

令和 2 年 5 月 30 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11732

研究課題名(和文) 口腔扁平上皮癌における分子標的薬耐性メカニズムと対策

研究課題名(英文) Mechanisms of resistance to molecularly targeted drugs for oral squamous cell carcinoma and investigation of countermeasures

研究代表者

山崎 浩史 (YAMAZAKI, Hiroshi)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：00338708

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)：口腔扁平上皮癌(OSCC)における変異型上皮成長因子受容体(EGFRv)の発現を検討した。手術療法を施行したOSCC症例96例を対象とした。手術によって得られた組織の一部をサンプルとした。RT-PCR、サンガーシーケンス、デジタルPCR、次世代シーケンスを行い検討した。OSCCにおけるEGFRvの検出は不安定であった。しかし、少なくとも3例(3/96 3%)で確実に発現していると考えられた。また、セツキシマブ耐性OSCC細胞株、EGFRv導入OSCC細胞株を用いて検討したが、EGFRvのタンパク質レベルでの発現やシグナル経路の変化を確認することはできなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

上皮成長因子受容体(EGFR)の抗体であるセツキシマブ(Cmab)は、局所進行あるいは再発転移口腔癌(OSCC)の標準治療に用いられている。そのため、Cmabに関するバイオマーカーの確立は重要であるが、現在のところ真に有用なバイオマーカーは存在せず、これを発見することはきわめて重要である。Cmabは野生型に対する抗体であり、変異型であるEGFRvへの結合性は低いため、EGFRvを指標としたネガティブセレクションの可能性が示唆されている。

研究成果の概要(英文)：The expression of mutant epidermal growth factor receptor (EGFRvIII) was investigated in 96 patients with oral squamous cell carcinoma (OSCC) who underwent surgery. Biopsied tissue samples underwent reverse transcription polymerase chain reaction (PCR), Sanger sequencing, and digital PCR testing, as well as next-generation sequencing. The detection of EGFRvIII was not consistent among the cases, but at least 3 (3%) were considered definitely positive. In order to elucidate the functions of EGFRvIII, we used an OSCC cell line, prepared and evaluated cetuximab-resistant and EGFRvIII-transfected OSCC cell lines. We detected no changes in the protein expression of EGFRvIII, or the signal transduction pathway, in either line.

研究分野：医歯薬学

キーワード：外科系歯学 臨床腫瘍学 口腔癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

上皮成長因子受容体 (Epidermal Growth Factor Receptor: EGFR) は、HER-1 としても知られる膜貫通性糖タンパクである。この EGFR は頭頸部扁平上皮癌 (HNSCC) の 90% 以上で発現しており重要な標的の 1 つである。前癌病変から浸潤癌に移行するに伴って EGFR の発現が上昇することも報告されている。EGFR の過剰発現は、腫瘍サイズの増大、病期の進行、再発のリスク増加、放射線低感受性、予後不良にも関与している。以上の理由から、EGFR は HNSCC 治療のターゲットとなっている。セツキシマブ (cetuximab: Cmax) はこの EGFR に結合することにより細胞増殖を阻害し細胞死を誘導する抗 EGFR キメラ抗体である。大規模臨床試験の結果において Cmax は局所進行 HNSCC における局所制御と生存の上乗せ効果、再発転移 HNSCC における生存の上乗せ効果が示されている。すでに EGFR TKI や mTOR などの他の分子を標的にした薬剤も開発されているが、現在においても Cmax は key drug の一つである。

EGFR を発現しているにもかかわらず、Cmax に対する responder と non-responder が存在することが知られている。抗 EGFR 抗体は EGFR が高発現している症例にのみ用いられるのが前提であるが、HNSCC では EGFR が 90% 以上も発現しており、したがって EGFR は有用な効果予測因子とはいえない。大腸癌では Kras の遺伝子変異を有している患者は、野生型の患者と比べて、Cmax などの EGFR 阻害剤の治療の上乗せ効果はないことが示されている。大腸癌では、この遺伝子変異の頻度がおよそ 40% 程度と報告されており、治療前にその変異を検索することが推奨されている。しかし、頭頸部癌における K-ras 遺伝子変異は 5% 未満と報告されており、K-ras の遺伝子変異を治療前に測定する意義はないと認識されている。

したがって、現在のところ真に有用な効果予測因子・薬剤耐性マーカーは存在せず、これを発見することはきわめて重要であると考えられる。われわれは手術標本を用いたヒト癌細胞初代培養システムによる薬剤感受性試験 (Collagen gel droplet embedded culture drug sensitivity test 法: CD-DST 法) を利用し、口腔扁平上皮癌 (OSCC) の臨床検体を用いて各種抗癌剤や Cmax の感受性を検討してきた。そこで、OSCC の Cmax 治療における効果予測因子・薬剤耐性マーカーとして変異型 EGFR である EGFR variant (EGFRv) に着目した。EGFRv は野生型 EGFR (EGFRwt) の exon2-7 の欠失によって抗 EGFR 抗体が認識するリガンド系都合部位を欠いている。そのため、リガンド非存在下でも EGFR の下流シグナルが恒常的に活性化されていると考えられている。よって、HNSCC では EGFRv を介して EGFR 標的治療に耐性を示す可能性が推測される。膠芽腫では EGFR 過剰発現が高頻度に認められるが、EGFRv は 20~30% の症例で認められる。さらに肺癌 16%、乳癌 4% 等の報告がある。HNSCC における EGFRv の発現については様々な報告 (0~80%) があり、EGFRv の OSCC における役割についても明らかになっていない。

2. 研究の目的

EGFR に特異的に結合する抗体である Cmax は、局所進行 HNSCC の局所制御、生存における上乗せ効果、さらに遠隔転移再発 HNSCC に対する生存における上乗せ効果が示されている。EGFR の過剰発現や遺伝子コピー数の増加が HNSCC の予後不良に関係することは知られており、特に放射線療法や化学療法後の予後を予測するうえで重要と考えられている。しかしながら、HNSCC における Cmax に対する反応性を予測する指標について、EGFR の発現レベルやコピー数は指標にならないとされ、その原因の一つとして EGFRv の存在が指摘されている。EGFRwt に対する抗体である Cmax は、EGFR 細胞外ドメインに欠失変異を有する EGFRv への結合性が低いと考えられ、EGFRv を指標としたネガティブセレクションの可能性が示唆されている。そこで、OSCC における EGFRv の発現、役割について検討した。

3. 研究の方法

(1) OSCC における EGFRwt、EGFRv の発現の検討

東海大学医学部付属病院口腔外科において 2011 年 1 月から 2014 年 3 月に手術療法を施行した OSCC96 症例を対象とした。切除直後に切除標本の腫瘍内部から採取した試料を -80℃ で保存した。なお、positive control として HEK293 細胞株にリポフェクション法で EGFRv、EGFR を導入した一過性強制発現株を用いた。

RT-PCR 法による検討

サンプルは OSCC96 症例から得られた腫瘍組織 96 検体と正常組織 51 検体を用いた。EGFRv exon2/7 のジャンクションに設定したプライマーで RT-PCR を行い、目的の EGFRv 由来の増幅バンドかどうかをサンガーシーケンスして確認した。なお、バンドが薄いサンプルについては、TA クローニングを行った後にシーケンスを行った。

デジタル PCR 法による検討

サンガーシーケンスの結果をもとに腫瘍組織由来の 18 サンプルと正常組織由来の 17 サンプル、さらにコントロール 10 サンプルを加えた合計 45 サンプルについて絶対定量発現解析を行った (装置: BIO-RAD 社 QX200 ddPCR システム)。

次世代シーケンス (NGS) 解析の実施

デジタル PCR の結果をもとに次世代シーケンシング (NGS) 解析を行った。サンプルは、デジタル PCR で陽性と確認された腫瘍組織由来の 5 サンプルを用いた。品質検査 (Invitrogen 社 Qubit Fluorometer を用いた濃度測定、Agilent2200 TapeStation system による濃度測定・品質の確認) ライブラリー調整 (イルミナ社 TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit を用いて標準プロトコル (350bp Insert) に従いシーケンシング用ライブラリー調製を行った。DNA 断片化、末端修復、ビーズ精製によるサイズ選択 (350bp Insert) 3' A 付加、アダプターライゲーション) の後、次世代シーケンシング HiSeq によるデータ取得を行った。解析方法は paired end とし、読み取り塩基長は 100 塩基/リード、取得リード数は 500 万リードペア (1000 万リード)/検体、取得データ量は 1 Gb/検体とした。出力された解析生データより塩基配列のテキストデータを取得し、所定のフィルタリングによるリードデータの選別を行った。Index 情報による各サンプルデータの選別を行い、リードトリミングを行った。得られた出力データについて、ヒト EGFR リファレンス配列へのマッピングを行い、この結果から EGFRv exon2/7 のスプライシングを支持するリードを検出した。

(2) OSCC における Cmap 耐性機序の検討

Cmap 耐性株、EGFRv 導入株を作製し、EGFR 関連分子を検討した。

OSCC 細胞 (KON、SAS、Ca9-22、HSC3、HSC4、OSC20) 大腸癌細胞 (Caco2) を Cmap を添加した培養液で、徐々に Cmap の濃度を増やしながら 3 か月間培養を継続し、耐性株を作製した。EGFR、pEGFR、STAT3、pSTAT3、AKT、pAKT、Braf、Hras、PIK3 について Western blot で調べた。

OSCC 細胞株 (Ca9-22) にレトロウイルスベクターを用いて EGFRwt および EGFRv 遺伝子を導入した。EGFR の下流分子である STAT3 と AKT のリン酸化について Western blot で調べた。

4. 研究成果

(1) OSCC における EGFRwt、EGFRv の発現の検討

RT-PCR 法による検討

EGFRwt の発現をすべての腫瘍組織由来のサンプルで認めた (100%)。EGFRv と考えられるバンドを腫瘍組織由来の 96 サンプル中 12 サンプル (12.5%) で検出した。しかし、複数回の PCR で EGFRv の検出が不安定であったため、デジタル PCR 法による検出と次世代シーケンシングによる確認を行うことにした。

デジタル PCR 法による検討

腫瘍組織由来の 18 サンプルの解析を行い、12 サンプル (12/18 67%) で検出され、最大コピー数は 6.2 (copies/20 µL 反応液) であった。しかし、コピー数が検出限界のサンプルが多かった。一方、正常組織由来の 17 サンプルのうち、5 サンプル (5/17 29%) で検出され、最大コピー数は 2.6 (copies/20 µL 反応液) であった。

次世代シーケンシングによる検討

デジタル PCR で陽性とされた腫瘍組織由来の 5 サンプルのうち 3 サンプルで EGFRv の発現を確認した。

~ の解析により、OSCC 96 症例のうち 3 症例 (3/96 3%) においては、確実に EGFRv を発現していると考えられた。

(2) OSCC における Cmap 耐性機序の検討

Cmap 処理した OSCC 細胞 (KON、SAS、Ca9-22、HSC3、HSC4、OSC20) 大腸癌細胞 (Caco2) を用いた Western blot で、EGFR、pEGFR、STAT3、pSTAT3、AKT、pAKT、Braf、Hras、PIK3 について検討したが、コントロールとの差異は認められなかった。

EGFRv 遺伝子導入 OSCC 細胞株 (Ca9-22) を用いた解析では EGFR の下流分子である STAT3 と AKT のリン酸化について Western blot で調べたが、コントロールとの差異は認められなかった。

今回の検討では、タンパク質レベルでの EGFRv の発現やシグナル経路の変化を確認することはできなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamazaki H, Suzuki T, Denda Y, Nakanishi Y, Uchibori M, Kojima R, Kondo Y	4. 巻 126
2. 論文標題 Mandibular pain, trismus, and weight loss in a 75-year-old man.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol	6. 最初と最後の頁 451-456
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.o000.2017.12.012.	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 -
1. 著者名 Yamazaki H, Kojima R, Nakanishi Y, Kaneko A	4. 巻 76
2. 論文標題 A Case of Early Pneumoparotid Presenting with Oral Noises.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Oral Maxillofac Surg	6. 最初と最後の頁 67-69
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.joms.2017.05.039.	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 -
1. 著者名 Yamazaki H, Sasaki M, Aoyama K, Suzuki T, Denda Y, Uchibori M, Nakanishi Y, Kojima R, Ota Y	4. 巻 8
2. 論文標題 Lateral retropharyngeal lymph node metastasis from squamous cell carcinoma of the upper gingiva: a case report	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 MOLECULAR AND CLINICAL ONCOLOGY	6. 最初と最後の頁 68-72
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/mco.2017.1496	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Aoyama Ken-ichi, Okino Yuichiro, Yamazaki Hiroshi, Kojima Rena, Uchibori Masahiro, Nakanishi Yasuhiro, Ota Yoshihide	4. 巻 35
2. 論文標題 Saliva pH affects the sweetness sense	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nutrition	6. 最初と最後の頁 51~55
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.nut.2016.10.018	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 -

1. 著者名 Aoyama Ken-ichi, Okino Yuichiro, Yamazaki Hiroshi, Kojima Rena, Uchibori Masahiro, Nakanishi Yasuhiro, Ota Yoshihide, Kaneko Akihiro	4. 巻 5
2. 論文標題 Relationship of Sex, Age, and Preference Level of Sour Food with Sweetness Sensitivity in Young Japanese Adults	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Nutritional Health & Food Science	6. 最初と最後の頁 1~5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15226/jnhfs.2017.001113	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 -

1. 著者名 Suzuki Takatsugu, Yamazaki Hiroshi, Honda Kazufumi, Ryo Eijitsu, Kaneko Akihiro, Ota Yoshihide, Mori Taisuke	4. 巻 55
2. 論文標題 Altered DNA methylation is associated with aberrant stemness gene expression in early?stage HNSCC	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Oncology	6. 最初と最後の頁 915-924
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ijo.2019.4857	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0件

〔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	森 泰昌 (MORI Taisuke) (00296708)	国立研究開発法人国立がん研究センター・中央病院・医員 (82606)	