

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20592008

研究課題名（和文） ゲノム・プロテオーム解析を用いた頭頸部癌EGFR過剰発現関連分子の同定

研究課題名（英文） Identification of markers for overexpression of EGFR in head and neck cancer using genomics and proteomics

研究代表者

本間 明宏 (HOMMA AKIHIRO)

北海道大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：30312359

研究成果の概要（和文）：従来、他癌腫で指摘されていたEGFR阻害剤の効能に影響するであろう遺伝子変化から38種類のCommon Mutationを頭頸部癌細胞株35種類の中から同定できた。特にEGFRパスウェイの下流のうち、癌細胞の増殖、浸潤に大きく関与するPI3KCA-AKTパスウェイでの遺伝子変化をいくつかの細胞株で同定できた。

研究成果の概要（英文）：Thirty-eight types of mutation were found in 35 cell lines. Some of them were related with auto-activation of EGFR pathways. Among them, PI3KCA is a key signaling molecular connecting between EGFR and Akt pathway. Mutation in PI3KCA caused protein structural differences in pocket-like portion which associated with protein-protein interaction.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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、EGFR、ゲノム、プロテオーム解析

## 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。この頭頸部癌治療においては、再建術の発達や当科で進めている動注化学療法・放射線同時併用療法により治療成績の改善が期待されてきているが、更に大きな改善の余地が残されている。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・制御のメカニズムや実地臨床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。

EGFRは分子標的治療のターゲットとして、すでにGefinitibやCetuximab等で臨床応用されている。頭頸部癌はあらゆる癌の中で最もEGFR過剰発現をきたす率が高く、その治療効果が期待されたが、その効果は限定的であった。肺癌におけるGefinitibの効果はEGFRの特異的なmutationにあよることがScience、Lancet誌に同時に報告され、このような遺伝子変化が分子標的治療における薬剤感受性に変化を与えることが示された。頭頸部癌においてはいくつかのmutationのタイプが報告されており、VIII型のmutationは近年注目さ

れている EGFR 過剰発現に伴う遺伝子変化である。しかし、いまだこの変化がシグナル伝達や癌組織の増殖、転移に与える影響についての詳細は不明である。

最近の分子生物学の進歩から、癌は遺伝子異常の多段階的蓄積で生じることが明らかになり、様々な遺伝子異常をとらえることで癌の本質が解明され、それが革新的な診断・治療に結びつくことが期待された。しかし、これまで報告されてきた分子マーカーや遺伝子発現情報で臨床応用に至ったものはない。その理由として、1) 現在報告されているマーカーとなる少ない種類の遺伝子・タンパク質では多彩な癌の形質が十分に反映されていないこと、2) 実際の機能を担うタンパク質の発現が mRNA の発現と必ずしも対応せず、遺伝子レベルだけの網羅的解析だけでは不十分であることが挙げられる。

## 2. 研究の目的

頭頸部癌検体から Laser microdissection 法を用いて癌組織における EGFR 分子の過剰発現の有無および mutation の形式を分類する。これらの mutation のタイプによる遺伝子発現の違いを Array CGH, cDNA microarray 等を用いて検討する。すでに我々は同じ扁平上皮癌である食道癌検体を用いたプロテオーム解析研究にて、組織型によりその構成タンパク質が全く異なることを確認し、癌化や分化に関わるタンパク質群の他、予後やリンパ節転移に関連したタンパク質群を同定している。このプロテオミクス技術を用いてタンパク質レベルでの変化についても検討し、癌の増生、転移のメカニズムの核となる EGFR シグナル伝達の異常を解明し、これに関わる新たな標的分子、シグナル伝達機構の解明する。

臨床への応用は従来からの簡便な免疫染色や ELISA 法を用いることで遺伝子・タンパク発現レベルで癌組織を簡易に分類でき、個々の癌組織の特性に基づいたテーラーメイド医療の提供が期待できる。本研究で得られる知見によって、EGFR 過剰発現にや遺伝子変異に基づいた癌の個性に関わる分子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、個々の症例に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。連続切片をヘマトキシリン染色のみ行い

Lasermicrodissection 法を用いて当該組織のみを採取し、DNA, mRNA, タンパク質をそれぞれ

抽出する。

### (2) Mutation のタイプ別分類

EGFR の発現を mRNA レベル、タンパク質レベルで定量化する。さらにリン酸化された EGFR もその発現量を定量する。Mutation の有無については Wild type, VIII 型以外にもできる限り遺伝子変化の type 別に分類する。

### (3) Array CGH, cDNA microarray、2 次元電気泳動及び発現解析

抽出した DNA は Array CGH 法を用い、mRNA は cDNA microarray、タンパク質は主に 2 次元電気泳動にて展開する。データは膨大な量になるため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、階層的クラスター分析、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分子を遺伝子、タンパク質レベルで層別化する。

### (4) 質量分析および当該タンパク質の確認

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。他方、当該タンパク質群の発現をウエスタンブロット法、ELISA 法、免疫染色法により確認する。

### (5) EGFR および関連タンパク質による免疫沈降

EGFR 過剰発現に関連するタンパク質を免疫沈降法、質量分析にて同定する。

これらのタンパク質は多数同定される可能性が高いが、microarray や 2 次元電気泳動法から得られたデータから取捨選択を行い、EGFR 過剰発現に関連して増減する分子を絞り込む。

### (6) RNA 干渉、遺伝子組み込みによる当該分子の機能解析

頭頸部癌細胞株を用い、当該分子の発現量の変化に伴う EGFR もしくはそのシグナル伝達に関する分子の発現・及び活性の変化を定量する。当該分子のシグナル伝達、細胞周期などに与える影響等の機能を評価する。

### (7) 当該分子のモノクローナル抗体などを用いた医療への応用

モノクローナル抗体を精製し、扁平上皮癌モデルマウスへの投与を試みる。

### (8) 追加サンプルによるタンパク質発現再現性の確認と域値の設定

同様の臨床背景を持つ他検体を用いて同様にタンパク抽出、ウエスタンブロット、ELISA 法を行いタンパク質の発現が同じ結

果を示すかどうかを検証し、臨床検査・治療における域値の設定を行う。同検体から mRNA を抽出して RT-PCR を行い、トランスクリプトームレベルでの発現を検討し、臨床応用に向けより敏感度、特異度が高く簡易な検査法を確立する。

#### 4. 研究成果

今回の目的分子である EGFR の vIII 型の変異をもつものは実際の検体では皆無であった。しかし、EGFR の機能に大きく影響を与えるであろう EGFR パスウェイの分子のシグナル伝達活性化に関与するいくつかの mutation を頭頸部癌細胞株で見つけることができた。従来、他癌腫で指摘されていた EGFR 阻害剤の効果に影響するであろう遺伝子変化から 38 種類の Common Mutation を頭頸部癌細胞株 35 種類の中から同定することができた。特に EGFR パスウェイの下流のうち、癌細胞の増殖、浸潤に大きく関与する PI3KCA-AKT パスウェイでの遺伝子変化をいくつかの細胞株で同定できた。さらに PI3KCA の変異については、そのタンパク構造の変化に対するも検討を行っている。実際に mutation により PI3KCA のポケット状構造にあたる部位にアミノ酸変化をおこした口腔癌由来の細胞株ではリガンドの有無によらずに、その下流の活性化が起こることを突き止めている。

今後は、これらの変異を認めた頭頸部癌細胞株を用いて、リガンドや阻害剤の有無による下流の活性化の変化を追うことで、その効果のメカニズムの解明にあたりたい。この遺伝子変化はこれまでに非肺小細胞癌でその近位に遺伝子変化があることが分子標的治療の効果に違いが生まれることが報告されており、頭頸部癌でも同様の機構があることが予測される。これによりこの遺伝子変異によって起こるであろう頭頸部扁平上皮癌の治療効果の変化だけでなく副作用の予測マーカーとしても可能性があり、さらには当該分子を標的とする分子標的治療も開発段階である。従来の抗癌剤との併用や放射線治療との併用によるより一層の頭頸部癌治療の予後改善へのブレイクスルーとなることを期待したい。

#### 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 12 件)

- ① Homma A : Superselective high-dose cisplatin infusion with concomitant radiotherapy in patients with advanced cancer of the nasal cavity and paranasal sinuses: a single institution experience. Cancer 115, 4705-14, 2010 年, 査読有
- ② Fujii M, Tomita K, Nishijima W, Tsukuda M, Hasegawa Y, Homma A and Tomita T, et al : Phase I/II study of s-1 plus cisplatin combination chemotherapy in patients with advanced/recurrent head and neck cancer. Jpn J Clin Oncol 40, 214-221, 2010 年, 査読有
- ③ Homma A : Importance of comorbidity in hypopharyngeal cancer. Head Neck 32, 148-53, 2010 年, 査読有
- ④ Nishioka T, Fujino M, Homma A et al : Cesium implant for tongue carcinoma with a thickness of 1.5 cm or more: cases successfully treated with a Modified Manchester System. Yonsei Med J 51, 557-61, 2010 年, 査読有
- ⑤ Taki S, Homma A, Oridate N et al : Salvage surgery for local recurrence after chemoradiotherapy or radiotherapy in hypopharyngeal cancer patients. Eur Arch Otorhinolaryngol 267, 1765-9, 2010 年, 査読有
- ⑥ Hatakeyama H, et al : Regulation of heparin-binding EGF-like growth factor by miR-212 and acquired cetuximab-resistance in head and neck squamous cell carcinoma. PLoS One 13, E12702, 2010 年, 査読有
- ⑦ Chung CH, Aulino J, Muldowney NJ, Hatakeyama H, et al: Nuclear factor-kappa B pathway and response in a phase II trial of bortezomib and docetaxel in patients with recurrent and/or metastatic head and neck squamous cell carcinoma. Ann Oncol 21, 864-70, 2010年, 査読有
- ⑧ Oridate N, Homma A, Suzuki S et al : I p53 expression in concurrent chemoradiotherapy with docetaxel for head and neck squamous cell carcinoma. Auris Nasus Larynx 36, 57-63, 2009 年, 査読有
- ⑨ Oridate N, Homma A, et al : p53 expression in concurrent chemoradiotherapy with docetaxel for head and neck squamous cell carcinoma. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 135, 363-368, 2009 年, 査読有
- ⑩ Suzuki K, Nishioka T, Homma A, et al : Value of fluorodeoxyglucose positron emission tomography before radiotherapy for head and neck cancer: does the standardized uptake value predict treatment outcome?. Jpn J Radiol 135, 237-242, 2009 年, 査読有
- ⑪ Robbins KT, Homma A : Intra-arterial chemotherapy for head and neck cancer: experiences from three continents. Surg Oncol Clin N Am 17, 919-933, 2008 年,

査読有

- ⑫ **Homma A**, et al : Computer image-guided surgery for total maxillectomy, Eur Arch Otorhinolaryngol 265, 1521-1526, 2008年, 査読有

〔学会発表〕(計 14 件)

- ① **Homma A** : The efficacy of superselective intra-arterial infusion for unresectable carcinoma of the paranasal sinuses. The American Head and Neck Society 2010 Research Workshop, 2010年10月28~30日, ハイアットリージェンシー (アーリントン・米国)
- ② **Homma A** : Multicenter Phase II Study of an Opioid-based Pain Control Program for Head and Neck Cancer Patients Receiving Chemoradiotherapy. 35<sup>th</sup> European Society for Medical Oncology Congress, 2010年10月8~12日, フィエラミラノシティ (ミラノ)
- ③ **本間明宏** : パネルディスカッション—鼻副鼻腔腫瘍治療戦略の新しい可能性を探る—。鼻副鼻腔悪性腫瘍に対する超選択的動注療法. 第49回日本鼻科学会総会・学術講演会, 2010年8月28日, 札幌コンベンションセンター (札幌市)
- ④ **本間明宏** : 臨床教育講演「新しいがん治療と機能温存」。超選択的動注化学療法と放射線の同時併用療法. 第72回耳鼻咽喉科臨床学会, 2010年7月2日, 倉敷市芸文館 (倉敷市)
- ⑤ **Homma A** : Concurrent Superselective Intra-Arterial Cisplatin Infusion with Concomitant Radiotherapy for Laryngeal Cancer. IFHNOS (第4回国際頭頸部腫瘍学会議), 2010年6月17日, ロッテホテル (ソウル)
- ⑥ **本間明宏** : 下咽頭癌—手術可能症例に対する治療—超選択的動注療法. 第15回頭頸部癌化学療法研究会, 2010年3月6日, ホテルセントラーザ博多 (福岡市)
- ⑦ **本間明宏** : 化学放射線療法後の救済手術における皮膚切開デザインの工夫. 第20回日本頭頸部外科学会総会ならびに学術講演会, 2010年1月28日, 京王プラザホテル (東京都)
- ⑧ **本間明宏** : 下咽頭がんに対する超選択的動注化学療法. 第2回喉頭機能温存治療研究会, 2009年11月27日東京コンファレンスセンター (東京都)
- ⑨ **Hatakeyama H**: Insulin-like Growth Factor-I Receptor Inhibitor Sensitizes Head and Neck Cancer Cells to Cetuximab and Methotrexate. 45th Annual meeting of American Society of Clinical Oncology, 2009年5月29日~6

月2日, オレンジカウンティコンベンションセンター (Orlando, Florida)

- ⑩ **Hatakeyama H**: Cetuximab sensitivity in head and neck squamous cell carcinoma cell lines based on the HPV status. 100<sup>th</sup> Annual meeting of American Association for Cancer Research 2009年4月18日~4月22日, デンバーコンベンションセンター (Denver, Colorado)
- ⑪ **本間明宏** : 頭頸部癌に対する超選択的動注療法と照射同時併用療法, 第46回日本癌治療学会総会, 2008年10月31日, 名古屋国際会議場(名古屋市)
- ⑫ **Homma A** : Importance of Comorbidity in Hypopharyngeal Cancer. the 7th International Conference on Head and Neck Cancer, 2008年7月20日, マリオットホテル(San Francisco)
- ⑬ **本間明宏** : 鼻前庭原発扁平上皮癌に対する超選択的動注療法と照射の同時併用療法の経験. 第70回耳鼻咽喉科臨床学会総会及び学術講演会, 2008年6月28日, 長崎ブリックホール(長崎市)
- ⑭ **本間明宏** : 下咽頭癌における comorbidity(併存疾患)の予後への影響について. 第109回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会, 2008年5月17日, 大阪国際会議場(大阪市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本間 明宏 (HOMMA AKIHIRO)  
北海道大学・大学院医学研究科・准教授  
研究者番号 : 30312359

(2) 研究分担者

畠山 博充 (HATAKEYAMA HIROMITSU)  
北海道大学・北海道大学病院・助教  
研究者番号 : 10455652