

令和 2 年 5 月 21 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07203

研究課題名(和文) 頭頸部癌におけるセツキシマブ治療の耐性機序の解明

研究課題名(英文) Investigation for a mechanism of cetuximab resistance in head and neck cancers

研究代表者

米阪 仁雄 (YONESAKA, Kimio)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：30330260

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：これまでに頭頸部癌における抗EGFR抗体治療薬セツキシマブの耐性機序は十分解明されていなかった。本研究で明らかになったのはHER3リガンドであるヘレグリンの過剰発現とそれに伴うHER3シグナルの活性化が同剤への耐性をもたらす事である。特にsiRNAによるヘレグリンの選択的発現阻害は、同剤への耐性頭頸部癌細胞株FaDuCRのHER3活性を抑え、感受性を有意に改善した。さらにpanHER阻害剤であるアファチニブによるHER3活性阻害によっても、セツキシマブ耐性が克服された。そして頭頸部癌の腫瘍組織28検体中2検体でヘレグリンの過剰発現を認め、セツキシマブ治療へ耐性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

EGFR阻害剤は頭頸部癌のみならず非小細胞肺癌、大腸癌などで有効性が確立されている。そしてEGFR遺伝子の2次変異やHER2遺伝子増幅などが同剤の耐性化をもたらす。しかし頭頸部癌では未だセツキシマブの耐性機序が不明であったため、今回HER3リガンドであるヘレグリン依存的な耐性が明らかとなったことは学術的な意義がある。またHER3の阻害剤がセツキシマブ耐性頭頸部癌において有益である可能性が示唆された。この点は今後の進行期頭頸部癌の予後の改善につながる上で重要と考える。

研究成果の概要(英文)：The anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) antibody cetuximab is standard therapy for head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC), whereas the underlying mechanisms for resistance to it has been unknown. The current study reveals that HER3 ligand heregulin causes the resistance to cetuximab in HNSCC. Heregulin knockdown with siRNA recovered the sensitivity to cetuximab in the cetuximab-resistant HNSCC FaDuCR cells. Furthermore pan-HER inhibitor afatinib could decrease HER3 activation and overcome the resistance to cetuximab in FaDuCR xenografted mouse model study. Finally, two among 28 tumors of HNSCC aberrantly expressed heregulin and those were resistant to cetuximab-based therapy.

研究分野：臨床腫瘍学

キーワード：薬効評価と予測 HER3 ヘレグリン アファチニブ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

#### < 頭頸部癌治療の問題点について >

抗 EGFR 抗体治療薬セツキシマブは、細胞表面に存在する EGFR に結合し、その活性化を阻害する[1]。同治療薬は、頭頸部癌の臨床試験において生存期間の延長をもたらすことが確認された。本邦においても 2012 年 12 月にセツキシマブが頭頸部癌治療薬として承認された。しかし同治療薬の頭頸部癌における問題点として、同薬と抗癌剤 (CDDP+5-FU) の併用治療の奏効率は 36% であり、大半の症例で効果に乏しい (1 次耐性) [2]。また奏効例においても同薬を繰り返し投与することで、やがて無効となる (2 次耐性)。頭頸部癌症例により良い治療を提供するため、これらの耐性機序の同定と耐性克服治療の開発が必要とされている。

#### < 研究者によるこれまでの研究 HER2 遺伝子増幅によるセツキシマブ耐性 >

これまでの申請者らの研究によって、大腸癌・非小細胞肺癌におけるセツキシマブの耐性が HER2 遺伝子の増幅によってもたらされることが明らかとなった[3]。すなわちこれらの癌細胞株にセツキシマブを長期間暴露し、耐性株を樹立した。そして CGH アレイ法によって遺伝子コピー数を網羅的に調べたところ、耐性株で HER2 遺伝子の増幅を認めた。さらに実際にセツキシマブ治療を施行された大腸癌症例の治療前・後の腫瘍組織を用いて FISH 法により HER2 遺伝子数の評価を行ったところ、セツキシマブ治療への耐性獲得後に HER2 遺伝子の増幅が起こることが確認された (図 1.)。またこの HER2 遺伝子増幅は血中循環腫瘍 DNA (ctDNA) を用いた digital PCR 法によっても確認できた[4]。

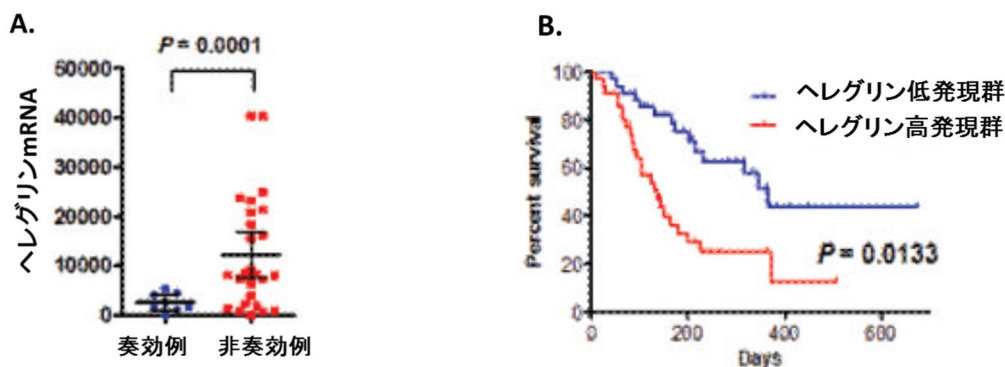
図 1. 大腸癌におけるセツキシマブ治療前後の腫瘍における FISH 法による HER2 遺伝子評価

	治療前の原発巣	セツキシマブ耐性獲得後のリンパ節
HER2 遺伝子増幅細胞の割合 (HER2/CEP17>2.0)	14%	71%

#### < 研究者によるこれまでの研究 HER3 リガンド・ヘレグリン過剰発現によるセツキシマブ耐性 >

さらに他のセツキシマブ耐性細胞株を用いて、マイクロアレイ法による遺伝子発現の評価等も行った。その結果 HER3 リガンドであるヘレグリン遺伝子の過剰発現も、セツキシマブ治療への耐性をもたらすことが明らかとなった[3]。さらに大腸癌症例におけるセツキシマブ治療の非奏効例では、奏効例に比べ腫瘍組織中のヘレグリンの発現レベルが有意に高かった (n=65) (図 2.)。同様に腫瘍組織中のヘレグリン高発現症例では低発現症例に比べ、セツキシマブ治療の無増悪生存期間が有意に短かった。そして前臨床試験において、ヘレグリンによるセツキシマブ等への耐性化は、抗 HER3 抗体薬の併用によって克服できた[5,6]。

図 2. 大腸癌のセツキシマブ治療症例における腫瘍でのヘレグリン発現と奏効 (A)、および無増悪生存期間 (B) の関係



#### < 残された問題点とその解決策について >

頭頸部癌におけるセツキシマブ治療の耐性機序は、大腸癌と同様に HER2 遺伝子増幅やヘレグリンの過剰発現に依存しているか不明である。申請者らは、頭頸部癌のセツキシマブ耐性細胞株を用いて耐性機序を解明したい。また申請者らは血液中のヘレグリンを測定する独自の手法を有し (特許出願中[6, 7])、頭頸部癌症例の血中ヘレグリン値とセツキシマブ治療の耐性の関係を評価したい。

## 2. 研究の目的

抗 EGFR 抗体治療薬セツキシマブは、頭頸部癌に対する標準治療薬である。しかし一部の症例で同治療薬が無効である(薬剤耐性)。我々は同薬剤の大腸癌における耐性機序として、HER2 遺伝子の増幅と HER3 リガンドであるヘレグリン遺伝子の発現亢進を発見した(Yonesaka K, et al. Science Transl Med 2011)。しかし頭頸部癌においてセツキシマブの耐性機序は、未だ解明されていない。今回の研究では頭頸部癌の細胞株を用いてセツキシマブ治療の耐性機序を探索し、さらにセツキシマブ治療を施行された頭頸部癌症例の腫瘍サンプル、血液検体を用いて遺伝子変異、遺伝子発現異常を評価し、同治療薬の耐性機序を明らかにする。

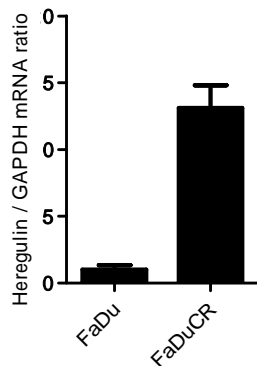
## 3. 研究の方法

- 頭頸部癌の細胞株を用いた免疫学的手法、マイクロアレイ法、CGH アレイ法等によるセツキシマブの耐性遺伝子の探索と遺伝子導入試験による確認。
- 頭頸部癌でセツキシマブ治療を施行され奏効した後に耐性を獲得した症例を対象に腫瘍組織(治療前及び後)及び血液検体を収集する(n=10)。
- 採取された腫瘍組織を用いて HER2 などの遺伝子コピー数解析、遺伝子変異解析、ヘレグリン mRNA の発現測定等を行う
- 採取された血液を用いて血中ヘレグリン蛋白の測定、血中循環腫瘍 DNA を用いた HER2 遺伝子増幅等を調べる。

## 4. 研究成果

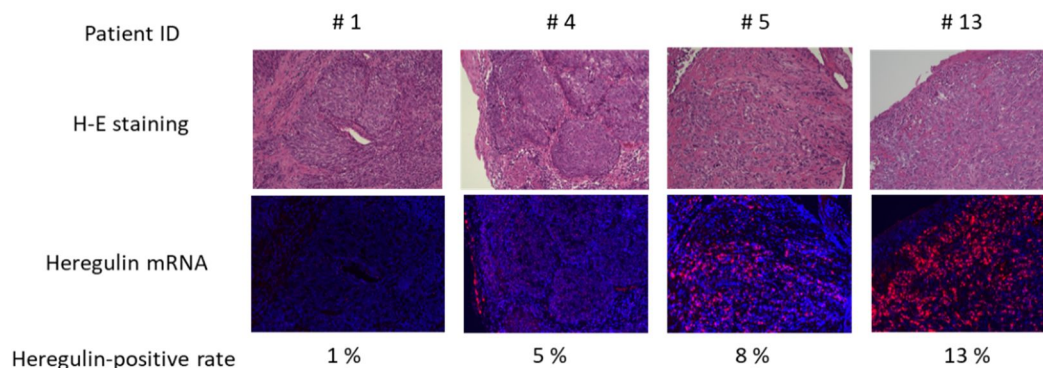
本研究の目的は、頭頸部癌の治療薬である抗 EGFR 抗体セツキシマブの耐性機序を明らかにし、同腫瘍の治療の改善につなげる事である。研究全体を通じて解明できた点として、HER3 リガンドであるヘレグリンの過剰発現とそれによる HER3 シグナルの活性化がセツキシマブ耐性をもたらすことである。すなわち本研究の実施計画の通り頭頸部癌のセツキシマブ耐性細胞株 FaDuCR の網羅的なゲノム解析及び全トランスクリプトーム解析、定量的 PCR 法を行いヘレグリンの過剰発現を認めた(図3)。

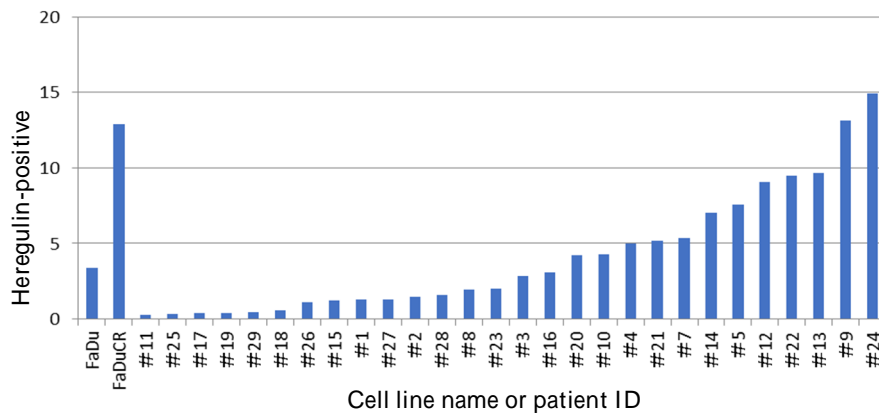
**図3. 頭頸部癌細胞株 FaDu、FaDuCR におけるヘレグリン mRNA の発現発現**



そして siRNA によるヘレグリンの選択的発現阻害は、同剤への耐性化の解除をもたらした。さらに計画されていたように頭頸部癌症例の腫瘍組織を用いてヘレグリン mRNA 発現を in situ ハイブリダイズ法で定量した。28 腫瘍中、2 腫瘍でヘレグリンの発現が耐性株 FaDuCR と同程度に亢進しており、かつこれらの症例はセツキシマブ治療に対し耐性であった(図4)。

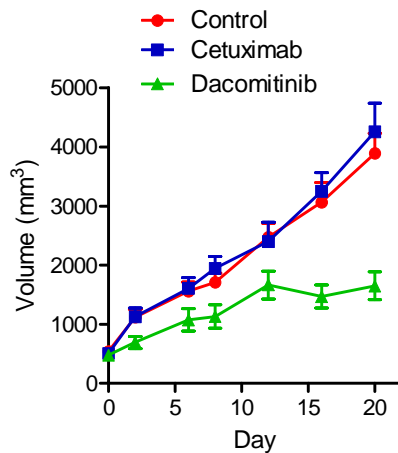
**図4. 頭頸部癌腫瘍組織におけるヘレグリン mRNA の ISH 及びその定量**





本研究で明らかにされた 2 点目は、panHER 阻害剤であるアファチニブによってセツキシマブ耐性を克服できることである。すなわち前述のセツキシマブ耐性細胞株 FaDuCR のマウス移植モデルにおいて腫瘍の増大はセツキシマブ治療では阻害できなかった。一方でアファチニブ、ダコミチニブ治療は腫瘍の増大を有意に阻害した (図 5)。

**図 5. セツキシマブ耐性頭頸部癌細胞株 FaDuCR を用いたマウス試験**



最終年度にはこれらの結果を学術集会で報告し、また論文発表した (Yonesaka K et al. Oncogenesis. 2019;8(10):54)。

本研究によって今後の頭頸部癌における新たな治療戦略が考えられる。すなわち抗 EGFR 抗体治療に耐性となり、かつヘレグリンを過剰発現している頭頸部癌に対しアファチニブなど HER3 を阻害する薬剤が有効である可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yonesaka Kimio, Tanaka Kaoru, Kitano Mutsukazu, Kawakami Hisato, Hayashi Hidetoshi, Takeda Masayuki, Sakai Kazuko, Nishio Kazuto, Doi Katsumi, Nakagawa Kazuhiko	4. 巻 8
2. 論文標題 Aberrant HER3 ligand heregulin-expressing head and neck squamous cell carcinoma is resistant to anti-EGFR antibody cetuximab, but not second-generation EGFR-TKI	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncogenesis	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41389-019-0164-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 米阪仁雄
2. 発表標題 Anti-EGFR antibody-resistant head and neck squamous cell carcinoma maintained sensitivity to pan-HER inhibitor
3. 学会等名 第17回日本臨床腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 米阪仁雄
2. 発表標題 Anti-EGFR antibody-resistant head and neck squamous cell carcinoma maintained sensitivity to pan-HER inhibitor
3. 学会等名 第23回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	坂井 和子  (SAKAI Kazuko)  (20580559)	近畿大学・医学部・講師    (34419)	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	土井 勝美 (DOI Katsumi) (40243224)	近畿大学・医学部・教授  (34419)	
研究分担者	北野 睦三 (KITANO Mutsukazu) (60716330)	近畿大学・医学部・講師  (34419)	
研究分担者	田中 薫 (TANAKA Kaoru) (80548628)	近畿大学・医学部・講師  (34419)	