

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592207

研究課題名（和文） 頭頸部がんにおける表皮成長因子受容体ファミリー遺伝子の変異解析とその薬剤感受性

研究課題名（英文） Mutation status of epidermal growth factor receptor family gene in head and neck squamous cell carcinoma and its drug-sensitivity to small molecule inhibitors.

研究代表者

湯坐 有希 (YUZA YUKI)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：30277090

研究成果の概要（和文）：

頭頸部扁平上皮がん（HNSCC）92検体を用いて表皮成長因子受容体（EGFR）ファミリー遺伝子変異解析を行い、EGFR変異5種/6検体（L858R、E709K、V765G、G1022S、ins770G）、HER2変異1検体（K716E）を認めた。L858R、E709K、ins770GはBa/F3細胞をIL-3非依存性に活性化し、EGFRの常時リン酸化を認め、EGFR阻害剤に対しL858R、E709Kは感受性、逆にins770Gは比較的耐性を示した。リンパ節転移巣では1例のみで原発巣と同変異を認めた。HNSCC96検体を用いた*K-Ras*、*B-Raf*、*PIK3CA*遺伝子変異検索で*K-Ras*:1種/3検体、*PIK3CA*:3種/3検体に既知の変異を認めた。

研究成果の概要（英文）：

We explored mutation status of epidermal growth factor receptor, *EGFR*, family gene using 92 head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC, samples. 5 mutations of *EGFR*, L858R, E709K, V765G, G1022S, and ins770G, in 6 samples and 1 mutation of *HER2*, K716E, in 1 sample have been recognized. Of these mutations, L858R, E709K and ins770G could render the growth of Ba/F3 cells independent of IL-3 by the constitutive autophosphorylation of *EGFR*. L858R and E709K showed sensitivity to *EGFR* inhibitors, although ins770G showed relatively resistance to those inhibitors.

Only one out of 31 lymph node metastases showed the same *EGFR* mutation of the primary site, L858R.

Also we examined mutation status of down-stream genes of *EGFR* pathway, *K-Ras*, *B-Raf* and *PIK3CA*. And we found 3 each already known mutations of *K-Ras* and *PIK3CA*.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：頭頸部扁平上皮がん、表皮成長因子受容体、遺伝子変異、分子標的薬、ゲノム医学

1. 研究開始当初の背景

(1) 頭頸部扁平上皮がんは、日本においては全癌種の約 5%程度と比較的まれな疾患ではありますが、手術療法中心である現在の治療戦略では、顔貌の著しい変容を来してしまうことが問題となっております。一方、従来からの抗がん剤及び放射線による治療効果は非常に限られたものであります。2005 年ごろより、表皮成長因子受容体 (EGFR) 阻害剤や抗 EGFR 抗体を単剤、もしくは放射線療法や化学療法と併用した臨床試験の結果が報告され、EGFR 経路を阻害する治療の有効性が示唆されております。さらに頭頸部扁平上皮がんにおいて *EGFR* キナーゼドメインの遺伝子変異や *Her2* キナーゼドメインの遺伝子変異が報告されております。さらに他のいくつかの癌腫においてはキナーゼドメイン外の *EGFR* 遺伝子変異が報告されております。

(2) 肺がんに対する EGFR 阻害剤の治療効果に、肺がん細胞の持つ *EGFR* 遺伝子の点突然変異が関与していることが、2003 年報告されました。その後の検討で、150 以上の異なる *EGFR* 遺伝子変異が報告されており、EGFR 阻害剤に対する腫瘍の薬剤耐性に関しても、*EGFR* 遺伝子の変異の一部が関与していることが明らかになりました。

(3) これら個々の *EGFR* 遺伝子変異の EGFR 阻害剤に対する薬剤感受性の検討のために、いくつかの *in vitro* 実験系が確立されており、それを用いた薬剤感受性の検討と臨床データも高い相関を得ております。このような実験系の一例が、マウス造血細胞 (Ba/F3) に変異型 EGFR を導入した系です。この実験系の長所としては①遺伝子導入が容易で、②薬剤感受性も非常に短期間に明快に判定することが出来ることがあげられ、短

所としては血液由来の細胞であることがあげられます。

2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、頭頸部癌の約 90%が組織学的には扁平上皮がんであり、「頭頸部癌においても *EGFR* 及び *EGFR* ファミリー遺伝子に遺伝子変異がある」と仮説を立て、これらの遺伝子について臨床検体を用いて、遺伝子変異の検索を行うことを目的の一つとしました。

(2) また、頭頸部扁平上皮がんから得られた新規変異型遺伝子の腫瘍原性及び EGFR 阻害剤に対する薬剤感受性、それらの機序の解明を、Ba/F3 細胞を用いた *in vitro* の実験系で検討していき、将来期待されている、遺伝子変異に基づいた適切な治療 (薬剤) の選択、いわゆるテーラーメイド医療の基礎データ蓄積を第二の目的といたしました。

3. 研究の方法

(1) 本研究の概要は、まず頭頸部がん患者から得られた臨床検体を用いて腫瘍細胞の *EGFR* ファミリー遺伝子変異のプロファイリングを検討します。そして変異型遺伝子が検出された場合には、その変異型遺伝子の腫瘍原性及びそれぞれに対する阻害剤に対する薬剤感受性を、Ba/F3 細胞を用いた *in vitro* の実験系で検討していくというものです。

本研究で用いる Ba/F3 細胞は通常はインターロイキン 3 (IL-3) の存在下でのみ細胞の増殖を続けます。しかし bcr/abl 蛋白質などのような、常時活性化しているチロシンキナーゼが外部から導入されると、その導入された情報伝達系により細胞増殖がコントロールされるようになり、IL-3 非存在下でも増殖するようになります。細胞は外より導入された情報伝達系に完全にコントロールされ

ておりますので、その経路の阻害剤に対する感受性を直接的に観察することが出来ます。

(2) 本研究は当大学 DNA 医学研究所分子遺伝学講座、DNA 医学研究所遺伝子治療学講座、小児科学講座、及び耳鼻咽喉科学講座にて行います。

(3) 本研究は頭頸部がん手術時に得られた臨床検体の一部を用います。対象は以下の条件を満たしている患者を対象とします。①癌の診断が確定しており、その病名告知を受けている、②生検、あるいは手術適応患者、③主治医による説明と書面による同意が得られている、④本人の同意が得られている。

(4) 具体的な方法は以下の通りです。

1. 当院耳鼻咽喉科にてインフォームドコンセントを得られた頭頸部がん患者より臨床検体を採取。
2. 得られた臨床検体より RT-PCR を施行、*EGFR* ファミリー遺伝子 (*EGFR* については全長、その他はキナーゼドメイン)、*EGFR* 経路下流の遺伝子 (*B-Raf*, *K-Ras*, *PIK3CA* 変異の hot spot) の変異を解析。
3. 遺伝子変異が検出された場合には site-directed mutagenesis を用いて変異型 *EGFR* または *ErbB2* を持つレトロウイルスのベクター (pBABE-puro) を作製、これを Ba/F3 細胞に導入。
4. 導入した a/F3 細胞が IL-3 非存在下で増殖するかを観察し (anchor-independent growth)、腫瘍原性を判定。
5. 4. で得られた自立増殖するようになった変異型 *EGFR* を発現した細胞を用いて、いくつかの *EGFR* 阻害剤 (gefitinib 等) による薬剤感受性検査を MTS 法にて施行。
6. また、得られた *EGFR* 遺伝子変異の機能解析を、*EGFR* 蛋白質及び、その下流情報伝達系蛋白質のリン酸化を Western

blotting を用いて検討。

4. 研究成果

(1) 頭頸部扁平上皮がん (HNSCC) 92検体を用い、表皮成長因子受容体 (*EGFR*) の遺伝子全長の変異検索を行い、6検体 (6.5%) で変異を認めました。肺がんで既報のL858R (2例) 以外は、新規の変異でした。3つは一塩基置換によるアミノ酸置換 (E709K、V765G、G1022S) で、残る1つは3塩基付加による1アミノ酸付加変異 (ins770G) でしたが、いずれも他のがん種でも高頻度に変異が認められるエクソン19、21に位置しておりました。一方細胞外ドメイン変異は1例も認めませんでした。*EGFR* ファミリー遺伝子である、*HER2*、*HER3*、*HER4* のキナーゼドメインについて遺伝子変異解析を行いました。ins770Gの検出された症例で同時に*HER2*のK716E変異を認めた (1.1%) 以外は、遺伝子変異は検出されませんでした。これは他のがん種における発生頻度よりも低いものでした。

上記のこれまで報告のない遺伝子変異についてその腫瘍原性について、BaF3 細胞を用いた実験系で解析いたしました。その結果 *EGFR* の E709K、D770 ins G 変異は既報の L858R 変異と同様に BaF3 細胞を IL-3 非依存性に活性化することができ、その機序には *EGFR* 及び下流の *STAT-3* が常時リン酸化され活性化していることが関与していると考えられました。*EGFR* 阻害剤に対する感受性は、E709K は感受性を示しましたが、D770 ins G は比較的耐性を示すことが判明しました。

(2) また、このうちリンパ節転移巣のある検体31ペア (L858R: 2例、E709K: 1例、ins770G: 1例、他は野生型) を用い、表皮成長因子受容体 (*EGFR*) ファミリー遺伝子の遺伝子変異に原発巣と転移巣で差異があるか解析したところ、原発巣でL858Rの遺伝子変異が*EGFR*に認められた1検体においてのみ同様にL858R遺伝子変異が検出され、その他では原発巣に遺伝子変異があっても、転移巣では野生型*EGFR*でした。また転移巣においては*HER2*、*HER3*、*HER4* 遺伝子変異は認められませんでした。

(3) 次いでHNSCCの96検体を用い*EGFR*の下流に位置し、重要な信号伝達ネットワークを形成している*K-Ras*、*B-Raf*、*PIK3CA*についてその遺伝子変異検索を、それぞれの遺伝子の遺伝子変異のホットスポットについて行いました。その結果、6検体 (6%) で変異を認めました。*B-Raf*遺伝子の変異は認められず、*K-Ras*の遺伝子変異3検体 (G12A: 3例)、*PIK3CA*の遺伝子変異3検体 (E454K: 2例、H1047R: 1例) で、これらはすべて他のがん種において既報の遺伝子変異でした。

これら下流分子の遺伝子変異を認めた検体において、EGFRの状態について比較検討したところ、全検体でEGFR蛋白は過剰発現しておりましたが、EGFR蛋白リン酸化部位のリン酸化状態は1検体のみ過剰にリン酸化しておりましたが、多くではEGFRからの活性化シグナルは関与していないことが示唆されました。

(4)このようなまとまった症例数の日本人頭頸部扁平上皮がんについてのEGFRファミリー遺伝子、及びその下流遺伝子変異解析はこれまでにありません。この研究により日本人における遺伝子変異発生頻度が明らかになり、また新規変異遺伝子のEGFR阻害剤に対する薬剤感受性が検討できたことは、目的にも述べたテイラーメイド医療実践のための基礎資料として意義があると考えます。

今後の方向性としては、EGFR信号伝達経路が頭頸部扁平上皮がんの発がんメカニズムで果たす役割の解明、新規分子標的薬の薬剤感受性の検討、薬剤耐性克服の研究等が考えられます。

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1件)

① Takanori Hama, Yuki Yuza, Toshihito Suda, Yoshimichi Saito, Chihiro Norizoe, Takakuni Kato, Hiroshi Moriyama, Mitsuyoshi Urashima, Functional mutation analysis of EGFR family genes and corresponding lymph node metastases in head and neck squamous cell carcinoma, Clin Exp Metastasis, 査読有、29巻、2012、19-25
DOI: 10.1007/s10585-011-9425-5

[学会発表] (計 件)

① Takanori Hama, Chihiro Norizoe, Yuki Yuza, Toshihito Suda, Takakuni Kato, Hiroshi Moriyama, Mitsuyoshi Urashima, Prognostic significance of vitamin D receptor polymorphisms in head and neck squamous cell carcinoma, AACR (American Association for Cancer

Research) 102nd Annual Meeting, 2011年4月3日、Orlando、USA

② Toshihito Suda, Takanori Hama, Susumu Okano, Youichi Seino, Yuki Yuza, Takakuni Kato, Hiroshi Moriyama, Mutation analysis of PIK3CA, KRAS, BRAF and corresponding EGFR status in head and neck squamous cell carcinoma, AACR (American Association for Cancer Research) 102nd Annual Meeting, 2011年4月3日、Orlando、USA

③濱孝憲、須田稔士、清野洋一、加藤孝邦、森山寛、頭頸部癌におけるEGFRファミリー (HER1~HER4)の遺伝子解析と薬剤感受性の検討、第111回日本耳鼻咽喉科学会総会、2010年5月22日、仙台。

④濱孝憲、須田稔士、清野洋一、浦島充佳、加藤孝邦、頭頸部癌における上皮成長因子受容体(EGFR)遺伝子変異とリン酸化の検討(再発予後因子の検討)、第33回日本頭頸部癌学会、2009年6月11日、札幌。

⑤ Takanori Hama, Yuki Yuza, Yoshimichi Saito, Toshihito Suda, Takakuni Kato, Mitsuyoshi Urashima, Prognostic significance of epidermal growth factor receptor phosphorylation and mutation in head and neck squamous cell carcinoma, AACR (American Association for Cancer Research) 100th Annual meeting, 2009年4月20日、Denver、USA

〔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

湯坐 有希 (YUZA YUKI)
東京慈恵会医科大学・医学部・講師
研究者番号：30277090

(2) 研究分担者

加藤 孝邦 (KATO TAKAKUNI)
東京慈恵会医科大学・医学部・教授
研究者番号：60147296

(3) 研究分担者

横川 裕一 (YOKOKAWA YUICHI)
東京慈恵会医科大学・医学部・助教
研究者番号：90468687