

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 30 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22390314

研究課題名（和文）ゲノム解析およびプロテオーム解析による頭頸部癌診断・治療の新展開

研究課題名（英文）New application in treatment of head and neck cancer using genome and proteome analysis

研究代表者

福田 諭 (FUKUDA SATOSHI)

北海道大学・北海道大学病院・教授

研究者番号：20125347

研究成果の概要（和文）：

今回は当施設の頭頸部癌サンプルを実際に使用しての、ゲノム、プロテオーム解析だけではなく、microRNA の解析も多検体を用いて行うことができた。唾液腺癌も頭頸部癌の一つでありこれらの免疫組織学的検討も行うことができた。（昨年頭頸部外科学会最優秀論文賞受賞）これらは海外の頭頸部癌関連学会で発表している。さらには現在話題の分子標的薬に対する耐性機構のトランスクリプトーム解析とそれに付随する microRNA の解析についても論文としてすでに Publish されている。

得られた膨大な量のデータにはまだ分子情報が未知のものが多く、これからもこのデータから臨床応用すべく実証実験を重ねていきたい。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we could get the genome, proteome and microRNAs profile using the head and neck cancer samples from our institute. Furthermore, salivary gland samples could be added to this study and the molecular which showed difference depending on prognosis were confirmed their expression with the immunohistochemical methods. A lot of data were presented on meetings of American head and neck society, Asian society of head and neck, and other international meetings.

We got the tremendous volume of data of head and neck cancer, so we need to continue the data-mining and the examination of protein-protein reaction to apply clinically.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	7,300,000	2,190,000	9,490,000
2011 年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2012 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
年度			
年度			
総計	13,800,000	4,140,000	17,940,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：頭頸部癌、トランスクリプトーム、EGFR、NF-κB

## 1. 研究開始当初の背景

頭頸部癌は毎年世界で 50 万人以上が罹患し、全癌中 6 番目に多い疾患である。この頭頸部

癌の治療においては、再建術の進歩や強力な放射線化学同時併用療法により治療成績の改善が期待されてきたが、いまだに大きな改

善の余地が残されていると言わざるを得ない。個々の頭頸部癌は本質的に異なる特性（腫瘍悪性度・放射線/抗癌剤感受性など）を有しているが、これらの増殖・制御の基本的メカニズムや実地臨床に真に直結する評価法は未だにないのが現状であり、基礎的研究に裏打ちされた臨床的break through が強く求められている。

## 2. 研究の目的

本研究では主としてゲノム・プロテオーム技術を用い、頭頸部癌組織から抽出したタンパク質を網羅的・定量的に解析し、頭頸部癌の発生・転移・予後・抗癌剤耐性・治療感受性等に関連するタンパク質群を同定していきたい。

本研究で得られる知見によって、頭頸部癌発生に関与する分子機構の解明と、その個性に関わるタンパク質の同定により頭頸部癌に関する極めて有用な基礎的情報を提供するとともに、個々人に最も適した治療法の選択や新しい治療標的分子の同定などを通して、さらなる治療成績の向上が期待される。

## 3. 研究の方法

(1) 頭頸部正常扁平上皮および癌組織からのタンパク質抽出

生検、手術で得られた検体を凍結保存し、-20度の状態で凍結切片を作製する。これをヘマトキシリン・エオジン染色後、病理医により光学顕微鏡下にその組織型を確認する。

さらに連続切片をヘマトキシリン染色のみを行い Lasermicrodissection 法を用いて当該組織のみを採取し、タンパク質を抽出する。

(2) 2次元電気泳動及び発現解析

抽出したタンパク質に蛍光標識を行い、2次元電気泳動にて展開する。

専用のスキャナーを用いて、画像を取り込み、その発現を専用のソフトウェアを用いて定量化する。

定量化されたデータをバイオインフォマティクスアプローチにより解析する。

従来の多変量解析のほか、階層的クラスタ分析、機械学習法、自己組織化写像法を用いて検体の組織特異性、臨床的背景に応じて変

化するタンパク質スポット群を層別化する。

(3) 質量分析ならびにユビキチンプロテアソーム解析

臨床背景に即した変化をしめすタンパク質スポットをゲル上から分離し、トリプシン処理後、四重極法による質量分析を行い、当該タンパク質を同定する。また Cell Proliferation Assay でユビキチンリガーゼ TRIM32 の細胞増殖への影響をみる

(Cancer Res, 2008 研究業績 No. 24)

(4) ウェスタンブロットティング、免疫染色によるタンパク質発現の確認

質量分析で同定したタンパク質群の実際の発現をウェスタンブロットティング法、ELISA法、免疫染色法により確認する。

(5) 当該タンパク質に関する細胞生物学的解析

野生型もしくはドミナントネガティブ型 (RING ドメインを欠失した) を過剰発現させる、もしくは RNAi によってノックダウンさせた細胞株を作製し、癌化、増殖に対する検討を試みる。つまり、細胞を使ったこのアッセイ系により、注目されるタンパク質分子が、細胞増殖の活性化に働いているのか、抑制性に働いているのかを検討する。使用方法としては、フォーカスアッセイ、コロニー形成アッセイ、等を行う。

(6) 当該タンパク質の発現プロファイルの検索 (癌組織発現プロファイル検索を含む) 作製した抗体を使用し、その他の臓器での免疫組織化学的解析を行い、いかなる臓器のいかなる細胞で発現されているかをタンパク質レベルで確認する。この情報は、次の遺伝子改変マウス作製の際、いかなる表現系の変化が認められるかの指標になる可能性が高い。また、他臓器での当該タンパク質の発現強度を網羅的に調べ、癌の悪性度との相関を検索する。

## 4. 研究成果

ポストゲノム時代を迎え、この数年の分子生物学技術の発展には目覚ましいものがある。技術の進歩は単なる DNA のシーケンズの解

読から、転写される mRNA、翻訳されて生まれるタンパク質の大規模解析を可能とし、更には分子の修飾、干渉機構の網羅的解析やバイオインフォマティクスの発展も相まって進化を続けている。我々はこれらの最新の技術を用いた解析を行なってきた。木を見て森を見ない」従来のウェットな実験では成しえなかった、分子標的治療に対する耐性化機構の解明やテーラーメイド医療に向けた新たなマーカーや分子標的の同定を行なってきた。今回の研究では多症例における食道扁平上皮癌プロテオーム解析と、トランスクリプトーム解析及び SNP 解析を用いた頭頸部扁平上皮癌細胞株などの我々のデータを中心に供覧する。ゲノム・プロテオーム解析の膨大なデータを基として、EGFR パスウェイを始めとする扁平上皮癌増殖シグナル伝達機構をバイオインフォマティクスアプローチによって分析した。階層的クラスター解析から癌細胞と正常扁平上皮のタンパク成分が大きく異なることを解明し更にはリンパ節転移、予後に関する腫瘍マーカーを同定した。パスウェイ解析では EGFR 阻害薬の耐性機構が上皮間葉転換に関連すること、それによって個々の扁平上皮癌の増殖シグナル伝達に変化することが示された。すでに扁平上皮癌治療においても分子標的治療が標準ともなってきた。臨床医にとっては Cancer biology の理解が必須なものとなってきた。診断技術や手術手技の研鑽だけでなく、基礎医学への造詣を深め、いわゆる translational research への今後の一つの方向性を示したい前回の研究ではプロテオーム中心のものであったが、今回は microRNA による遺伝子発現制御やトランスクリプトーム解析といった、遺伝子からタンパク質までの、転写、翻訳の過程についても幾つかの知見を得ることができた。

今回得られた画期的発見の一つに頭頸部癌における EGFR リガンドの役割が挙げられ、研究の結果の要旨を以下に記す。セツキシマブは既に欧米では頭頸部癌治療における分子標的薬として標準的な薬剤として認知され、本邦においても頭頸部癌における臨床治療が始まっている。しかし、他の抗腫瘍薬と同様に長期投与において耐性化するこ

も明らかとなってきた。これまで肺癌を始めとする他癌においては、ターゲットとなる上皮成長因子受容体 (EGFR) やその下流にある k-ras の変異、Met 等の他のシグナル伝達の亢進等の耐性化の機構が示されている。しかし頭頸部癌においては、これらの遺伝子変異は稀であることもわかってきた。今回我々は EGFR のリガンドの発現とセツキシマブ感受性への影響と、さらにこれらのリガンドをターゲットとする microRNA 発現を検討した。方法はセツキシマブ高感受性頭頸部癌細胞株 SCC1 とその耐性クローンである 1Cc8 を用いて、各リガンドの発現とセツキシマブ耐性への影響を比較した。microRNA の発現は Taqman Array (Applied Biosystem) を用いている。

実験の結果、HB-EGF, Amphiregulin, TGF- $\beta$  がセツキシマブの感受性に影響を与え、さらに耐性株では親株に比べ HB-EGF, TGF- $\beta$  の発現が亢進していることが確認された。なかでも HB-EGF は少量でもセツキシマブの耐性化を起こし、その下流のパスウェイの活性化を起こすことが確認された。HB-EGF ノックダウン株は高いセツキシマブ感受性を示し、患者血清中、癌組織中の HB-EGF 濃度は初診時より再発時で高かった。miRNA212 は耐性株で低値を示し、HB-EGF の発現を制御していた。これらのことからセツキシマブの耐性化にはリガンドが強く関与しており、またこのリガンド発現の制御に microRNA が関与していた。リガンドの発現はセツキシマブ感受性のマーカーとして有用と考えられ、さらには microRNA を分子標的とした治療は、頭頸部癌治療における新たなブレイクスルーとなることが期待される。

これら研究の成果を今後の臨床にフィードバックし、今後の頭頸部癌治療への速やかな臨床応用へと繋げて行きたい。

##### 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 33 件)

1. Taki S, Homma A, Suzuki F, Oridate N, Hatakeyama H, Mizumachi T, Kano S, Furusawa J, Sakashita T,

- Inamura N, Yoshida D, Onimaru R, Shirato H, Fukuda S: Combined modality therapy for laryngeal cancer with superselective intra-arterial cisplatin infusion and concomitant radiotherapy. *Int J Clin Oncol* 17: 441-446, 2012, 査読有
2. Homma A: Superselective arterial cisplatin infusion with concomitant radiation therapy for advanced nasal cavity and paranasal sinus carcinoma. *Recent Adv Res Updat* 12: 197-211, 2011, 査読有
  3. Homma A, Inamura N, Oridate N, Suzuki S, Hatakeyama H, Mizumachi T, Kano S, Sakashita T, Onimaru R, Yasuda K, Shirato H, Fukuda S: Concomitant weekly Cisplatin and radiotherapy for head and neck cancer. *Jpn J Clin Oncol* 41: 980-986, 2011, 査読有
  4. Kano S, Homma A, Oridate N, Suzuki F, Hatakeyama H, Mizumachi T, Furusawa J, Sakashita T, Yoshida D, Onimaru R, Shirato H, Fukuda S: Superselective arterial cisplatin infusion with concomitant radiation therapy for base of tongue cancer. *Oral Oncol* 47: 665-670, 2011, 査読有
  5. Furusawa J, Zhang H, Vural E, Stone A, Fukuda S, Oridate N, Fang H, Ye Y, Suen JY, Fan CY: Distinct epigenetic profiling in head and neck squamous cell carcinoma stem cells. *Otolaryngol Head Neck Surg* 144: 900-909, 2011, 査読有
  6. Homma A, Sakashita T, Oridate N, Suzuki F, Suzuki S, Hatakeyama H, Mizumachi T, Taki S, Fukuda S: Importance of comorbidity in hypopharyngeal cancer. *Head Neck* 32: 148-153, 2010, 査読有
- [学会発表] (計 41 件)
1. Homma A, Fukuda S, et al: <Symposium> head and neck cancer 「 Superselective intra-arterial chemotherapy with concurrent radiotherapy for sinonasal malignant tumors」. The 14th Japan-Korea Joint Meeting of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery. Kyoto Hotel Okura, Kyoto, Japan, 2012.4.12-14
  2. Homma A, Oridate N, Sakashita T, Yoshida D, Onimaru R, Tsuchiya K, Yasuda K, Suzuki S, Hatakeyama H, Mizumachi T, Kano S, Shirato H, Fukuda S: < Symposium1 > Nasopharyngeal cancer and nasal cavity and paranasal sinus—Superselective Intra-arterial Infusion of Cisplatin and Concomitant Radiotehrapy for Paranasal Sinus Cancers. The 11th Japan-Taiwan Conference on Otolaryngology-Head and Neck Surgery. ANA CROWNE PLAZA KOBE, Kobe, Japan, 2011.12.8-9
  3. Homma A, Suzuki F, Hatakeyama H, Sakashita T, Oridate N, Yoshida D, Onimaru R, Tsuchiya K, Yasuda K, Shirato H, Fukuda S: Rapid superselective high-dose cisplatin infusion with concomitant radiotherapy for squamous cell carcinoma of the nasal vestibule : a report of two cases. The 2nd Asian Society of Head & Neck Oncology Meeting. Grand Hyatt, Goa, India, 2011.10.6-9
  4. Homma A, Sakashita T, Oridate N, Mizumachi T, Kano S, Furusawa J, Inamura N, Taki S, Fukuda S: < Symposium 9 > Up to date therapy for sinonasal malignant tumors— Superselective intra-arterial

chemotherapy with concurrent radiotherapy for sinonasal malignant tumors. 14th International Rhinologic Society, 30th International Symposium Infection and Allergy of the Nose. ANA Intercontinental hotel Tokyo, Tokyo, Japan, 2011.9.20-23

5. Homma A, Oridate N, Suzuki F, Sakashita T, Furusawa J, Taki S, Inamura N, Mizumachi T, Kano S, Yoshida D, Onimaru R, Fukuda S: The efficacy of superselective intra-arterial infusion for unresectable carcinoma of the paranasal sinuses. The American Head and Neck Society 2010 Research Workshop. Hyatt Regency Crystal City, Arlington, VA, USA. , 2010.10.28-30
6. Fukuda S: < Symposium > Recent Progress in Chemoradiotherapy in Head and Neck Cancer. 4th World Congress of International Federation of Head and Neck Oncologic Societies (IFHNOS). Lotte Hotel Seoul , Seoul, Korea, 2010.6.15-19
7. 福田 諭: < 宿題報告 2 > 頭頸部癌治療における分子生物学的アプローチ. 第111 回日本耳鼻咽喉科学会. 仙台国際センター (仙台) , 2010. 5. 20-22

[図書] (計 4 件)

1. 本間明宏: 第 6 章 頭頸部癌治療の最前線「超選択的動注療法」. ENT 臨床フロンティア「がんを見逃さないー頭頸部癌診療の最前線」, 岸本誠司(編), pp. 180-186. 中山書店, 東京, 2013
2. 福田 諭: 感覚器障害の原因と治療ー聴覚障害、頭頸部がん-. 北大病院の医療健康セミナー, pp. 28-33. 北海道新聞社, 札幌, 2012
3. 福田 諭: 声を聞くー舌がんと喉頭がん手術後の声のコミュニケーションー.

感覚器 (視覚と聴覚) と社会とのつながりー見るよろこび・聞くよろこびー, pp. 112-121. (財)日本学術協力財団, 東京, 2011

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

福田 諭 (FUKUDA SATOSHI)  
北海道大学・北海道大学病院・教授  
研究者番号 : 20125347

### (2) 研究分担者

本間 明宏 (HOMMA AKIHIRO)  
北海道大学・北海道大学病院・講師  
研究者番号 : 30312359

畠山 鎮次 (HATAKEYAMA SHIGETUGU)  
北海道大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号 : 70294973

### (3) 連携研究者

なし