

平成 27 年 5 月 12 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592587

研究課題名(和文) 頭頸部癌におけるEGFRパスウェイ分子の遺伝子変異とタンパク質立体構造変化

研究課題名(英文) Gene mutation and 3D-conformation of proteins related to EGFR pathway in head and neck cancer

研究代表者

本間 明宏 (Homma, Akihiro)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30312359

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：手術、生検で得られた頭頸部正常扁平上皮および癌組織からのDNA, mRNA, タンパク質をそれぞれ抽出した。タンパク質の立体構造および薬剤や他のタンパク質との相互作用をアミノ酸残基レベルや原子レベルで解析することができた。

上皮成長因子受容体(epidermal growth factor receptor: EGFR)のリガンドであるHB-EGFはセツキシマブ高感受性頭頸部癌細胞株よりも耐性株に多く出現していた。HB-EGFの増加はEGFRパスウェイを活性化させ、セツキシマブの効果を減弱させることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：DNA, mRNA and protein materials were extracted from normal mucosa and tissue of head and neck squamous cell carcinoma obtained from surgical specimen or biopsied tissue. 3D-conformation of the proteins interactions between drugs and other proteins were analyzed by amino-acid residue sequence and by atomic-level structure.

HB-EGF, a ligand of epidermal growth factor receptor (EGFR), has contained more in the cetuximab-sensitive head and cancer cell line than in the cetuximab-resistant cell line. The increase of HB-EGF activated the EGFR pathway and reduced the efficacy of cetuximab.

研究分野：頭頸部癌

キーワード：頭頸部癌 gene mutation EGFR pathway

1. 研究開始当初の背景

頭頸部癌は全癌症例中6%を占め、全癌中6番目に多い疾患である。本邦においては発癌因子となる喫煙率の低下があるものの、社会全体の高齢化およびヒトパピローウイルス (HPV) による中咽頭癌発生数の増加などのために今後も患者数の増加が予想される。頭頸部癌治療においては、拡大切除・再建手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されてきているが、いまだに大きな改善の余地が残されていると言わざるを得ないのが現状である。

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、すでにそのモノクローナル抗体である Cetuximab 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 Gefitinib の効果は EGFR の特異的な mutation によることが一昨年 Science、Lancet 誌に報告されている。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が、頭頸部癌でもこの遺伝子変化は重要と考えられ当教室および他施設において vIII 型の mutation の有無を解析したが、頭頸部癌においてこの変化は稀であった。しかし他の上皮性癌においては EGFR パスウェイの下流にある分子の遺伝子異常が癌組織の増殖さらに分子標的治療の感受性に関与することが報告されてきた。

2. 研究の目的

本研究では頭頸部扁平上皮癌症例の凍結標本から抽出した DNA とタンパク質を用いて、実際の頭頸部癌臨床検体約50例における SNP アレイを行い、EGFR パスウェイの代表的な分子についての mutation のデータを収集する。このデータをバイオインフォマティクスアプローチにて統計解析し、遺伝子異常を臨床背景それぞれの面でクラスタリングを行う。当該分子についてはタンパク構造解析を行い、シグナル伝達に対する影響を検討する。また頭頸部癌細胞株を用いて臨床検体同様の遺伝子変異を導入し、分子標的薬に対する感受性の変化を確認する。

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。これをヘマトキシリン・エオジン染色後、病理医により光学顕微鏡下にその組織型を確認する。さらに連続切片をヘマトキシリン染色のみ

を行い 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) SNP アレイ発現解析

抽出した DNA は SNParray 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変異に合わせて層別化する。

(3) 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、当該する遺伝子変異を組み込む。これに伴う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。さらにはフローサイトメトリーを用いて細胞周期などに与える影響等の機能を評価する。

(4) 遺伝子変異タンパク質の合成

上記の分析において重要と考えられる遺伝子異常を持つ分子は大腸菌を用いてリコンビナントのタンパク質合成を行う。

(5) 核磁気共鳴装置によるタンパク質立体構造の解明 (25年度)

立体構造情報を知る手段として NMR 法を用いる。溶液状態における立体構造はもとより、薬剤や他のタンパク質との相互作用をアミノ酸残基レベルや原子レベルで解析する。

4. 研究成果

頭頸部癌の治療におけるブレイクスルーとして上皮成長因子受容体 (epidermal growth factor receptor: EGFR) をターゲットとした分子標的薬の臨床応用が注目されている。

EGFR は膜貫通型の糖タンパク質である ErbB/HER ファミリーの一員である。細胞外に受容体を持ち、ここにリガンドがつくことによってチロシンリン酸化が起こり、パスウェイが活性化され下流へとシグナル伝達が行われる。EGFR は広範囲の細胞に分布しており、上皮系細胞だけではなく、間葉系細胞、神経系細胞にも分布が知られている。上皮系細胞では重要な成長因子となっており、とくに上皮系癌細胞の増殖能、浸潤能、血管増生、また転移を促進させることが知られている。これらの背景から EGFR パスウェイをターゲットとした分子標的薬の開発が始まった。これまで肺癌などにおいてはターゲットとなる EGFR やその下流にある k-ras の変異が EGFR 標的治療の効果に影響するとされているが、頭頸部癌においては、k-ras 変異はまれであり、感受性マーカーとはなっていない。

本研究では、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し、ヘマトキシリン・エオジン染色後、病理医により光学顕微鏡下にその組織型を確認し、さらに連続切片をヘマトキシリン染色し、Laser microdissection 法を用いて当該組織

のみを採取し、手術、生検で得られた頭頸部正常扁平上皮および癌組織からの DNA, mRNA, タンパク質をそれぞれ抽出した。一方、分析において重要と考えられる遺伝子異常を持つ分子に関して、大腸菌を用いてリコンビナントのタンパク質合成を行った。また、タンパク質の立体構造および薬剤や他のタンパク質との相互作用をアミノ酸残基レベルや原子レベルで解析し、その結果の分析を行っている。

セツキシマブはすでに頭頸部癌において保険適応になり広く使用されているが、長期投与において耐性化することも明らかになってきた。EGFR パスウェイのスイッチとも言えるリガンドの発現は、重要な予後因子とされている。

今回、セツキシマブ高感受性頭頸部癌細胞株 SCC1 とその耐性クローンである 1Cc8 を用いて、代表的な EGFR リガンドのである EGF、HB-EGF、Amphiregulin、TGF- α の発現とセツキシマブ耐性への影響を比較した。その結果、HB-EGF は耐性株に多く出現していた。TGF- α はセツキシマブ投与前では変わらないものの、投与後に耐性株では増加していた。さらに耐性株においては SHRNA にて HB-EGF をノックアウトしたところ、セツキシマブに強い感受性を示すようになった。また、EGFR パスウェイの活性に関して、セツキシマブ投与下においても HB-EGF は EGFR の活性化を引き起こし、さらにその下流のパスウェイの活性化が確認された。

親株と耐性株のマイクロ RNA の発現も網羅的に解析した。RT-PCR による定量化を行い解析した結果、マイクロ RNA212 はアレイ上の 300 種を超えるマイクロ RNA の中で親株に比べて耐性株でもっとも低い比率を示し、27 倍以上の差があった。マイクロ RNA212 はコンピュータでの解析でも HB-EGF をターゲットとしていることが示唆された。

以上より、セツキシマブの耐性化にはリガンドの発現が強く影響し、その中でも HB-EGF の増加は EGFR パスウェイを活性化させ、セツキシマブの効果を減弱させることが明らかとなった。マイクロ RNA 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。

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**, Sakashita T, **Hatakeyama H**, Kano S, Mizumachi T, Nakamaru Y, Yoshida D, Onimaru R, Tsuchiya K, Yasuda K, Shirato H, Fukuda S. The efficacy of supersensitive intra-arterial infusion with

concomitant radiotherapy for adenoid cystic carcinoma of the head and neck. *Acta Otolaryngol.* 2015 Apr 30;1-5. Epub ahead of print. 査読あり

doi:10.3109/00016489.2015.1040171

2. **Homma A**, Nakamaru Y, Sakashita T, Onimaru R, Terasaka S, Tsuchiya K, Yoshida D, Yasuda K, **Hatakeyama H**, Furusawa J, Mizumachi T, Kano S, Shirato H, Fukuda S. Management for squamous cell carcinoma of the nasal cavity and ethmoid sinus: A single institution experience. *Auris Nasus Larynx.* 2015 Mar 3. pii:S0385-8146(15)00029-2. [Epub ahead of print] 査読あり
doi: 10.1016/j.anl.2015.02.005.
3. **Hatakeyama H**, Mizumachi T, Sakashita T, Kano S, **Homma A**, Fukuda S. Epithelial-mesenchymal transition in human papillomavirus-positive and -negative oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep.* 2014 Dec;32(6):2673-2679. 査読あり, doi: 10.3892/or.2014.3509.
4. **Homma A**, Nakamaru Y, **Hatakeyama H**, Mizumachi T, Kano S, Furusawa J, Sakashita T, Shichinohe T, Ebihara Y, Hirano S, Furukawa H, Hayashi T, Yamamoto Y, Fukuda S. Early and long-term morbidity after minimally invasive total laryngo-pharyngo-esophagectomy with gastric pull-up reconstruction via thoracoscopy, laparoscopy and cervical incision. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* (2014 Dec 5. Epub ahead of print). 査読あり, Doi:10.1007/s00405-014-3420-9.
5. **Homma A**, Hayashi R, Matsuura K, Kato K, Kawabata K, Monden N, Hasegawa Y, Onitsuka T, Fujimoto Y, Iwae S, Okami K,

- Matsuzuka T, Yoshino K, Nibu K, Kato T, Nishino H, Asakage T, Ota I, Kitamura M, Kubota A, Ueda T, Ikebuchi K, Watanabe A, Fujii M. Lymph node metastasis in T4 maxillary sinus squamous cell carcinoma: Incidence and treatment outcome. *AnnSurgOncol* . 2014May;21(5):1706-1710. 査読あり,doi: 10.1245/s10434-014-3544-6.
6. Sato H, Hatanaka KC, Hatanaka Y, **Hatakeyama H**, Hashimoto A, Matsuno Y, Fukuda S, Sabe H. High level expression of AMAP1 protein correlates with poor prognosis and survival after surgery of head and neck squamous cell carcinoma patients. *Cell Commun Signal*. 2014 Mar 12;12:17. 査読あり, doi: 10.1186/1478-811X-12-17.
 7. 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, 査読あり, doi:10.3109/00016489.2013.79528
 8. **Homma A**, Sakashita T, Yoshida D, Onimaru R, Tsuchiya K, Suzuki F, Yasuda K, **Hatakeyama H**, Furusawa J, Mizumachi T, Kano S, Inamura N, Taki S, Shirato H, Fukuda S : Superselective intra-arterial cisplatin infusion and concomitant radiotherapy for maxillary sinus cancer. *Br J Cancer* 109: 2980-2986, 2013, 査読あり, doi: 10.1038/bjc.2013.663.
 9. Kano S, **Homma A**, Hayashi R, Kawabata K, Yoshino K, Iwae S, Hasegawa Y, Nibu K, Kato T, Shiga K, Matsuura K, Monden N, Fujii M : Salvage surgery for recurrent oropharyngeal cancer after chemoradiotherapy . *Int J Clin Oncol* **18**: 817-823, 2012, 査読あり, doi: 10.1007/s10147-012-0449-x.
 10. 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, 査読あり, doi: 10.1007/s10147-012-0469-6
 11. Sakashita T, **Homma A**, Oridate N, Suzuki S, **Hatakeyama H**, Kano S, Mizumachi T, Yoshida D, Fujima N, Fukuda S : Platinum concentration in sentinel lymph nodes after preoperative intra-arterial cisplatin chemotherapy targeting primary tongue cancer. *Acta Otolaryngol* 132: 1121-1125, 2012, 査読あり, doi:10.3109/00016489.2012.680494
 12. **Homma A**, Suzuki F, **Hatakeyama H**, Sakashita T, Yoshida D, Tsuchiya K, Onimaru R, Oridate N, Shirato H, Fukuda S : Rapid superselective high-dose cisplatin infusion with concomitant radiotherapy for squamous cell carcinoma of the nasal vestibule: a report of two cases. *Int Canc Conf J* 1: 215-219, 2012, 査読あり, doi: 10.1007/s13691-012-0044-z
- 〔学会発表〕(計8件)
1. **Homma A**, Mizumachi T, Sakashita T, **Hatakeyama H**, Kano S, Yoshida D, Onimaru R, Tsuchiya K, and Fukuda S: Rapid superselective intra-arterial infusion with concomitant radiotherapy for adenoid cystic carcinoma of the head and neck. 13thAsia-OceaniaOtorhinolaryngology-head and neck surgery congress, March 20, 2015, Taipei, Taiwan

2. **Homma A**, Nakamaru Y, **Hatakeyama H**, Mizumachi T, Kano S, Furusawa J, Sakashita T, Shichinohe T, Ebihara Y, Hirano S, Furukawa H, Hayashi T, Yamamoto Y, Fukuda S: Early and long-term morbidity after total laryngo-pharyngo-esophagectomy with gastric pull-up reconstruction. 5th World Congress of International Federation of Head and Neck Oncologic Societies & Annual Meeting of the American Head and Neck Society: July 26-30, 2014, New York City, USA
 3. **Homma A**, **Hatakeyama H**, Mizumachi T, Jun Furusawa, Kano S, Sakashita T, Fukuda S: Lymph node metastasis in Burns space. 18th World congress joint meeting of the world association for bronchology and interventional pulmonology & the international bronchoesophagology society. April 14, 2014, 京都国際会館 (京都府・京都市)
 4. **Homma A**, Sakashita T, **Hatakeyama H**, Furusawa J, Mizumachi T, Kano S, Inamura N, Taki S, Suzuki F, Yoshida D, Onimaru R, Tsuchiya K, Yasuda K, Nishikawa N, Shirato H, Fukuda F: The efficacy of superselective intra-arterial infusion of cisplatin and concomitant radiotherapy for patients with locally advanced maxillary sinus cancer: a single institution experience. 15th Korea-Japan Joint Meeting of Otorhinolaryngology - Head and Neck Surgery, April 3-5, 2014, Seoul, Korea
 5. **Homma A**, Kano S, Hayashi R, Kawabata K, Yoshino K, Iwae S, Hasegawa Y, Nibu K, Kato T, Shiga K, Matsuura K, Monden N, Fujii M : < Symposium 4 > Updates in oral and oropharyngeal cancers 「 Surgery versus Concomitant Chemoradiotherapy: A Matched-Pair Analysis in Patients with Advanced Oropharyngeal Cancer 」 . The 12th Taiwan-Japan Conference on Otolaryngology Head and Neck Surgery. Taipei, Taiwan, December 5-7, 2013
 6. **Homma A**, Fukuda S : Cervical lymph node metastasis of head and neck squamous carcinoma after chemoradiotherapy. 20th IFOS World Congress. Seoul, Korea, June 1-5, 2013
 7. **Homma A**, Oridate N, Sakashita T, Suzuki S, **Hatakeyama H**, Kano S, Mizumachi T, Yoshida D, Onimaru R, Tsuchiya K, Yasuda K, Shirato H, Fukuda S : The efficacy of superselective intra-arterial infusion with concomitant radiotherapy for adenoid cystic carcinoma of the head and neck. 8th International Conference on Head & Neck Cancer. Toronto, Canada, July 21-25, 2012
 8. **Homma A**, Oridate N, Sakashita T, Yoshida D, Onimaru R, Tsuchiya K, **Hatakeyama H**, Mizumachi T, Kano S, Shirato H, Fukuda S: < Symposium > Head and Neck Cancer 「 Superselective intra-arterial chemotherapy with concurrent radiotherapy for sinonasal malignant tumors 」 . The 14th Japan-Korea Joint Meeting of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery. April 12-14, 2012, 京都ホテルオークラ (京都府・京都市)
- 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 (HATAKEYMA HIROMITSU)
北海道大学・北海道大学病院・助教
研究者番号 : 10455652