

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592517

研究課題名(和文) 頭頸部癌シグナル伝達ネットワークの解明

研究課題名(英文) Network of signaling pathway of head and neck cancer

研究代表者

畠山 博充 (Hatakeyama, Hiromitsu)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：10455652

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円、(間接経費) 1,140,000円

研究成果の概要(和文)：各種癌においてその増殖に関わるシグナル伝達機構が徐々に明らかとなり、そのパスウェイの制御が癌治療に応用されている。我々はゲノム・プロテオーム解析を軸にしたバイオインフォマティクス技術を駆使して、上皮間葉移行に対応した癌増殖シグナル伝達およびそのシグナル伝達系相互のクロストークに関連した分子群を同定してきた。頭頸部癌では上皮成長因子受容体(EGFR)パスウェイが重要な増殖のシグナル伝達であるが、その阻害剤であるセツキシマブの効果がEGFR及びそのリガンドの発現によって異なることが分かった。このリガンドの作用を減弱することで、セツキシマブの作用を増強するだけでなく、耐性化の克服も期待できる。

研究成果の概要(英文)：Signaling pathways associated with the growth of cancer cell have been gradually revealed and the regulation of the pathway has been applied to treatment of various cancers. We identified the cluster of molecular which associated with the cross-talk of signaling pathway and epithelial-mesenchymal transition of head and neck cancer cells using the genome-proteome analysis. Furthermore, we find that the sensitivity to cetuximab, monoclonal antibody of epidermal growth factor receptor (EGFR), was correlated with the expression of EGFR itself and the level of ligands to EGFR. The regulation of the ligands might contributed to enhance the effect of cetuximab and expected to overcome the resistance to cetuximab

研究分野：耳鼻咽喉科学

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：シグナル伝達 上皮成長因子受容体(EGFR) リガンド

1. 研究開始当初の背景

分子生物学の発展に伴い、新たな臨床的ブレイクスルーとして分子標的治療が注目され各種癌においてその有効性が明らかとなってきた。頭頸部癌においては、すでに欧米で上皮成長因子受容体 (Epidermal Growth Factor Receptor: EGFR) をターゲットとした臨床試験が行われ、そのモノクローナル抗体として開発された Cetuximab は従来の放射線化学療法の治療効果を高めることが証明されてきた。しかし治療効果には個人差があり、従来の抗腫瘍薬同様に治療当初は感受性を示すものの、徐々に耐性化する症例があることもわかってきた。肺癌においては EGFR の mutation の有無が分子標的治療の感受性に関わることが報告されたが、頭頸部癌においてはこれらの遺伝子変化はまれであり、症例選択における重要な因子とはならないことが我々の研究から明らかになっている。以前より腫瘍の分化度が低下する上皮間葉系移行により、Erb-B family に代表される上皮系癌細胞の増殖シグナルが Transforming Growth Factor Beta (TGF- β) 等の間葉系増殖シグナルに移行することが知られている。各種癌細胞においては、多数の細胞増殖に関連するシグナル伝達パスウェイが発見され、それに対応した分子標的薬が開発されている。また各パスウェイはお互いを相補するように働き、上皮間葉移行に伴うパスウェイの転換は分子標的治療の耐性機構の原因となることがわかってきた。我々のこれまでの研究から、頭頸部扁平上皮癌症例においても分子標的治療効果の偏りと耐性化の原因としてこのパスウェイの相補と転換が関与していることは明らかである。本研究ではトランスクリプトームおよびプロテオーム解析技術を導入してその頭頸部癌シグナル伝達ネットワークに関連する分子の網羅的解析を行う。これによりシグナル伝達に基づいた頭頸部癌増殖に関する極めて有用な基礎的情報を提供するとともに、従来の TNM 分類だけによることのない個々人に最も適した治療の施行が可能となり、さらなる治療成績の向上が期待される。

2. 研究の目的

本研究では我々のもつ多数の頭頸部扁平上皮癌症例の凍結標本から

Lasermicrodissection法にて抽出した RNA およびタンパク質を用いてその microRNA 発現、mRNA 発現、タンパク質発現を数値化、バイオインフォマティクスアプローチによってそれぞれのシグナル伝達機構に関連した分子群をパスウェイ別に抽出し、その発現によって症例のクラスター解析を行う。こうして選出されたそれぞれのシグナル伝達に関連する分子についてはその上流、下流の分子との関連やシグナル活性の有無をリン酸化もしくは免疫沈降により確認する。同定された分子群のシグナル系相互のクロストークへの影響は頭頸部癌細胞株を用いてトランスフェクションおよびノックダウンを行い、その上下流にある分子への影響を検証する。これにより同定された分子群が分子標的治療に対する感受性マーカーとなるかを検討するだけでなく、当該分子のモノクローナル抗体や阻害薬を用いて分子治療の新たな標的となりうるかを検討する。

3. 研究の方法

(1) セツキシマブ耐性化の解明

セツキシマブ高感受性頭頸部癌細胞株 SC1 とその耐性クローンである 1Cc8 を用いて、各リガンドの発現とセツキシマブ耐性への影響を比較した。microRNA の発現は Taqman Array (Applied Biosystem) を用いている。

(2) セツキシマブ de novo における感受性の解明

頭頸部癌細胞株 35 種類のセツキシマブへの感受性をマトリゲルを用いたコロニーアッセイにてランク付けをし、マイクロアレイを用いてこれに合わせて変動する遺伝子群を解析した。

4. 研究成果

(1) HB-EGF, Amphiregulin, TGF- β がセツキシマブの感受性に影響を与え、さらに耐性株では親株に比べ HB-EGF, TGF- β の発現が亢進していることが確認された。なかでも HB-EGF は少量でもセツキシマブの耐性化を起し、その下流のパスウェイの活性化を起こすことが確認された。HB-EGF ノックダウン株は高いセツキシマブ感受性を示し、患者血清中、癌組織中の HB-EGF 濃度は初診時より再発時で高かった。miRNA212 は耐性株で低値

を示し、HB-EGF の発現を制御していた。セツキシマブの耐性化にはリガンドが強く関与しており、またこのリガンド発現の制御に microRNA が関与していた。リガンドの発現はセツキシマブ感受性のマーカーとして有用と考えられ、さらには microRNA を分子標的とした治療は、頭頸部癌治療における新たなブレイクスルーとなることが期待される。

(2) セツキシマブの感受性に相関して発現する遺伝子を 700 種類以上同定した。この結果から NF- κ B パスウェイ関連遺伝子が耐性株で強く発現していた。セツキシマブ耐性頭頸部癌細胞株は NF- κ B 阻害剤に強い感受性を示した。

結論：セツキシマブ耐性には NF- κ B パスウェイが EGFR パスウェイを相補することで関与していた。NF- κ B 活性阻害剤はすでに分子標的治療薬として開発されており、頭頸部癌治療における新たなブレイクスルーとなることが期待される。

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 6 件)

1. Sakashita T, Homma A, Suzuki S, Hatakeyama H, Kano S, Mizumachi T, Oridate N, Fukuda S: Prognostic value of cyclin D1 expression in tumor-free surgical margins in head and neck squamous cell carcinomas. *Acta Otolaryngol* 133:984-991, 2013, (査読有)
2. Sakashita T, Homma A, Oridate N, Suzuki S, Hatakeyama H, Kano S, Mizumachi T, Onimaru R, Tsuchiya K, Yasuda K, Shirato H, Fukuda S: Regional control after concomitant chemoradiotherapy without planned neck dissection in node-positive head and neck squamous cell carcinomas. *Auris Nasus Larynx* 40:211-215, 2013, (査読有)
3. 水町貴論, 折館伸彦, 本間明宏, 坂下智博, 加納里志, 畠山博充, 鈴木清護,

福田 諭: 喉頭癌 T3 症例の治療成績の検討. *頭頸部外科* 22:317-21, 2013, (査読有)

4. Fertig EJ, Ren Q, Cheng H, Hatakeyama H, Dicker AP, Rodeck U, Considine M, Ochs MF, Chung CH: Gene expression signatures modulated by epidermal growth factor receptor activation and their relationship to cetuximab resistance in head and neck squamous cell carcinoma. *BMC Genomics* 13:160, 2012, (査読有)
5. Mizumachi T, Kano S, Sakashita T, Hatakeyama H, Suzuki S, Homma A, Oridate N, Fukuda S: Improved survival of Japanese patients with human papillomavirus-positive oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Int J Clin Oncol* 18: 824-828, 2012, (査読有)
6. Taki S, Homma A, Suzuki F, Oridate N, Hatakeyama H, Mizumachi T, Kano S, Furusawa J, Sakashita T, Inamura N, Yoshida D, Onimaru R, Shirato H, Fukuda S: Combined modality therapy for laryngeal cancer with superselective intra-arterial cisplatin infusion and concomitant radiotherapy. *Int J Clin Oncol* 17:441-6, 2012, (査読有)

[学会発表](計 4 件)

1. Hiromitsu Hatakeyama: Epithelial-Mesenchymal Transition in Human Papilloma Virus Positive and Negative Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma., AAO-HNSF, 2013 9.28-10.1, Vancouver Convention and Exhibition Center (Vancouver, Canada)
2. Hiromitsu Hatakeyama: The Role of MicroRNAs in the Malignant Transformation of Sinonasal Inverted Papilloma, ASHNO, 2013.3.20-3.22,

Radisson Blu Hotel (Cebu city,
Philippines)

3. **畠山博充**：頭頸部および食道扁平上皮癌の網羅的ゲノム・プロテオーム解析，第64回日本気管食道科学会，2012.11.8-9，ホテル日航東京（東京）(招待講演)
4. **畠山博充**：分子標的薬の適正使用における感受性マーカーの開発，第36回日本頭頸部癌学会，2012.6.7-6.8，島根県民会館（松江市）(招待講演)

6. 研究組織

(1)研究代表者

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

(2)研究分担者

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

(3)連携研究者

なし