

平成 30 年 8 月 28 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05039

研究課題名(和文)新規頭頸部癌分子標的治療薬セツキシマブに対する耐性機構の解明と克服治療薬の開発

研究課題名(英文)Elucidation of the resistant mechanism and the development of drugs for overcoming resistance against Cetuximab in head and neck cancer.

研究代表者

小河原 克訓 (OGAWARA, Katsunori)

千葉大学・大学院医学研究院・特任研究員

研究者番号：20372360

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：セツキシマブは上皮成長因子受容体(EGFR)を阻害することで腫瘍増殖・転移を抑制するが、実際の臨床において、その治療効果が明確ではない、または無効と考えられる症例にしばしば遭遇する。本研究では、セツキシマブの耐性機構を解明し、耐性克服薬剤を同定することを目的とした。我々が独自に樹立した3種のセツキシマブ耐性細胞株の遺伝子解析により、PLAURをセツキシマブ耐性の標的遺伝子として同定した。PLAURの発現亢進に続くインテグリン 1シグナル伝達経路を介したセツキシマブの耐性獲得機構が示唆された。さらに、PLAURに対する阻害剤Resveratrolを同定し耐性克服薬剤としての効果を認めた。

研究成果の概要(英文)：Cetuximab is a recombinant human/mouse chimeric monoclonal antibody which competitively binds to epidermal growth factor receptor (EGFR) resulting in inhibition of cell growth, angiogenesis and invasion. Despite initial drug activity, some patients often have resistance against Cetuximab. The aim of this study is to discover the resistant mechanism and to detect a new drug, which overcomes the resistance. Microarray assay and real time PCR using 3 pairs of sensitive and resistant cells, which have been established by us, revealed that PLAUR gene may be a candidate resistant gene. Transformation by PLAUR shRNA makes the resistant ability weaker. Via integrin 1 signal transduction pathway, overexpression of PLAUR gene upregulates cell growth resulting in acquire the resistance against Cetuximab. Resveratrol was detected as inhibitor of PLAUR gene and it was confirmed in vitro and in vivo that Resveratrol weakens the resistance against Cetuximab.

研究分野：医歯薬学

キーワード：セツキシマブ 頭頸部癌 耐性 PLAUR Resveratrol

1. 研究開始当初の背景

セツキシマブが日本で唯一の頭頸部癌に対する分子標的治療薬として保険承認された。セツキシマブはヒト由来の抗体とマウス由来の抗体を組み合わせ、上皮成長因子受容体 (EGFR) に対して結合するようにした IgG1 に属するヒト・マウスキメラ化モノクローナル抗体であり、細胞表面に存在する EGFR のリガンド結合部位に EGF と競合的に結合し、EGFR の活性化、二量体化を阻害する。また細胞表面にある EGFR を細胞内へ内在化させる。これらの結果、EGFR からのシグナル伝達が遮断され、腫瘍増殖・転移に關与する多くの細胞機能(細胞増殖、細胞生存、細胞運動、腫瘍内血管新生及び細胞浸潤など)を抑制する。このような作用機序を持つセツキシマブではあるが、実際の臨床において、その治療効果が明確ではない、あるいは無効と考えられる症例にしばしば遭遇する。このため、セツキシマブに対する薬剤耐性の問題を克服することが、今後重要な課題になると考えられる。

2. 研究の目的

独自に樹立したセツキシマブに対する 3 組の感受性細胞株と耐性細胞株を用いて以下の項目を明らかにする。

(1) 遺伝子発現状態を網羅的に解析し、3 組の感受性細胞株と耐性細胞株に共通な耐性/感受性関連候補遺伝子を明らかにする。

(2) パスウェイ解析による遺伝子機能解析、臨床サンプルを用いた後ろ向き試験による遺伝子機能解析、発現ベクターや shRNA 導入を用いた遺伝子発現制御実験による遺伝子機能解析により、セツキシマブ感受性/耐性遺伝子を明らかにする。

(3) 以上の結果から、耐性メカニズムを詳細に明らかにし、耐性を克服する方法や薬剤を検索・同定する。

3. 研究の方法

【先行研究】

先行研究により既に、セツキシマブに対する薬剤耐性細胞株を独自に 3 種類樹立している(感受性細胞株 3 種類を親株として、それぞれに耐性株を独力で樹立した)。

(1) 遺伝子パスウェイをもとに、耐性細胞株中において感受性細胞株中よりも発現増強している遺伝子を耐性候補遺伝子として検索同定する。

感受性細胞株と耐性細胞株の各組み合わせ(親株と誘導株)における遺伝子発現状態を micro array により網羅的に解析し、口腔癌由来細胞株 3 種(SAS,Sa3,HSC-3)の組み合わせに共通な耐性候補遺伝子として検索同定する。これらの遺伝子群が、使用した細胞株で実際に発現増強/減弱していることを real time PCR 法で確認する。

(2) 絞り込んだ遺伝子に関して、shRNA を導入し安定した形質転換細胞株を作成する。

micro array による網羅的解析により絞り込んだ耐性候補遺伝子に関して、shRNA を導入し安定した形質転換細胞を作成し、発現減弱を real time PCR 法および Westernblot 法にて確認する。

(3) in vitro の培養細胞において、各形質転換細胞のセツキシマブに対する薬剤耐性がどのように変化しているかを MTS assay により評価する。

各形質転換細胞において、セツキシマブに対する薬剤耐性の変化を MTS assay を行い評価する。

(4) in vivo において耐性遺伝子制御により、ヌードマウス移植腫瘍におけるセツキシマブの薬剤耐性の変化を確認する。

各形質転換細胞をヌードマウスに投与し、セツキシマブに対する薬剤耐性の変化を確認する。

(5) 同定した耐性遺伝子の耐性メカニズムを明らかにし、PLAUR 発現制御薬剤(阻害剤や賦活薬)を遺伝子パスウェイ解析ソフト(IPA)や文献を用いて検索同定する。

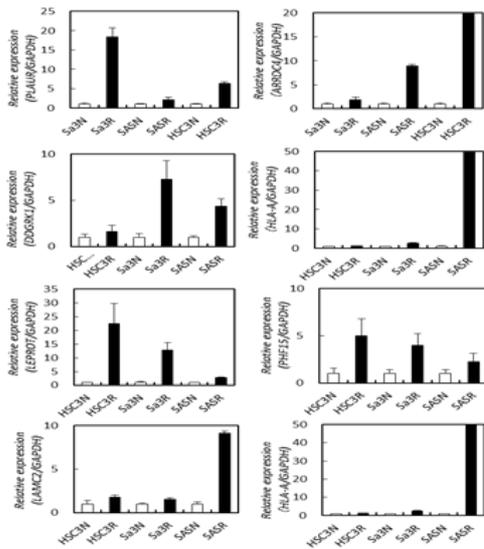
(6) in vivo において耐性遺伝子制御候補薬剤投与により、ヌードマウス移植腫瘍に対してセツキシマブの耐性変化を確認する。

耐性遺伝子制御候補薬剤を担癌マウスに投与し、ヌードマウス移植腫瘍に対するセツキシマブの耐性変化を確認する。

4. 研究成果

(1) 遺伝子パスウェイをもとに、耐性細胞株中において感受性細胞株中よりも発現増強している遺伝子を耐性候補遺伝子として検索同定する。

セツキシマブ感受性細胞株 (SAS, Sa3, HSC3) とセツキシマブ耐性細胞株 (SAS-R, Sa3-R, HSC3-R) の遺伝子発現状況を、micro array により網羅的に解析した。3 種の細胞株で共通して発現亢進を認めた遺伝子について実際の発現状態を RT-qPCR 法で確認したところ、8 種の遺伝子の発現亢進を認め、耐性候補遺伝子として同定した。(図 1)

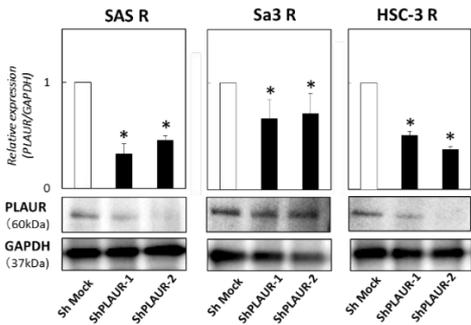


(図 1：発現亢進を認めた耐性候補遺伝子、RT-qPCR)

(2) 絞り込んだ遺伝子に関して、shRNA を導入し安定した形質転換細胞株を作成する。

耐性候補遺伝子として同定した遺伝子群より文献検索および遺伝子ネットワーク解析を用いて、PLAUR を選出した。セツキシマブ耐性細胞株

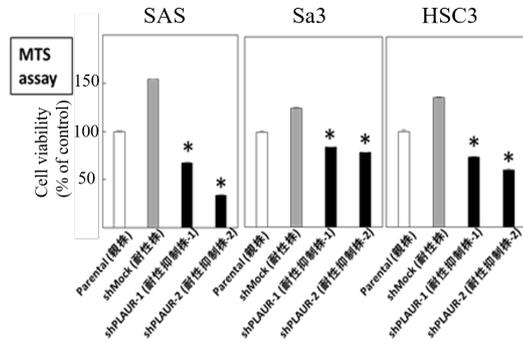
(SAS-R, Sa3-R, HSC3-R) において PLAUR の発現抑制形質転換細胞 (shPLAUR) を樹立し、RT-qPCR 法および Western blot 法においてその発現を確認したところ、mRNA、タンパク共に発現減弱を認めた。(図 2)



(図 2：各形質転換細胞株における PLAUR 発現状況の確認 RT-qPCR, WB)

(3) in vitro の培養細胞において、各形質転換細胞株のセツキシマブに対する薬剤耐性がどのように変化しているかを MTS assay により評価する。

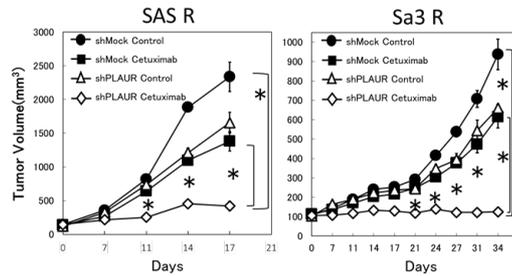
shPLAUR 導入細胞株において、セツキシマブ耐性細胞株と比較して MTS assay にて有意な cell viability の低下を認め、セツキシマブに対する感受性亢進を認めた。(図 3)



(図 3：shPLAUR 導入細胞株におけるセツキシマブ感受性の変化, MTS assay)

(4) 各形質転換細胞をヌードマウスに投与し、セツキシマブに対する薬剤耐性の変化を確認する。

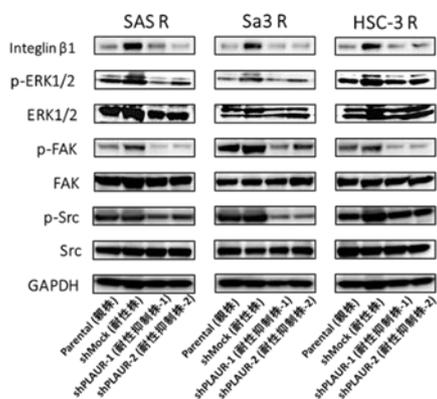
2 種類の口腔癌セツキシマブ耐性株 (SAS-R, Sa3-R) をヌードマウスに接種し、腫瘍体積を測定したところ、shPLAUR 導入細胞株群においてはセツキシマブの感受性亢進を認め、コントロールと比較して有意な腫瘍の増殖抑制効果を認めた。



(図 4：shPLAUR によるセツキシマブ耐性克服の検証, in vivo)

(5) 同定した耐性遺伝子の耐性メカニズムを明らかにし、PLAUR 発現制御薬剤 (阻害剤や賦活薬) を遺伝子パスウェイ解析ソフト (IPA) や文献を用いて検索同定する。

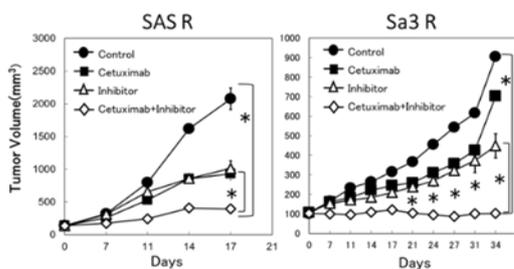
IPA および文献検索より、セツキシマブ耐性の pathway を構築した。また、PLAUR の阻害薬である Resveratrol を同定した。耐性株では PLAUR の発現亢進による Integrinβ1 を介した Src/FAK/ERK 経路が想定され、Western blot にて integrinβ1 の発現亢進ならびに、SRC/FAK/ERK のリン酸化の亢進を確認した。また shPLAUR 導入細胞においては integrinβ1 の発現減弱並びに、SRC/FAK/ERK のリン酸化抑制を認めた。(図 5)



(図 5:PLAUR を起点としたセツキシマブ耐性機構の解明, WB)

(6) in vivo において耐性遺伝子制御候補薬剤投与により、ヌードマウス移植腫瘍に対してセツキシマブの耐性変化を確認する。

2 種類の口腔癌セツキシマブ耐性株 (SAS-R,Sa3-R) をヌードマウスに接種し、腫瘍体積を測定したところ、Resveratrol を使用した群においてはセツキシマブの感受性亢進を認め、コントロールと比較して有意な腫瘍の増殖抑制効果を確認した。(図 6)



(図 6 : Resveratrol によるセツキシマブ耐性克服の検証, in vivo)

(7)まとめ

セツキシマブ耐性獲得機構には、PLAUR を起点とした腫瘍の進展カスケードが想定され、また PLAUR を阻害する Resveratrol は耐性克服薬剤として期待される。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

小河原 克則

(OGAWARA, KATSUNORI)

千葉大学・大学院医学研究院・特任研究員

研究者番号 : 20372360

(2)研究分担者

丹沢 秀樹 (TANZAWA, HIDEKI)
千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号 : 50236775

中嶋 大 (NAKASHIMA, DAI)
千葉大学・医学部附属病院・助教
研究者番号 : 50436775