

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：32409

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861413

研究課題名(和文) 頭頸部癌細胞に対するCetuximabの効果予測因子と浸潤メカニズムの解明

研究課題名(英文) Analysis of prognostic factor and inhibition of invasion on cetuximab for head and neck cancer

研究代表者

小柏 靖直 (Kogashiwa, Yasunao)

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号：60633956

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：EGFRのligandとして作用することが知られているAREG、EGFRのmRNA、蛋白発現が頭頸部癌細胞株において認められることを明らかにした。癌細胞がAREG、EGFRを高発現している細胞株においてはcetuximabによる細胞増殖抑制効果が増強される傾向が示された。また、患者検体を用いてAREG及びEGFRの発現がcetuximabを含む抗がん剤治療の効果と関連していることを少数例で確認した。

頭頸部扁平上皮癌細胞株に対してcetuximabを作用させると、増殖阻害効果をもたない濃度においても遊走あるいは浸潤が抑制されることを明らかにし、さらにその分子機構が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：We revealed that cetuximab reduce migration and invasiveness of the head and neck cancer cells in the low concentration which doesn't inhibit cell growth and the mechanisms. We also revealed that mRNA and protein of AREG and EGFR are expressed in head and neck cancer cell lines. AREG/EGFR are known to one of the EGFR ligands. The high expression of AREG/EGFR induce that cetuximab have more 20 to 30% reduction in head and neck cancer cells than low expression of AREG/EGFR, but not significant. Additionally, specimen which was biopsied by head and neck cancer patients were analyzed and we could get a data that high expression of AREG or EGFR were correlated to the prognosis of the patients after cetuximab containing regimen were registered.

研究分野：頭頸部癌

キーワード：浸潤 遊走 効果予測因子

1. 研究開始当初の背景

頭頸部癌における抗癌剤のレジメとして、従来はシスプラチン+5-FU(PF)が中心であったが、近年 PF にドセタキセルを加えた 3 剤併用(TPF)の導入化学療法+同時併用放射線化学療法により予後の改善効果が明らかとなり、臨床において多用されるようになった。PF にドセタキセル 1 剤を加えることによって予後が改善した原因の一つとして、我々はドセタキセルが細胞運動を低下させた結果として転移を低下させたという仮説を立て、in vitro において検証したところ、低濃度のドセタキセルが複数の頭頸部癌細胞の運動性を低下させる事実を突き止め、さらにそのメカニズムの一端を解明した(Kogashiwa et al, 2010. Cancer Science)。TPF 療法により予後が改善した一方、より heavy なレジメとなるにつれて、温存された臓器の機能が低下あるいは廃絶するリスクが増大することが大きな問題となっており、既存の抗癌剤と作用機序の異なる分子標的薬の使用により、生命予後を低下させずに合併症を軽減することに大きな期待が寄せられている。

頭頸部癌においては EGFR の阻害剤である Cetuximab が放射線との併用(Bonner et al, New England Journal of Medicine, 2006)、あるいは上述の PF 療法との併用(Vermorken et al, New England Journal of Medicine, 2008)によって予後を延長することが報告され、現在 EGFR 阻害剤に関する臨床試験が世界中で行われている。Cetuximab を併用したレジメは臓器機能温存に優れている可能性、患者の Quality of survival を改善する可能性が指摘されている。このように非常に有望な薬剤ではあるが、解決しておくべき非常に重要な問題が 2 点ある。

1 つ目は、他の様々な分子標的薬と違って現状では頭頸部癌においては responder の候補を投与前に知ることができないことである。単剤での奏効率が 13%と非常に低いことから、responder を治療開始前に知ることができればより有効な薬剤として使用できるようになる可能性がある。2 つ目は、単剤での奏効率が低いにも関わらず放射線や他の化学療法と併用することで高い臨床効果が得られる理由が不明確な点である。理由の一つに Cetuximab のもつ転移や局所浸潤の抑制効果があると考えており、この点について検証する必要がある。

頭頸部癌の最大の予後規定因子は頸部転移であることが広く知られており(Pillsbury HC 3rd et al, Laryngoscope, 1997)、遠隔転移の抑制を得るような治療、レジメの確立が今後の重要な課題と考えられる。EGFR からの細胞内 signal には 4 つの経路があるが、細胞運動に関してはこれまでのところあまり詳しく調べられていない。我々は EGFR のチロシンキナーゼ阻害剤である AG1478 を用いて、細胞増殖を阻害しない低濃度の同剤を頭頸部癌細胞株に作用させた場合に細胞運動がどのように変化するかを調べる予備実験を行ったところ、複数の頭頸部癌細胞株において細胞運動が低下する事実を見出し第

71 回日本癌学会学術総会(2012.9 札幌)にて報告した。

癌が遠隔転移するためには、一次病巣から癌細胞が離れ、間質に局所浸潤することが必要であることから、細胞運動の抑制は遠隔転移の抑制につながる可能性があるものと考えられる。そこで本研究では、低濃度の EGFR 阻害における細胞運動障害のメカニズムの解明を目的として、その際の pathway の解明に焦点をあてて研究を行う。

Cetuximab の抗腫瘍効果が発揮されるメカニズムとしては細胞内の増殖 signal を止めることと抗体依存性細胞障害活性(ADCC 活性)の 2 通りが知られている。抗腫瘍効果に影響を与えるこれらの因子を検討することにより、患者に薬剤を投与する前の段階で薬剤の効果が発揮されるかどうかを予測可能となることが期待できる。

2. 研究の目的

本研究では Cetuximab の効果予測を可能とする因子を同定する。また、我々は低濃度の EGFR 阻害剤が頭頸部癌細胞の migration を抑制することを突き止めており、このメカニズムを詳細に検討して解明することにより、Cetuximab の臨床効果の裏付けが得られる。本研究は、Cetuximab 投与前に responder を知ることができるようになること、Cetuximab を併用した際に発揮される臨床効果の仕組みを探るという 2 点を明らかにするための研究である。

3. 研究の方法

Cetuximab の遊走能、浸潤能の抑制効果に関する実験

頭頸部癌細胞株に EGFR 阻害剤、及び EGFR チロシンキナーゼ阻害剤を投与し、濃度依存的に成長を抑制するかどうかを調べて細胞成長曲線を作成した。

細胞運動能を評価するために、Wound healing assay, Boyden chamber assay を行った。次に、western blot 法を用いて細胞内シグナル pathway について明らかにすることとした。

Luciferase assay を用いて in vivo における転移抑制効果の検討を行った。

Cetuximab の効果予測に関する実験

頭頸部癌細胞株の Amphiregulin, Epiregulin の発現を real time-RT PCR 法にて調べた。また、cetuximab との効果の相関についても調べた。実際の患者検体について、同様の結果が得られるかどうかについて検証した。

ADCC 活性に影響を与える因子の一つとして FCGR の遺伝子多型に着目し、患者検体を用いて FCGR3A 及び FCGR2A の SNP と実臨床における cetuximab の効果について調べた。

4. 研究成果

Cetuximab の遊走能、浸潤能の抑制効果に関する実験

頭頸部扁平上皮癌細胞株に対して cetuximab を作用させ、増殖阻害効果をもたない濃度において wound healing assay, Boyden chamber assay を行い cetuximab が遊走あるいは浸潤抑制作用を持つことが示された。次に、xenograft model を用いて in vivo においても vitro と同様に cetuximab の投与によってリンパ節転移が抑制されることが示された。さらにその分子機構として、cetuximab による EGFR-GEP100-Arf6-AMAP1 pathway の抑制、EMT の抑制が関与していることが明らかになった。

Cetuximab の効果予測に関する実験

EGFR の発現が少ない細胞株においては cetuximab は増殖抑制効果を示さず、逆に EGFR が高発現している細胞株においては cetuximab は濃度依存的な増殖抑制効果を示す傾向が認められた。次に、EGFR の ligand として作用することが知られている Amphiregulin, Eprexulin の mRNA、蛋白発現が頭頸部癌細胞株において認められることを real time-RT PCR 法と western blot 法を用いて明らかにした。癌細胞が AREG, EREG を自己分泌して高発現している細胞株においては低発現の細胞株と比較して cetuximab による細胞増殖抑制効果が有意ではないものの 20~30% 程度増強される傾向があることが示された。

この結果を受けて、頭頸部癌患者の初診時の生検で採取された FFPE 標本から AREG, EREG の mRNA を抽出して real time-RT PCR を行って治療後の予後との相関を検討したところ、AREG, EREG の高発現群では有意に治療後の予後が延長していることが示された。AREG, EREG は cetuximab だけではなく cisplatin の効果と相関する可能性が基礎実験で報告されており、cetuximab を単剤ではなく白金製剤やタキサン系薬剤などと combination で使用する頭頸部癌においては極めて有用な効果予測因子となる可能性が示唆される結果となった。

ADCC の効果を左右する因子として FCGR 遺伝子の SNP について調べたところ、FCGR3A 及び FCGR2A の SNP は cetuximab の効果には相関しない可能性を示唆する結果となった。しかし、サンプルサイズが少ないため、症例数を増やして検討する必要があると考えられる。

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. Kogashiwa Y, Yasuda M, Sakurai H, Nakahira M, Sano Y, Gonda K, Ikeda T, Inoue H, Kuba K, Oba S, Ishikawa J, Enoki Y, Matsumura S, Minami K, Ebihara Y, Sugawara M. PD-L1 Expression Confers Better Prognosis in Locally Advanced Oral Squamous Cell Carcinoma. Anticancer Res. 2017 Mar;37(3):1417-1424. DOI: 10.21873/anticancerres.11465 (査読あり)

2. Matsumoto Y, Sakurai H, Kogashiwa Y, Kimura T, Matsumoto Y, Shionome T, Asano M, Saito K, Kohno N. Inhibition of epithelial-mesenchymal transition by cetuximab via the EGFR-GEP100-Arf6-AMAP1 pathway in head and neck cancer. Head Neck. 2017 Mar;39(3):476-485. DOI: 10.1002/hed.24626 (査読あり)

(学会発表) (計 4 件)

1. 小柏靖直 ほか. 頭頸部扁平上皮癌に対する Cetuximab の効果予測因子に関する検討. 第 27 回頭頸部外科学会総会ならびに学術講演会, 2017.2.2-2017.2.3, 京王プラザホテル(東京都・新宿区)
2. 井上準, 小柏靖直, 菅澤正. 頭頸部扁平上皮癌における AREG, EREG を用いた cetuximab の効果予測に関する検討. 第 41 回頭頸部癌学会, 2017.6.8-2017.6.9, ウェスティン都ホテル京都(京都府・東山区)
3. Matsumoto Y, Sakurai H, Kogashiwa Y, Saito K. Cetuximab inhibits migration, invasion, metastasis and epithelial mesenchymal transition but not proliferation via GEP100-Arf6-AMAP1 pathway in head and neck squamous cell carcinoma. American Association for Cancer Research 2016, New Orleans (アメリカ合衆国)
4. 松本吉史, 小柏靖直, 甲能直幸. セツキシマブは増殖抑制効果に耐性を持つ頭頸部癌細胞株の遊走および浸潤を阻害する. 第 27 回 口腔咽頭科学会. 2014.9.11-2014.9.12, ホテルライフオート札幌(北海道・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:
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

小柏 靖直 (KOGASHIWA, Yasunao)

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号: 60633956

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

松本 吉史 (Matsumoto, Yoshifumi)