

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463069

研究課題名(和文) 口腔癌のBRAF変異スクリーニングに基づくセツキシマブ・BRAF阻害療法の開発

研究課題名(英文) The mutation effect of Ras-Raf-MAPK and PI3K/Akt pathway for chemosensitivity of cetuximab treatment in the oral cancer

研究代表者

此内 浩信 (Konouchi, Hironobu)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：20294423

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：セツキシマブは、頭頸部癌のEGFR標的抗癌剤である。申請者は、EGFR伝達経路のBRAF阻害によるセツキシマブの抗腫瘍増強効果を計画し、ヒト口腔癌由来細胞株9株を対象に、BRAF, KRAS, NRAS, PIK3CA遺伝子変異解析した。BRAF変異はなく、2株にてPIK3CA変異を認めた。PIK3CA変異を有し、PETにてEGFR著高発現株担癌マウスはセツキシマブ奏効しなかった。これはPIK3CA 遺伝子E542K変異に由来すると考えられた。今回、口腔癌におけるセツキシマブ奏効を妨げるEGFR伝達経路としてPI3K/Akt経路を対象とすればセツキシマブ感受性増強を期待できることを示唆した。

研究成果の概要(英文)：Cetuximab is a monoclonal antibody targeting epidermal growth factor receptor (EGFR), and is effective for tumors with overexpression of EGFR. It was originally used for metastatic colorectal cancer, but since the overexpression of EGFR is seen in 80-100% of head and neck cancer (HNC), antitumor effect is also expected in HNC. In this study, we have assessed the antitumor effect of Cetuximab treatment using 9 oral cancer cell lines, with regard to BRAF, KRAS, NRAS, PIK3CA mutation status. We found no mutation in the mutation hot spots of BRAF gene, KRAS gene, NRAS gene. We also evaluated 5 well-known hot spots of PIK3CA gene, E542K and H1047R mutations of PIK3CA gene were observed in Ca9-22 and HSG cells. BALB/c-nu mouse transplanted with PIK3CA mutated HSG cells showed in lower sensitivity for Cetuximab. The results suggest that E542K mutation of PIK3CA could be used as a screening test to evaluate the sensitivity of HNC to Cetuximab.

研究分野：歯科放射線学

キーワード：口腔癌 セツキシマブ アービタックス PET BRAF KRAS NRAS PIK3CA

1. 研究開始当初の背景

セツキシマブ(商品名アービタックス®)は、上皮成長因子受容体(Epidermal growth factor receptor:EGFR)を標的とするモノクローナル抗体で、2012年に頭頸部癌の分子標的抗癌剤として厚生労働省の製造販売承認を受け、現在、臨床の現場でその効果を期待されている。

EGFRはチロシンキナーゼ受容体であり、癌組織の増殖や浸潤、転移に強く関与し、様々な癌で高発現である。リガンドが結合し、下流のシグナル伝達経路が活性化されるが、その伝達経路は複雑多様である為、アービタックスによるEGFR阻害効果が発揮されない事例が問題となっていた。

近年、悪性黒色腫、大腸癌を対象として、EGFR伝達経路の一つであるRas-Raf-MAPK経路がEGFR阻害療法の奏効性に関与するとして注目され、その経路の構成要素であるBRAFタンパクが重要な役割を持つのではないかとの報告がある。BRAFはEGFR下流に位置するセリンスレオニンキナーゼで、遺伝子変異がある場合、活性化してRASと会合し、下流のMEKをリン酸化して活性化させ、制御不能の細胞増殖を惹き起こす。この場合、セツキシマブ(アービタックス®)で上流のEGFRを阻害しても、下流にシグナルが伝達され細胞増殖を止めることができない。転移性大腸癌での報告では、BRAF遺伝子に変異があり、活性化された症例では、セツキシマブが奏効しない可能性が明らかにされた。

そこで申請者は、BRAFタンパクに注目し、BRAF活性を指標としてアービタックスの奏効スクリーニング出来ないか、また、BRAF活性を阻害することで、口腔癌に対するアービタックスの抗腫瘍効果を増強出来ないかとの着想に至った。

2. 研究の目的

BRAF遺伝子変異による活性化については、大腸癌、悪性黒色腫での報告がその殆どを占め

る。特に米国においてBRAF遺伝子変異への関心は高く、BRAF阻害薬が、BRAF遺伝子変異を有する悪性黒色腫に対する治療薬としてFDAにより承認され、期待されている。また、大腸癌においては、KRAS、BRAF等の遺伝子変異が抗EGFR療法への予後因子として利用できるとの報告もある。

口腔癌でのBRAFに関する報告は殆ど無い為、口腔癌での抗EGFR療法を促進する、大変有用な課題であると考えられた。

申請者は、BRAF活性を指標としてアービタックスの奏効スクリーニング出来ないか、また、BRAF活性を阻害し、口腔癌に対するアービタックスの抗腫瘍効果を増強出来ないかとの着想に至った。口腔癌担癌マウスモデルを対象にBRAF阻害療法を併用し、アービタックス奏効を増強する新規口腔癌化学療法を確立することを当初の目標とした。

3. 研究の方法

(1) ヒト口腔癌由来細胞株の選定

ヒト口腔癌由来細胞株を培養し、EGFR伝達経路の一つであるRas-Raf-MAPK経路、PI3K/Akt経路を構成する遺伝子群に生じる遺伝子変異解析に供した。9細胞株とし、その内訳は、HSC4、HSC3、HSC2、SAS、Hep2、HO-1-u-1、Ca9-22、HSG、HSQ-89である。

(2) Luminex®法による遺伝子変異解析

上記9細胞株より抽出したDNAを検体としてGENOSEARCH™ Mu-PACK™ならびにMEBGEN™ KRAS遺伝子変異検出キット(株式会社ファルコバイオシステムズ)を用いて遺伝子変異を検出した。

変異検索対象遺伝子は、上皮増殖因子受容体(EGFR)のシグナル伝達の中で、主要な癌発症メカニズムに関連しているBRAF、KRAS、NRAS、PIK3CAの4遺伝子についてである。これらの遺伝子変異は、治療薬の効果予測や予後予測のための新たなバイオマ

ーカーとして注目されている。

BRAF, KRAS, NRAS, PIK3CA 遺伝子について既知の 37 箇所の 1 塩基変異を解析した。Luminex® 法は複数の特異的なプライマーを用いてマルチプレックス PCR を行い、高感度なタイピング (検出感度: 約 5%~10%) を行うことができる手法である。

検索 GENOSEARCH Mu-PACK 対象遺伝子変異
BRAF: V600E, V600K
PIK3CA: E542K, E545K, Q546K, H1047R, H1047L
NRAS: G12S, G12C, G12R, G12D, G12V, G12A
G13S, G13C, G13R, G13D, G13V, G13A, Q61K, Q61E, Q61L, Q61P, Q61R, Q61H

KRAS: Q61K, Q61E, Q61L, Q61P, Q61R, Q61H, A146T, A146S, A146P, A146E, A146V, A146G

検索 MEBGEN KRAS コドン 12, 13 対象変異
KRAS: G12S, G12C, G12R, G12D, G12V, G12A
G13S, G13C, G13R, G13D, G13V, G13A

(3) 分子イメージングによる EGFR 発現状況検討 (EGFR-PET)

アービタックスは EGFR 発現の高い腫瘍に奏効し、EGFR 高発現である頭頸部癌において抗腫瘍効果が期待できる為、各症例での EGFR 発現検討は重要である。口腔癌マウスモデルを対象に、プローブ化したアービタックスで PET 撮像し、PET プローブ集積最大値と、各腫瘍株担癌マウスでのアービタックス感受性を比較した。モデルマウスには BALB/cAJcl-nu/nu マウスを用い、ヒト頭頸部癌由来癌細胞株 (HSG, SAS, Hep2 株) を背部皮下に担癌させた。腫瘍が一定の大きさに達したマウスに対し、小動物用 PET 装置 (島津製作所 Clairvivo PET) を用いて、PET ならびに CT を経時的に撮像し、%ID/g 値を画像解析し、EGFR 発現として算出した。%ID/g 値は、マウス屠殺後回収した腫瘍等各臓器のカウンター放射活性実測値と比較した。

PET プローブには、アービタックスを 89Zr で放射線標識し用いた。アービタックスプロ-

ブの腫瘍への特異性、撮像至適時間、各種癌細胞担癌マウスでの EGFR 定量性を検討した。

(4) 口腔癌細胞担癌ヌードマウスによるアービタックス感受性検討

モデルマウスには BALB/cAJcl-nu/nu マウスを用い、ヒト頭頸部癌由来癌細胞株 (HSG, SAS, Hep2 株) を背部皮下に担癌させた。アービタックスを投与有無で 2 群にわけ、腫瘍径計測と生存日数を比較した。

(5) PIK3CA 阻害剤によるセツキシマブ感受性増強試験 (現在検討中)

EGFR 伝達経路の一つである PI3K/Akt 経路を構成する PI3K 阻害を通じてアービタックス感受性増強効果を検討することとした。PI3K 阻害剤として、BEZ235 (NVP-BEZ235) (化学式: C30H23N5O, PI3K と mTOR kinase 阻害剤、AdipoGen[®] lifesciences 社) をアービタックスと併用投与し、in vitro での MTT アッセイを行う。現在検討中である。

4. 研究成果

(1) Luminex®法による遺伝子変異解析

	BRAF 600	KRAS	NRAS
HSC4	野生型	野生型	野生型
HSC3	野生型	野生型	野生型
HSC2	野生型	野生型	野生型
SAS	野生型	野生型	野生型
Hep2	野生型	野生型	野生型
HO-1-u-1	野生型	野生型	野生型
Ca9-22	野生型	野生型	野生型
HSG	野生型	野生型	野生型
HSQ-89	野生型	野生型	野生型

	PIK3CA	PIK3CA	PIK3CA	PIK3CA
コドン	542	545	546	1047
HSC4	野生型	野生型	野生型	野生型
HSC3	野生型	野生型	野生型	野生型
HSC2	野生型	野生型	野生型	野生型
SAS	野生型	野生型	野生型	野生型
Hep2	野生型	野生型	野生型	野生型
HO-1-u-1	野生型	野生型	野生型	野生型

Ca9-22	野生型	野生型	野生型	H1047R
HSG	E542K	野生型	野生型	野生型
HSQ-89	野生型	野生型	野生型	野生型

当初、それぞれにおける BRAF 遺伝子に加え、周辺遺伝子 (KRAS, NRAS, PIK3CA) 遺伝子の変異を基にアービタックス感受性を比較検討する予定であったが、ほとんどの株で各遺伝子変異を見つける事が出来なかった。しかし、検討した口腔癌細胞株 9 株のうち、2 株にて PIK3CA 遺伝子変異を認めた。PIK3CA 遺伝子はクラス I PI3-kinase (PI3K) の catalytic サブユニットにあたる p110 をコードする。ヒトの様々な癌で PIK3CA 遺伝子の変異が高頻度に起こっていることが知られている。PIK3CA 遺伝子の約 80% の変異は、exon10 の helical domain にあたる E545K、E542K と exon21 のキナーゼドメインにあたる H1047R の 3 つである。PIK3CA 遺伝子変異を認めた口腔癌細胞株 2 株での変異は E542K と H1047R であった。

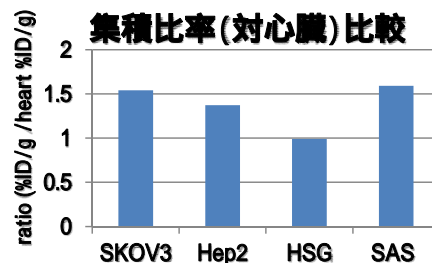
PIK3CA 遺伝子変異は機能獲得変異であり、今回の遺伝子変異結果は、口腔癌におけるアービタックスによる抗腫瘍効果を妨げる EGFR 伝達下流経路は BRAF を主体とした Ras-Raf-MAPK 経路ではなく、PI3K/Akt 経路である可能性が高いことを示唆する。PI3K/Akt 経路をターゲットとすればアービタックス感受性増強効果を得ることが出来る可能性を示している。以降、PI3K/Akt 経路を構成する PIK3CA 遺伝子の H1047R 変異を認めた Ca9-22 株と、PIK3CA 遺伝子の E542K 変異を認めた HSG 株をテスト細胞とし、その他の細胞をコントロール群とした。

(2) 分子イメージングによる EGFR 発現状況検討 (EGFR-PET)

アービタックスをプローブとして用いる EGFR-PET の撮像に用いるアービタックスプローブの改良の一環として標識核種の選定 (Cu, Zr) を行い、Zr (ジルコニウム) を核種として、ヒト由来口腔癌細胞株担癌 BALB/C

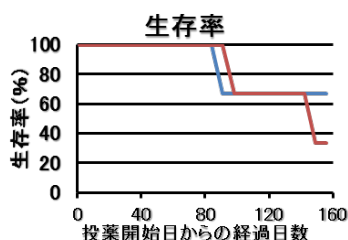
ヌードマウスモデルについて PET 撮影を行ったデータについて、解析ソフト PMOD を用いて画像解析を引き続き行った。

アービタックスプローブは、腫瘍特異的かつ高い EGFR 結合力を示し、89Zr の長い半減期に由来する撮像至適時間の広い設定が可能であった。PET の %ID/g 値とガンマカウンタ実測値に相違を認めたが、各細胞株間での %ID/g 値の比較では、内部壊死を伴って一見発現量の少なく描出される腫瘍においても、PET プローブ集積最大値による EGFR 発現量の比較が可能であった。その結果、HSG、SAS、Hep2 株担癌 BALB/C ヌードマウスモデルは PET にて EGFR 著高発現細胞であるとの結果を得ることができた (下グラフに示す)。Zr 標識型アービタックスプローブは、臨床応用可能なプローブとなりうる可能性を示唆でき、今後、アービタックス + PIK3CA 阻害剤併用療法時の抗腫瘍効果評価に利用できる可能性を示唆できた。



(3) 口腔癌細胞担癌ヌードマウスによるアービタックス感受性検討

PET にて EGFR 著高発現の HSG、SAS、Hep2 株を背部に担癌させた担癌マウス群では、SAS 株においてのみアービタックス腹腔投与による腫瘍増大率の低下を認め、アービタックスの奏効を示唆できた。PIK3CA 遺伝子の E542K 変異を有する HSG 株担癌マウスではアービタックス投与有無で生存日数の延長にほぼ相違なく、アービタックス奏効確認できなかった (下グラフに示す、投与群赤、非投与群青)。



(4) PIK3CA 阻害剤によるアービタックス感受性増強試験 (現在検討中)

口腔癌細胞株には BRAF 変異がないことから BRAF 阻害薬を用いることは中止とし、その代用として、BRAF 同様、EGFR シグナル経路である RAS 関連下流遺伝子である PIK3CA についての阻害剤を用いて、in vitro ならびに in vivo 実験を開始した。PIK3CA 阻害剤として、BEZ235 (NVP-BEZ235)(化学式:C30H23N5O、PI3K と mTOR kinase 阻害剤、AdipoGen^R lifesciences 社)を現在検討中である。特に PIK3CA 遺伝子の H1047R 変異を認めた Ca9-22 株と、PIK3CA 遺伝子の E542K 変異を認めた HSG 株をテスト細胞とし、その他の細胞をコントロール群としている。in vitro での PIK3CA 阻害剤 BEZ235 投与濃度設定を行い、アービタックスとの併用投与による抗腫瘍効果を MTT アッセイにて検討中である。

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)

Xu P, Xu N, Guo K, Xu A, Takenaka F, Matsuura E, Liu C, Kumon H, Huang P. Real-time monitoring of tumor progression and drug responses in a preclinical mouse model of prostate cancer. *Oncotarget*, 31;7(22):33025-34 (2016). 査読あり

Kobayashi T, Furusawa Y, Yamada S, Akehi M, Takenaka F, Sasaki T, Akahoshi A, Hanada T, Matsuura E, Hirano H, Tai A, Kakuta H. Positron emission tomography to elucidate

pharmacokinetic differences of regioisomeric retinoid x receptor agonists. *ACS Med. Chem. Lett.*, 6(3): 334-8 (2015). 査読あり

〔学会発表〕(計 5 件)

Okada S, Konouchi H 他、Evaluation of sensitivity to Cetuximab in HNC xenograft mouse models using molecular imaging. Asian Congress of Oral and Maxillo-Facial Radiology, 2016 年 11 月 10 日、チェンマイ市(タイ)

村上 純, 此内浩信 他、口腔癌マウスモデルでの新規抗癌剤セツキシマブに対する、分子イメージング応用型奏効判定法の開発、第 2 回岡山リサーチパーク研究・展示発表会、2016 年 3 月 18 日、テクノサポート岡山(岡山県岡山市)

村上 純, 此内浩信 他、口腔癌マウスモデルでの新規抗癌剤セツキシマブに対する、分子イメージング応用型奏効判定法の開発、岡山大学 知恵の見本市、2015 年 12 月 4 日、岡山大学(岡山県岡山市)

村上 純, 此内浩信 他、口腔癌マウスモデルでのセツキシマブを用いた分子イメージング解析、日本歯科放射線学会第 56 回学術大会、2015 年 6 月 5 日、戦災復興記念館(宮城県仙台市)

村上 純, 此内浩信 他、口腔癌マウスモデルでの抗 EGFR 療法における分子イメージング解析、第 69 回日本口腔科学会学術集会、2015 年 5 月 13 日、大阪国際会議場(大阪府大阪市)

〔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 なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

此内 浩信 (KONOUCHI, Hironobu)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：20294423

(2)研究分担者

竹中 文章 (TAKENAKA, Fumiaki)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：10642522

(3)畦坪 輝寿 (UNETSUBO, Teruhisa)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：30633606

(4)久富 美紀 (HISATOMI, Miki)

岡山大学・岡山大学病院・講師
研究者番号：60314704

(5)連携研究者

村上 純 (MURAKAMI, Jun)
岡山大学・岡山大学病院・助教
研究者番号：40362983

(6)研究協力者

岡田 俊輔 (OKADA, Shunsuke)
岡山大学・岡山大学病院・医員
研究者番号：00759681