagen peptide reduced the photo-aging induced by UVA irradiation, FEBS EMBO 2014 Conference, Paris, France, 2014.8.30-9.4.
2. Hidaka K, Miyamoto C., Wada-Takahashi S, Kawamata R, Maehata Y, Minabe M, Takahashi S-S, Mikuni-Takagaki Y: Effect of Therapeutic Low-intensity Pulsed Ultrasound (LIPUS) after the Treatment of Rat Extraction Socket. FEBS EMBO 2014 Conference, Paris, France, 2014.8.30-9.4.
3. Miyamoto C, Ozawa T, Ikoma T, Wada-Takahashi S, Takahashi S-S, Yoshida A, Yoshino F, Hata R, Lee M-C, Maehata Y, ROCK specific inhibitor fasudil suppresses head and neck squamous carcinoma growth by stimulating gene expression and protein secretion of the CXCL14/BRAK, FEBS EMBO 2014 Conference, Paris, France, 2014.8.30-9.4.
4. Hidaka K, Miyamoto C, Kawamata R, Wada-Takahashi S, Takahashi S-S, Maehata Y, Saita M, Sato T, Taniguchi M, Kawata M, Ozaki Y, Funayama Y, Watabe H, Tani-Ishii N, Hamada N, Deguchi S, Mikuni-Takagaki Y : Low-intensity Pulsed Ultrasound Prevents Malhealing of Infected Rat Extraction Socket. 93rd General Session & Exhibition of the IADR/44th Annual Meeting of the AADR/39th Annual Meeting of the CADR, Boston, Massachusetts, USA, 2015.3.11-3.14.
5. 日高恒輝, 宮本千央, 高橋聡子, 齊田牧子,

- 川股亮太, 前畑洋次郎, 三辺正人, 高橋俊介, 高垣裕子: ラット抜歯窩に照射した低出力超音波パルス (LIPUS) が全身に及ぼす影響. 第 49 回神奈川歯科大学学会総会, 横須賀, 2014.11.29.
6. 本橋一彦, **宮本千央**, 前畑洋次郎, 吉田彩佳, 高橋聡子, 高橋俊介, 吉野文彦: Fasudil, a Rho kinase inhibitor, suppresses tumor growth by inducing CXCL14/BRAK in head and neck squamous cell carcinoma. 第 49 回神奈川歯科大学学会・総会, 横須賀市, 神奈川, 2014.11.29.
 7. 高道麻臣, 遠山歳三, 高橋聡子, 吉田彩佳, 吉野文彦, **宮本千央**, 前畑洋次郎, 渡辺清子, 杉山秀太, 塗々木和男, 李 昌一, 浜田信城, 高橋俊介: Reactive oxygen species scavenging activity of Jixueteng evaluated by electron spin resonance (ESR) and photon emission. 第 49 回 神奈川歯科大学学会・総会, 横須賀市, 神奈川, 2014.11.29.
 8. **宮本千央**, 前畑洋次郎, 高橋聡子, 吉野文彦, 吉田彩佳, 高橋俊介, 李 昌一: ROCK 阻害剤 Fasudil の頭頸部扁平上皮癌における CXCL14/BRAK を介した抗腫瘍効果の検討. 第 56 回 歯科基礎医学会学術大会・総会, 福岡市, 福岡, 2014.9.25-17.
 9. 吉田彩佳, 高橋俊介, 高橋聡子, 前畑洋次郎, **宮本千央**, 李 昌一, 吉野文彦: 歯科におけるブルーライトハザード-歯肉線維芽細胞へ及ぼす影響の検討. 第 14 回 日本抗加齢医学会総会, 吹田市, 大阪, 2014.6.6-8.
 10. 吉野文彦, 吉田彩佳, 高橋俊介, 高橋聡子, 前畑洋次郎, **宮本千央**, 李 昌一: ハムスターを用いた癌化学療法に併発する口内炎における活性酸素評価. 第 14 回 日本抗加齢医学会総会, 吹田市, 大阪, 2014.6.6-8.
 11. 日高恒輝, **宮本千央**, 高橋聡子, 齊田牧子, 川股亮太, 前畑洋次郎, 三辺正人, 高橋俊介, 高垣裕子: ラット抜歯窩治療に及ぼす低出力超音波パルス (LIPUS) の影響. 第 146 回神奈川歯科大学学会例会, 横須賀, 2015.1.8.
 12. **宮本千央**, 生駒丈晴, 近藤忠稚, 小澤重幸, 畑隆一郎, 久保田英朗, 前畑 洋次郎: 頭頸部扁平上皮癌における抗腫瘍ケモカイン CXCL14/BRAK の局在を標的とした新規多剤併用療法の研究開発. 第 146 回神奈川歯科大学学会例会, 横須賀, 2015.1.8.
 13. 日高恒輝, **宮本千央**, 高橋聡子, 齊田牧子, 川股亮太, 前畑洋次郎, 三辺正人, 高橋俊介, 高垣裕子: ラット抜歯窩に照射した低出力超音波パルスが全身的に及ぼす影響 Effect of Low-intensity Pulsed Ultrasound in Rats with Healing Socket. 第 18 回 超音波骨折治療研究会, 神戸, 2015.1.17.
 14. **Miyamoto C.**, Ozawa S., Takahashi S-S., W-Takahashi S., Yoshino F., Lee M-C., Hata R-I., Maehata Y.: Fasudil Suppresses Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Growth by Stimulating Gene Expression and Secretion of the Chemokine CXCL14/BRAK. Pharmacology 2013, London, GBR, 2013. 12.17-12.19
 15. Yoshida A., Yoshino F., Maehata Y., **Miyamoto C.**, Takahashi S.-S., Takahashi-Wada S., Lee M-C.: Effects of Blue Light to Mitochondria in Human Gingival Fibroblast. 2013 FDI Annual World Dental Congress, Istanbul, Turkey, 2013. 8. 27-8.31.
 16. **宮本千央**, 生駒丈晴, 小澤重幸, 高橋俊介, 高橋聡子, 吉野文彦, 吉田彩佳, 畑隆一郎, 李 昌一, 前畑洋次郎: 頭頸部扁平上皮癌における ROCK 阻害剤による CXCL14/BRAK を介した抗腫瘍効果の検討. 神奈川歯科大学学会 第 143 回例会, 横須賀, 2014.1.9.
 17. 吉野文彦, 吉田彩佳, 高橋俊介, 高橋聡子, 前畑洋次郎, **宮本千央**, 李 昌一: 化学療法において併発する口内炎における活性酸素評価. 神奈川歯科大学学会 第 48 回総会, 横須賀, 2013.11.30.
 18. 高橋俊介, 杉山秀太, 高橋聡子, 吉野文彦, 前畑洋次郎, **宮本千央**, 吉田彩佳, 李 昌一, 松尾雅斗, 遠山歳三, 佐藤武則, 渡辺清子, 浜田信城: 2 型糖尿病による歯肉循環調整機能 (血管弾性) の変化. 神奈川歯科大学学会 第 48 回総会, 横須賀, 2013.11.30.
 19. 吉田彩佳, 吉野文彦, 前畑洋次郎, **宮本千央**, 高橋聡子, 高橋俊介, 李 昌一: 歯科治療に用いられる青色光照射が血管平滑筋へおよぼす影響. 第 13 回 AOB 研究会, 台東区, 2013.7.12.
- [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

宮本 千央 (MIYAMOTO, Chihiro)

神奈川歯科大学 歯学研究科 (研究院)

研究員

研究者番号 : 50633963

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :