

令和 3 年 5 月 7 日現在

機関番号：13101
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2018～2020
課題番号：18K09504
研究課題名(和文) 難治性口腔扁平上皮癌におけるセツキシマブ耐性ループ仮説の検証

研究課題名(英文) Oral squamous cell carcinoma and cetuximab loop theory

研究代表者

佐伯 万騎男 (Saeki, Makio)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：30273692

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：研究期間中にR2TP複合体について得られた成果は大きく3種類に分けられる。ひとつは口腔扁平上皮癌を用いた研究についてまとめて発表したことである。これまでの哺乳類細胞についてのR2TP複合体の機能解析は乳癌細胞株などを用いて行ってきたが、口腔扁平上皮細胞および口腔扁平上皮がん組織検体を用いた研究について初めて成果を発表した。また、もうひとつはこれまで知られていなかったR2TP複合体(正確にはその構成因子のPontin/Reptin)の標的タンパク質HEATR1を見出し、発表したことである。最後に、Pontinががん抑制遺伝子のp53と結合し、その機能に影響を与えることを発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、申請者がこれまでに蓄積してきたPontin/Reptinの基礎的な機能解析結果に基づくものである。口腔がんにおいては未だPontin/Reptinの作用機序に関する研究報告例はなかった。申請者はPontin/Reptinが、口腔扁平上皮癌組織の悪性領域で高発現していることを確認し、口腔がんの診断マーカーとなりうることを見出した。Pontin/Reptinは酵母からヒトまでの真核生物において広く保存され、重要な生物学的意味を持つ。これらの基礎的な特性を明らかにすることにより、これまで難治性だった口腔がんはもちろん、他のがん研究への波及効果を含め、他分野へも広く知見を提供できるであろう。

研究成果の概要(英文)：R2TP/PAQosome (particle for arrangement of quaternary structure) is a novel multisubunit chaperone specialized in the assembly/maturation of protein complexes that are involved in essential cellular processes such as PIKKs (phosphatidylinositol 3-kinase-like kinases) signaling, snoRNP (small nucleolar ribonucleoprotein) biogenesis, and RNAP II (RNA polymerase II) complex formation. In this review article, we describe the current understanding of R2TP/PAQosome functions and characteristics as well as how the chaperone complex is involved in oncogenesis, highlighting DNA damage response, mTOR (mammalian target of rapamycin) pathway as well as snoRNP biogenesis. Also, we discuss its possible involvement in HNSCC (head and neck squamous cell carcinoma) including OSCC (oral squamous cell carcinoma). Finally, we provide an overview of current anti-cancer drug development efforts targeting R2TP/PAQosome.

研究分野：歯科薬理学

キーワード：R2TP p53 口腔扁平上皮がん

1. 研究開始当初の背景

口腔癌の死亡数は男 5,258 人・女 2,122 人と 2015 年の癌死亡総数 37 万人の 2%であるが、30 年前と比較して約 3 倍に増加している(がん研究振興財団, がん統計 2016)。近年の薬剤開発費の高騰と薬剤の副作用による市場からの撤退の増加という医療経済的側面から個別化医療が改めて注目されている。そのため、癌薬物療法におけるコンパニオン診断(投与前に、奏功の程度を予測するための臨床検査)の開発が活発化している。

シスプラチンと 5-FU 併用療法がほぼ唯一の治療選択肢だった再発・転移頭頸部扁平上皮癌の薬物療法は、分子標的薬セツキシマブの登場により新時代に入った。EGF 受容体シグナルを阻害する抗 EGF 受容体モノクローナル抗体であるセツキシマブが 2012 年に頭頸部癌の適応を取得し、シスプラチンと 5-FU の化学療法に分子標的薬のセツキシマブを併用することで治療成績が向上している。2008 年に発表された EXTREME 試験では、化学療法単独の奏効率 20%に対し、セツキシマブ併用の奏効率は 36%と有意に高率であった。しかしながら、セツキシマブ不応患者に対する治療選択肢がまだ不足しており、副作用が社会問題化したゲフィチニブ(商品名イレッサ)に比べ、セツキシマブのコンパニオン診断法の開発は遅れている。

セツキシマブ耐性患者では、口腔扁平上皮癌細胞が産生する EGF 受容体リガンドの上昇が報告されている。また、EGF 受容体のリガンド濃度上昇をもたらす因子のひとつとして申請者らは R2TP 複合体を同定した。このエビデンスと EGF 受容体リガンド処置により R2TP 複合体は核移行する、との仮定から、**R2TP 複合体の核移行による EGF 受容体リガンド産生増加がセツキシマブ耐性の原因(再発・転移頭頸部扁平上皮癌予後予測因子)と考える「耐性ループ仮説」**を立案した。

2. 研究の目的

申請者らは、セツキシマブ耐性口腔扁平上皮癌細胞株の予備的解析から、R2TP 複合体の核移行とセツキシマブ感受性に相関があることを見出していた。(1) **R2TP 複合体の核移行が EGF 受容体リガンドの産生を促進する機序、EGF 受容体リガンドが R2TP 複合体の核移行を引き起こす機序を明らかにすることで耐性ループ仮説を検証すること**、(2) R2TP 複合体が**難治性口腔扁平上皮癌のバイオマーカーとして応用できる可能性を検討すること**が本研究の目的であり、将来的には R2TP 複合体をターゲットにした創薬にも結びつく知見を蓄積していく。申請者らは、アポトーシス誘導タンパク質として 2006 年に Monad を発見したが、Monad が EGF 受容体遺伝子の近傍に位置し、EGF 受容体とともに遺伝子増幅されることから EGF 受容体シグナルに注目し、その後、Monad の結合タンパク質として発見した R2TP 複合体の核移行とセツキシマブ感受性に相関があることを見出し、R2TP 複合体を標的にした難治性口腔癌に対する治療戦略を構想するに至った。

R2TP 複合体は細胞質から核に移行すると、リボソーム合成の場である核小体に局在する。悪性度の高い癌細胞はリボソームを多量に生合成しており、EGF 受容体リガンドも盛んに合成する。癌細胞における核小体でのリボソーム合成メカニズムの解明は創薬におけるターゲット創出にも繋がり、リボソーム合成阻害により癌細胞を特異的に死滅できれば、全く新しい抗癌剤の開発への足掛かりとなる。

R2TP 複合体は申請者らが発見した分子シャペロンである。分子シャペロンはタンパク質の折り畳みを助ける働きを持ち、癌化関連タンパク質を安定化することで、癌進展にも関わる。申請者らはこれまで R2TP 複合体の分子シャペロン機能を解明し、14 報の論文を発表してきた。その中には、細胞培養上清中の EGF 受容体リガンド濃度に及ぼす R2TP 複合体の役割を解析したものも含まれる。2014 年にはこれまでの研究を総説にまとめている。セツキシマブ耐性と相関するバイオマーカー候補として RAS タンパクの変異がある。RAS タンパクに変異が生じると、癌細胞の EGF 受容体シグナル依存性が消失し、セツキシマブに反応しなくなると考えられる。しかしながら、RAS タンパク変異のない野生型の症例でもセツキシマブ不応が認められることから、申請者らは EGF 受容体リガンド濃度上昇のメカニズムに焦点を当てて研究を進めてきた結果、耐性ループ仮説に基づく本研究を提案するに至った。

3. 研究の方法

難治性口腔扁平上皮癌におけるコンパニオン診断の確立

悪性度の低い口腔扁平上皮癌組織に比べ、悪性度の高い癌組織では R2TP 複合体が核に局在することを報告している。口腔病理学を専門とする山崎の協力のもと、セツキシマブ投与と口腔扁平上皮癌で R2TP 複合体が予後予測因子となり得るかどうかを検討する。

口腔扁平上皮癌細胞株を用いた耐性ループ仮説の検証(担当佐伯)

R2TP 複合体が口腔扁平上皮癌細胞において核小体に局在すること、p53 と結合することを見出しており、R2TP 複合体が p53 を安定化するかを検討する。セツキシマブ耐性口腔扁平上皮癌

細胞株を用いて、EGF 受容体リガンド添加の効果を調べ、R2TP 複合体核小体移行 p53 安定化
リボソーム合成促進 EGF 受容体リガンド産生増加（耐性ループ仮説）を検証する。

ノックアウトマウスを用いた、R2TP 複合体シャペロン機能喪失が発生期の奇形をもたらすメカニズムの解析

R2TP 複合体シャペロン機能の喪失により、神経堤細胞が細胞死を起こしている可能性があり、アポトーシスを検出する TUNEL 法を用いた in situ hybridization により検出する。

4. 研究成果

本研究で対象とした Pontin/Reptin は、それ自身が複合体を形成し、分子シャペロンとして DNA 損傷修復、クロマチンリモデリング、テロメア形成などの様々な生命現象の制御機構に関与していることが知られていた。その中で、申請者らは、乳がん細胞において Pontin/Reptin が Monad を介してアポトーシスを制御していることを明らかにしてきた。一方で、口腔扁平上皮癌に関しては、Pontin/Reptin に関する知見がないため、申請者らは、これまで、その基礎的な特徴について解析を行ってきた。まず、口腔扁平上皮癌組織において Pontin/Reptin の免疫組織染色を行ったところ、両者のタンパク質の強発現が確認された。

これまで Pontin/Reptin と口腔扁平上皮癌の悪性化進展との関連性についての報告はなかったが、申請者らが 2021 年に初めて報告した (Kiguchi et al. Identification and characterization of R2TP in the development of oral squamous cell carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 548: 161-166; 2021.)

さらに Pontin/Reptin の発現レベルと唾液腺がん患者の予後との関連性についての報告があり、また、胃がん、肝細胞がん、大腸がん、腎細胞がん、急性骨髄性白血病などで高発現しているという報告がされており、がんの発生や悪性化進展との関わりが注目されており、それらについて総説をまとめた (Kakihara et al., *Jpn Dent Sci Rev.* 2020)。その中で、申請者らは、乳がん細胞において Pontin/Reptin が、mTORC1 を活性化してがん細胞の分裂増殖に必須の機能を担っていることを明らかにした (Kamano et al., *FEBS Lett.* 2013)。これらの基礎研究の蓄積によって、Pontin/Reptin を標的分子とするがん創薬も進められている。これまでに、compound1 や Liddean が阻害薬として報告されているが、十分な実験的エビデンスが無く、未だ前臨床試験にも至っていない。本研究で使用するコルジセピン誘導体であるコルジセピン 5'-トリホスファートについては、Reptin に高親和性に結合する化合物として単離されたばかりであり、その抗腫瘍活性については、申請者の本研究を含めて今後の研究進展が期待される場所であるが、コルジセピンについては、すでに乳がん、肝臓がん、白血病がん細胞において、カスパーゼを増加させることにより、アポトーシス作用を誘導することが示されている (Yoon et al., *Int J Mol Sci.* 2018)。このことから、本研究の実現可能性が十分期待される。本研究によって、口腔がんにおける Pontin/Reptin の役割を明らかになり、それを標的とした治療薬開発に向けて貢献することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kakihara, Y et al.	4. 巻 56-1
2. 論文標題 R2TP/PAQosome as a promising chemotherapeutic target in cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 JDSR	6. 最初と最後の頁 38-42
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jdsr.2019.08.001.	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 Kiguchi T, Kakihara Y, Yamazaki M, Katsura K, Izumi K, Tanuma JI, Saku T, Takagi R, Saeki M.	4. 巻 548
2. 論文標題 Identification and characterization of R2TP in the development of oral squamous cell carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and biophysical research communications.	6. 最初と最後の頁 161-166.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Nakamura et al.	4. 巻 557
2. 論文標題 HEATR1, a novel interactor of Pontin/Reptin, stabilizes Pontin/Reptin and promotes cell proliferation of oral squamous cell carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and biophysical research communications.	6. 最初と最後の頁 294-301.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.04.021.	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kiguchi T, Kakihara Y, Takagi R, Saeki M
2. 発表標題 Analysis of R2TP complex function in oral squamous cell carcinoma.
3. 学会等名 IADR/PER General Session & Exhibition（国際学会）
4. 発表年 2018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	山崎 学 (Yamazaki Manabu) (10547516)	新潟大学・医歯学系・助教 (13101)	
研究 分担者	柿原 嘉人 (kakahara Yoshito) (40379938)	新潟大学・医歯学系・助教 (13101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------