

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 18 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592954

研究課題名(和文) 口腔癌のセツキシマブ感受性とKRAS、BRAF、PIK3CA変異の解析

研究課題名(英文) Analysis of sensitivity of oral cancer to Cetuximab and gene modification of KRAS, BRAF and PIK3CA in OSCC.

研究代表者

篠原 文明 (SHINOHARA, FUMIAKI)

東北大学・歯学研究科(研究院)・大学院非常勤講師

研究者番号：80400258

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、口腔扁平上皮癌細胞株を用いて、抗癌剤(5FU、CDDP)と上皮増殖因子受容体(EGFR)の分子標的治療薬(セツキシマブ)を併用した口腔癌治療法の検討と、腫瘍細胞に発現する特定酵素(群)がIFNG分解責任酵素として作用し腫瘍免疫を減弱する腫瘍免疫回避メカニズムについて解析した。セツキシマブは主にAktを阻害し、オートファジーの抑制により5FUのアポトーシスを増強させることが示唆された。各細胞株の培養系においてIFNGの濃度減少が見られ、TACEのmRNA発現に細胞間の差がみられた。質量分析からIFNG分解にTACEや他の酵素、KRAS遺伝子の関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we evaluated the combination chemotherapy for oral cancer using anti-cancer agents (5-FU and CDDP) and the molecular target reagent, Cetuximab which is an antagonist of epidermal growth factor receptor (EGFR). We also analyzed the mechanism how the enzymes, which express on tumor cells and play as an IFNG degrading enzyme, affect circumvention of tumor immunity. Our results suggest that Cetuximab inhibits Akt and autophagy resulting in the up-regulation of apoptosis induced by 5-FU. IFNG concentration was decreased in the culture supernatant of each cell line and the difference of mRNA expression of TACE was observed among cell lines. Mass spectrometry analysis indicated that TACE, other enzymes and KRAS gene were involved in the degradation of IFNG.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学 外科系歯学

キーワード：口腔癌 上皮増殖因子 分子標的薬 インターフェロンガンマ

## 1. 研究開始当初の背景

口腔癌を含めた消化器癌は、癌発生においてさまざまな要因が関与している。食品添加物、喫煙、飲酒、大気汚染など、外因性因子や環境因子により genetic、epigenetic な遺伝子異常がおこると考えられている。これらの遺伝子異常がどのように口腔癌の発癌メカニズムに影響を与えるのかを解明することは、発癌予防の最大の方策と考えられる。遺伝子異常は、発癌メカニズムのみならず、癌の薬剤感受性にも関与しており、口腔癌の化学療法において重要である。口腔癌に対する化学療法として、シスプラチン、カルボプラチン、5-FU、パクリタキセル、ドセタキセル等、様々な抗癌剤が用いられ、これらの有用性が報告されている。しかし、これらの薬剤についての耐性癌の出現、局所再発の問題はいまだに解決されていない。

口腔癌の治療として、化学療法、手術療法、放射線療法、あるいはそれらのコンビネーションなどが併用されているが、その治療効果には未だ課題が多く、現在のところ有効な治療法が確立していない。その理由の一つに癌細胞による腫瘍免疫回避メカニズムが挙げられる。

腫瘍免疫において、インターフェロン (IFNG) は腫瘍組織局所に浸潤した NK 細胞から分泌され細胞傷害性 T 細胞活性化を惹起し腫瘍細胞殺傷を誘導するなど抗腫瘍免疫において重要なサイトカインである。また IFNG はそれ自身が抗腫瘍活性を発揮することや、インターフェロン- との腫瘍細胞に対する直接的な増殖抑制効果を増強する作用を有することから、IFNG の局所濃度を増加させることで抗腫瘍活性を得る治療法の可能性が検討されている。

近年、従来の DNA, RNA を標的とする抗癌剤と異なり、EGFR (epidermal growth factor receptor) など、細胞の増殖シグナルにかかわるタンパク質を標的とした新しい分子標的薬剤が数多く開発されている。EGFR は口腔癌を含め多くの癌で過剰発現しており、癌の増殖・血管新生・転移に関連している。EGFR を標的とする薬剤の一つにセツキシマブ (Cetuximab) がある。セツキシマブは、キメラ化モノクローナル抗体であり、EGFR のリガンド部位にアンタゴニストとして作用し、EGFR 下流のシグナル伝達を阻害剤する。現在、大腸癌での有効性が認められ、欧米ではすでに臨床応用が進んでいる。大腸癌において、EGFR 下流の分子シグナルの

KRAS、BRAF、PIK3CA の変異が、EGFR 阻害剤の薬剤効率に影響を与えることが知られている。

一方、口腔癌に関しては、米食品医薬品局 (FDA) が 2006 年 3 月 1 日、頭頸部の扁平細胞がん (SCCHN) のセツキシマブと放射線治療の併用療法を承認し、通常の化学療法で治療不可能な頭頸部がんが転移した患者に対するセツキシマブの単剤療法も、同時に承認されている。しかし、日本においては、いまだ認可されていない。その理由として、頭頸部腫瘍に対する基礎研究データが大腸癌に比較して少なく、奏効率や、他の抗癌剤との併用効果、抗腫瘍メカニズムに関して不明な点が多いことがあげられる。しかし、口腔癌は大腸癌と同様に EGFR を高発現しているため、セツキシマブの抗腫瘍効果の可能性は十分に期待できる。日本におけるセツキシマブの口腔癌治療への応用のためには、口腔癌治療にセツキシマブが有効であるかどうか、基礎的解析が急務である。

本研究では、口腔癌の EGFR 下流の分子シグナル KRAS、BRAF、PIK3CA 変異と EGFR 阻害剤の感受性について検討し、EGFR 阻害剤の口腔癌治療への応用、また腫瘍細胞に発現する特定酵素 (群) が IFNG 分解責任酵素として作用し、腫瘍細胞自身による IFNG 活性の阻止が腫瘍免疫を減弱するという仮説を基に、腫瘍免疫回避メカニズムについて検討する。

## 2. 研究の目的

本研究では、分子標的治療薬 (セツキシマブ [EGFR 阻害薬]) の口腔癌治療応用を目指した基礎的検討を目的とする。口腔癌における EGFR シグナルに関与する遺伝子 (KRAS、BRAF、PIK3CA など) の変異、エピジェネティック異常 (メチル化、アセチル化の異常)、口腔癌細胞における新規 IFNG 分解責任酵素の同定と IFNG 阻害メカニズムの解析、同定された IFNG 分解責任酵素の阻害方法の開発と口腔癌化学療法への応用を検討する。

- 1) 口腔癌細胞株 (HSC-2, 3, 4, SAS) の KRAS、BRAF、PIK3CA の遺伝子変異の有無を検討
- 2) エピジェネティクス変異の検討 (メチル化、アセチル化異常の検討)
- 3) それぞれの遺伝子変異の有無とセツキシマブの効果を比較検討
- 4) セツキシマブ単独あるいは、抗癌剤 (シ

スプラチン、5-FU、タキソテール)またはエピジェネティクス制御剤

(Zebularine, SAHA) と併用し、細胞株、抗癌剤、各種阻害剤の組み合わせの違いによる抗腫瘍効果を比較検討

5) 遺伝子変異と薬剤効率に関連性が確認された場合、正常遺伝子を導入した株と、変異株とで、その薬剤効率を比較検討

6) 以上の結果を基にセツキシマブと他の薬剤の効果的な併用法を *in vitro* で確立

7) ヒト口腔癌細胞の移植が可能な SCID マウスに、癌細胞株を移植し、*in vitro* のプロトコルを参考に *in vivo* での移植腫瘍細胞の増殖に対する併用効果を検討

### 3. 研究の方法

1) 口腔癌細胞株(HSC-2,3,4,SAS)のKARS, BRAF、PIK3CAの遺伝子変異の検討。細胞株は、口腔扁平上皮癌細胞株(HSC-2, -3, -4)と舌癌由来細胞株(SAS)を用い、Microsatellite Instability (MSI) analysis や Pyrosequencing assay を用いて KRAS、BRAF 等の遺伝子変異、DNA methylation の解析を行う。

2) エピジェネティクス変異の検討(メチル化異常の検討)

MethylLight assay を用いて分子生物学的な異常を検討する。

3) 抗腫瘍効果の検討

セツキシマブ単独あるいは、抗癌剤、エピジェネティクス制御剤、オートファジー誘導剤(ラパマイシン)またはオートファジー阻害剤(3MA、クロロキン)と併用し、細胞株、抗癌剤、各種阻害剤の組み合わせの違いによる抗腫瘍効果を比較検討する。抗癌剤は、シスプラチン、5-FU、タキソテール、エトポシド、ドキシソルピシンを使用する。エピジェネティクス制御剤は以下を用いる。ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤(HDAC 阻害剤): NaB, SAHA, MS-275 を使用する。DNA メチル化酵素阻害剤(DNMT 阻害剤): Decitabine, Zebularine を使用する。

各種薬剤の併用による抗腫瘍効果を観察し、併用効果のみられる至適条件(各種薬剤濃度、組み合わせ、投与時間)を検討する。細胞毒性は MTT assay, アポトーシスは TUNEL 法、オートファジーは LC3 をマーカーとして Western blot 法で解析する。

4) *In vitro* における ADAM ファミリーの評価

ヒト口腔扁平上皮癌細胞株(HSC-2, -3, -4)や舌癌由来細胞株(SAS)等を用いて TACE を含む ADAM ファミリーの発現の相違と、IFNG 分解酵素の同定を行う。IFNG を分解する酵素は IFNG と結合する性質を利用して、各種細胞からの lysate から、タグを付加したリコンビナント IFNG とタグ結合レジンビーズを用いて pull-down assay を行い、IFNG と結合するタンパクを回収する。これを SDS-PAGE gel にて展開後、質量分析法にてタンパクの同定を行い、それらの中から IFNG 分解に関わる酵素を同定する。IFNG 分解酵素(TNF-alpha converting enzyme ;TACE)の阻害には、低分子阻害剤(TAPI2)、および TACE の中和抗体(抗ヒト TACE 中和抗体;a-TACE abs)を使用する。

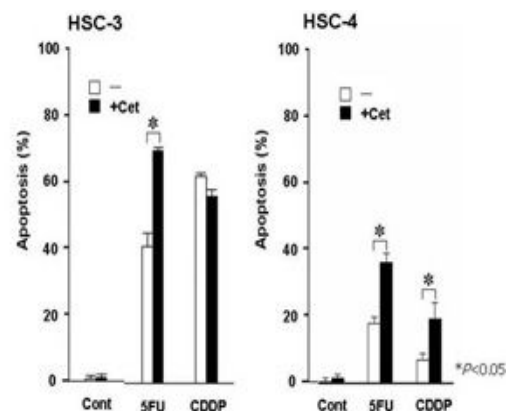
5) マウス腫瘍モデル(異種腫瘍モデル)腫瘍転移モデルの確立

SCID マウスに、ヒト口腔扁平上皮癌細胞株(HSC-2, HSC-3, HSC-4, SAS 細胞;  $1 \times 10^6$  cells)をそれぞれ側腹部に皮下注射後、腫瘍が約1週間で  $100 \text{ mm}^3$ を異種のヒト担癌マウスとして使用する。

各種抗癌剤またはエピジェネティクス制御剤と併用し、細胞株、抗癌剤、各種阻害剤の組み合わせの違いによる抗腫瘍効果を比較検討する。また、同定された IFNG 分解責任酵素に対する中和抗体を腫瘍モデルマウスに注射しその効果を検討する。その腫瘍組織で標本を作成し、組織内における同定した IFNG 分解責任酵素の発現量を確認する。

### 4. 研究成果

抗癌剤 5FU, CDDP にセツキシマブを併用し、アポトーシス誘導効果について検討致したところ、HSC-3, 4 共にセツキシマブと 5FU, の併用処理でアポトーシスの増強が観察された。



このアポトーシス増強 (TUNEL 染色) について EGFR の pathway に関わる分子を調べたところ、PI3K インヒビターとの併用でセツキシマブ併用時と同様な 5FU のアポトーシス増強効果が観察される一方、ERK inhibitor では 5FU のアポトーシス増強が認められなかった。このことから、セツキシマブは主に Akt を阻害していることが示唆され、Western blot 法においても Akt のリン酸化の抑制が観察された。アポトーシス抑制因子である IAP family (Bcl2, BclXL) は大きな変化が認められなかった。EGFR とオートファジー (LC3) の関与を調べたところ、5-FU のアポトーシス誘導効果は、オートファジーによる抑制がみられ、セツキシマブが何らかの機構でオートファジーを抑制することにより 5FU のアポトーシスを増強させることが示唆された。

腫瘍局所に浸潤した NK 細胞からの IFNG が、腫瘍細胞内の特定の酵素によって切断分解される機構が存在することから、IFNG 分解責任酵素同定と効果を検討した。HSC-3 細胞からの lysate から、タグを付加した rIFNG とタグ結合レジンビーズを用いて IFNG と結合するタンパクを回収した。これを SDS-PAGE にて展開後、質量分析法にてタンパクの同定を行なった。HSC-3 細胞において、IFNG と結合する複数のタンパク (peroxiredoxin、Hornerin 他) が候補に上がった。今回同定されたタンパクが、腫瘍のアポトーシスを誘導する活性酸素を分解、上皮細胞の再生分化あるいは細胞増殖に関連することから、これが IFNG と結合し何らかの作用することにより、抗腫瘍効果を得ることが示唆された。

HSC-2、HSC-3、HSC-4、SAS および A549 を用い、IFNG 分解責任酵素の解析を行なった。すなわち各種培養細胞に TACE の低分子阻害剤 (TAPI2) およびその中和抗体 (α-TACE abs) を加え、IFNG 濃度変化 (IFNG 分解) 細胞の viability や増殖能、TACE の mRNA 発現を解析した。またそれぞれの細胞株をマイクロアレイにて mRNA 発現比較を行なった。

各腫瘍細胞株の培養系において IFNG の濃度減少が見られた。各細胞の TACE の mRNA 発現には差がみられ、IFNG 濃度が低下した細胞株では TACE の発現が高かった。また TACE の低分子阻害剤およびその中和抗体を添加したところ、IFNG の濃度上昇に各細胞株で差がみられた。マイクロアレイを用い mRNA 発現比較を行ったところ、IFNG 分解に TACE 以外の他の酵素が関わっている可能性、また、EGFR 下流の KRAS 遺伝子の関与が示唆

された。

口腔癌の免疫回避メカニズムの一つとして、腫瘍細胞自身が産生する酵素、特に IFNG 活性阻害により腫瘍免疫の減弱される可能性が認められた。またその酵素は腫瘍細胞それぞれで感受性が異なり、その発現量と予後不良度が相関しているという報告もある。このことから本研究の IFNG 分解責任酵素の同定と解析は、腫瘍免疫回避を阻止する新規の抗腫瘍療法の開発に期待される。

## 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 2 件)

HIROYUKI KANZAKI, FUMIAKI SHINOHARA, MIKIHITO KAJIYA, TETSUYA KODAMA.  
The Keap1/Nrf2 Axis Plays A Role In Osteoclast Differentiation By Regulating Intracellular ROS Signaling.  
Journal of Biological Chemistry (査読有) 2013; 288(32):23009-20  
DOI:10.1074/jbc.M113.478545

MAIKO SUZUKI, MANABU ENDO, FUMIAKI SHINOHARA, SEISHI ECHIGO, HIDEMI RIKIISHI.  
Rapamycin suppresses ROS-dependent apoptosis caused by selenomethionine in A549 lung carcinoma cells.  
Cancer Chemother Pharmacol (査読有) 2011 May; 67(5): 1129-36.  
DOI:10.1007/s00280-010-1417-7

[学会発表](計 3 件)

菅崎弘幸、篠原文明、加治屋幹人、小玉哲也  
Nrf2 を介した抗酸化ストレス酵素群発現は破骨細胞分化を負に制御する  
第 35 回東北骨代謝・骨粗鬆症研究会 仙台 2014 年 2 月 1 日

遠藤学、篠原文明、他  
DNA メチル化酵素阻害剤による癌血管新生の抑制  
第 58 回 日本口腔外科学会 総会 福岡 2013 年 10 月 11 日~13 日

遠藤学、篠原文明、他  
ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤による CDDP のアポトーシス増強効果の解析  
第 57 回 日本口腔外科学会 総会 横浜 2012 年 10 月 19 日~21 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

篠原 文明 (SHINOHARA FUMIAKI)  
東北大学・歯学研究科・大学院非常勤講師  
研究者番号：80400258

(2) 研究分担者

宮下 仁 (MIYASITA HITOSHI)  
東北大学・歯学研究科・助教  
研究者番号：70372323