

平成 30 年 6 月 28 日現在

機関番号：32703

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11277

研究課題名(和文) エピジェネティクスの概念から判断するセツキシマブ投与前の新たな評価基準

研究課題名(英文) Expression of the chemokine CXCL14 and cetuximab-dependent tumour suppression in head and neck squamous cell carcinoma.

研究代表者

近藤 忠稚 (KONDO, Tadanori)

神奈川歯科大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：00587727

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：この研究結果をもとに本研究は、前述した遺伝子変異以外のセツキシマブ抵抗性に関する要因として、メチル化異常が原因になると仮定し、メチル化異常とセツキシマブ抵抗性の関係を証明することを目的とした。本研究は、セツキシマブ投与患者のバイオプシーサンプルを用いて検討することも予定していたが、思いのほか、セツキシマブ投与患者のバイオプシーサンプルが手に入らなかったため、細胞株を用いて群を増やし、セツキシマブ抵抗性とメチル化の関連性を証明した。メチル化異常が存在する細胞では、HSC-3以外の他の細胞株においてもセツキシマブ抵抗性を示した。

研究成果の概要(英文)：The present study aimed to prove the relationship between aberrant methylation and cetuximab resistance based on the hypothesis that aberrant methylation is a factor involved as a cause of cetuximab resistance in addition to the aforementioned genetic mutations. For this study, we originally planned to conduct investigations using biopsy samples of patients administered cetuximab, but unexpectedly, we were unable to obtain any of the said biopsy samples. Instead we proved the relationship between cetuximab resistance and methylation by increasing the group using cell lines. Cells with aberrant methylation exhibited cetuximab resistance in HSC-3 as well as other cell lines.

研究分野：口腔外科

キーワード：CXCL14 異常メチル化 頭頸部扁平上皮癌 セツキシマブ

1. 研究開始当初の背景

2012年3月19日に上皮成長因子受容体(EGFR)阻害剤である分子標的治療薬セツキシマブが頭頸部癌に適応拡大された。セツキシマブは、EGFRからのシグナルを特異的に阻害することで抗腫瘍効果を得る分子標的治療薬あり、従来の抗癌剤とは異なる。セツキシマブの開発の歴史は古く、1980年初頭より研究は行われており、日本では2008年7月18日にEGFR陽性の治療切除不能の進行・再発の結腸、直腸癌の治療薬として使用されるようになった。現在、セツキシマブは頭頸部癌に対し、放射線治療や従来の抗癌剤と併用することで、患者の生存期間の延長に成功を収めている。近年、セツキシマブの抗腫瘍効果に影響する因子の検索が盛んに行われており、最も有力なものはEGFRの下流分子であるKRAS、BRAFそしてPIK3CAの遺伝子変異の有無が挙げられる。その理由は、これらの遺伝子はある特定の部位が変異することで、EGFRからのシグナル伝達が無くとも活性化し、下流分子へシグナルを流し続けるためである。事実、セツキシマブの添付文書には大腸癌に対して、KRASの遺伝子変異の有無を考慮するように記載されている。一方、我々が取り扱う頭頸部扁平上皮癌では、前述した遺伝子変異が無いにもかかわらず、単剤では効果を示しにくいため、従来の抗癌剤や放射線治療との併用が推奨されている。この遺伝子変異が無いにもかかわらず、セツキシマブが抗腫瘍効果を示さない矛盾を解くカギとして、メチル異常に本研究は着目した。メチル化はエピジェネティクスの一つであり、遺伝子変異を伴わずとも遺伝子発現を抑制する機構である。メチル化自体は悪いものではないが、それが異常化し、蓄積することで、癌の発生や進展に関与することが明らかとなっている。

2. 研究の目的

我々は、マウスへの移植実験を用いてEGFR阻害剤がメチル化異常を生じている頭頸部扁平上皮癌細胞に対し無効であることを見出している。さらにはメチル化異常を生じている癌に対しては、脱メチル化剤であるアザシチジンを併用することで(商標名:ピダーザ注射用)セツキシマブの効果が回復する結果を得た。我々がターゲットとするCXCL14は、NK細胞をはじめとした免疫細胞の活性化や血管新生抑制作用を有する抗腫瘍性ケモカインであるが、頭頸部扁平上皮癌のみならず肺がん、大腸癌など、多くの悪性腫瘍でメチル化異常により遺伝子発現が消失する分子として報告されている。本研究の目的は、遺伝子変異のみならずCXCL14のような抗腫瘍性たんぱく質のプロモーター領域のメチル化異常がセツキシマブの抗腫瘍効果を左右することを証明し、セツキシマブ投与前の効果予測マーカーと

してジェネティクス異常のみならず、エピジェネティクス異常についても注目することの重要性を確立することであった。

3. 研究の方法

我々は、CXCL14の発現が確認できる頭頸部扁平上皮癌細胞(8株)、確認できない頭頸部扁平上皮癌細胞(10株)を所有しており、代表的な細胞を3株ずつ選択しCXCL14のプロモーター領域のメチル化の有無を検討した。検討に使用した方法は、それぞれの細胞にメチル化阻害剤であるアザシチジンを添加し、CXCL14の遺伝子発現が回復するかどうかでメチル化によるはげん消失が生じているかどうか検討した。また、プロモーター領域のメチル化については、メチル化特異的PCR法及びパイロシーケンスで行った。

4. 研究成果

CXCL14の発現が確認される癌細胞群ではセツキシマブ添加においてHSC-3同様にCXCL14の遺伝子発現上昇が確認された。一方、CXCL14の発現が確認できない癌細胞群においては3群においてはセツキシマブ添加においてCXCL14の発現は検出されなかった。脱メチル化剤添加において、CXCL14の遺伝子発現が確認される癌細胞群では遺伝子発現に変化は認められないものの、発現が確認されない癌細胞群では遺伝子発現が回復する結果を得た。この結果から、この遺伝子発現の回復は、脱メチル化剤添加によるストレスによる遺伝子発現の上昇ではなく、プロモーター領域のメチル化解除によるものであることが証明された。また、プロモーター領域のメチル化の有無については、発現確認される癌細胞群すべてプロモーターはメチル化検出ができなかったが、発現消失している癌細胞群すべてメチル化していることが確認された。本研究結果から、CXCL14の発現消失の原因はプロモーター領域のメチル化が関与していることの普遍性が確認され、今後、セツキシマブの抗腫瘍効果の投与前マーカーとして、CXCL14の発現有無の確認、もしくはCXCL14のプロモーターのメチル化確認が有効であると考えられた。

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 3件)

Hata R, Yang X, Miyamoto C, Maehata YJ, Ozawa S. Production and characterization of cancer resistant mouse: Toward development of molecular preventive medicine of

cancer. Seikagaku. 査読有り 2015
Oct;87(5):591-6. Review.

Kondo T, Ozawa S, Ikoma T, Yang XY,
Kanamori K, Suzuki K, Iwabuchi H,
Maehata Y, Miyamoto C, Taguchi T,
Kiyono T, Kubota E, Hata RI.
Expression of the chemokine CXCL14
and cetuximab-dependent tumour
suppression in head and neck squamous
cell carcinoma. Oncogenesis. 査読有
り 2016 Jul 11;5(7):e240. doi:
10.1038/oncsis.2016.43.

Maeda T, Suzuki A, Koga K, Miyamoto
C, Maehata Y, Ozawa S, Hata RI,
Nagashima Y, Nabeshima K, Miyazaki K,
Kato Y. TRPM5 mediates acidic
extracellular pH signaling and TRPM5
inhibition reduces spontaneous
metastasis in mouse B16-BL6 melanoma
cells. Oncotarget. 査読有り 2017 Sep
11;8(45):78312-78326. doi:
10.18632/oncotarget.20826.
eCollection 2017 Oct 3.

[学会発表](計 4件)

生駒丈晴, 陽 暁艶, 小澤重幸, 鈴木健
司, 岩淵博史, 前畑洋次郎, 畑隆一郎:
Expression of the chemokine CXCL14 is
a predictive biomarker for
Cetuximab-dependent tumour
suppression. 第 57 回歯科基礎医学会
学術大会, 新潟市, 2015.

Hata R, Kondo T, Ozawa S, Ikoma T,
Suzuki K, Iwabuchi H, Maehata Y,
Miyamoto C, Yang X, Kubota E:
EXPRESSION OF THE CHEMOKINE CXCL14 IS
A PREDICTIVE BIOMARKER FOR
CETUXIMAB-DEPENDENT TUMOUR
SUPPRESSION: 1st Nature Immunology -
Cellular & Molecular Immunology
Joint Conference: Inflammation,

Stress and Immune Homeostasis, China,
2015.

Yang X, Ozawa S, Ikoma T, Suzuki K,
Kanamori K, Kiyono T, Kubota E, Hata
R. Expression of the chemokine CXCL14
is predictive biomarker for
cetuximab-dependent tumour
suppression. 第 75 回日本癌学会学術
総会 2016.

Kanamori K, Ozawa S, Ikoma T, Suzuki
K, Iwabuchi H, Kobayashi M.
Hypermethylation disturbed
cetuximab-dependent tumour
suppression in head and neck squamous
cell carcinoma. 第 62 回(公社)日本口
腔外科学会総会

[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

近藤 忠稚 (KONDO Tadanori)
神奈川歯科大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号: 00587727

(2) 研究分担者

小澤 重幸 (OZAWA Shigeyuki)
神奈川歯科大学・大学院歯学研究科・講師
研究者番号：40434394

(2)研究分担者

宮本 千央 (MIYAMOTO Chihiro)
神奈川歯科大学・大学院歯学研究科・特別
研究員
研究者番号：50633963

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()