



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

EGF受容体・シグナル伝達を分子標的とする口腔がん治療の基礎的検討

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2008-03-12 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 柴田, 敏之, 浜田, 淳一, 土井田, 誠, 山下, 知巳, 牧田, 浩樹 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/2816

EGF 受容体・シグナル伝達を分子標的とする

口腔がん治療の基礎的検討

(研究課題番号：15390610)

平成 15 年度～平成 17 年度

科学研究費補助金[基盤研究(B)]

研究成果報告書

平成 18 年 4 月

研究代表者 柴田敏之

(岐阜大学大学院医学系研究科教授)

緒言

近年の分子生物学の発展に伴い、がん細胞内分子を標的とする薬剤の開発が進められ、臨床応用が図られて来ている。この中で、EGF 受容体ならびにそのシグナル伝達物質 (PKC, PI3K 等) を標的分子とするものも開発されて来ているが、その作用については検証すべき部分も多いままとなっている。また、ヒト口腔扁平上皮癌細胞は、EGF を多く含む口腔環境より発生し、例外なく EGF 受容体を過剰発現し、例外なく EGF 刺激により増殖が抑制され、浸潤・転移能が亢進される希有な性質を具備している。しかしながら、その EGF 刺激による浸潤・転移能亢進機序、シグナル伝達の詳細な検討は国内外において皆無であり、これを明かとする意義は大きい。

これまで、我々は、ヒト口腔扁平上皮癌細胞株を用い、上皮成長因子(EGF)が口腔癌細胞の浸潤・転移に促進的に作用することを明らかにしてきており、その浸潤シグナル(運動能亢進シグナル)が EGF 高感受性クローンでは、

[EGF 受容体リン酸化(erbB ホモ二量体) \Rightarrow PLC γ 活性化 \Rightarrow PKC 活性化]

又は

[EGF 受容体リン酸化(erbB, erbB3 ヘテロ二量体) \Rightarrow PI3K 活性化 \Rightarrow PKC の活性化]

の2つの経路により伝達され、nPKC δ , aPKC ξ の2つの分子種が関与していることが明らかとなって来ている。

そこで、本研究では、これまでの結果と樹立した細胞株などの材料を基に、より詳細な EGF 刺激のシグナル伝達様式を解明するとともに、これらシグナル伝達物質を標的とする薬剤の効果を検証し、口腔がんの浸潤転移能獲得機序および分子標的治療の Key Point を明らかとすることを目的として、以下の研究組織と補助金経費を活用し展開した。

研究組織

研究代表者：柴田 敏之 (岐阜大学大学院医学系研究科・教授)

研究分担者：浜田 淳一 (北海道大学大学院医学研究科・助教授)

土井田 誠 (岐阜大学大学院医学系研究科・助教授)

山下 知己 (岐阜大学医学部附属病院・講師)

牧田 浩樹 (岐阜大学医学部附属病院・助手)

研究経費

平成 15 年度 4700 千円

平成 16 年度 4500 千円

平成 17 年度 4600 千円

計 13800 千円

EGF 受容体・シグナル伝達を分子標的とする口腔がん治療の基礎的検討

研究成果の概略と推移

ヒト口腔扁平上皮がん細胞株に上皮成長因子(Epidermal Growth Factor: EGF)を作用させると、細胞増殖は抑制されるが、その運動能や細胞外基質分解酵素(MMP, u-PA)の産生が増強され、浸潤・転移に促進的に作用することが明らかとなっている。この現象は、我々が追認し得た細胞株 5 系(SAS, Ca9-22, HSC-2, HSC-3, HSC-4)においても同様に観察されている(Tumor Biology 1997)。我々の実験系では、運動能の評価を金コロイド法を用いた EGF 刺激後の random motility の変化として、その運動範囲面積の測定より算出して行った(図 1)。

以下、我々は、この運動能の変化を指標として EGF 刺激による浸潤シグナル伝達様式の解明と、その抑制、特に浸潤シグナル関わる伝達分子の制御・抑制による効果の検討を展開した。

まず、浸潤シグナル伝達の伝達様式を解明するために、ヒト口腔扁平上皮がん細胞株の内、最も反応性のよかった株(Ca9-22)より限界希釈法によるクローニングを行い、EGF に最も反応性の良いクローン s-1(sensitive-1)と反応性の悪いクローン i-1(insensitive-1)を樹立した(図 2)。継いで、EGF 受容体の自己リン酸化の抑制効果を検証するためにリン酸化阻害剤 Erbstatin を持ちいて阻害作用を検討した所、Erbstatin は、EGF 刺激による運動能の亢進を完全に抑制した。また、EGF 受容体の自己リン酸化後の伝達経路として PKC を介する経路が良く知られ、この伝達経路を検証するために Psi-tectorigenin を用いて PLC γ の阻害を行った所、運動能の完全な抑制効果が観察された。次いで、PI3K の阻害剤である Wortmannin を作用させた所、EGF 刺激による運動能の促進効果の抑制が観察された。一方、PKC の活性化剤である PMA を作用させた所、EGF 刺激と同等の運動能の亢進が認められ、PKC の阻害剤である Calphostin C を作用させた所、EGF 刺激による細胞運動の亢進は認められなくなった(図 3-7)。さらに EGF 刺激後の細胞内における PKC の局在様式を共焦点レーザー顕微鏡にて観察した所、PKC (ここでは pan PKC) は、経時的に細胞膜面に移行するのが観察された(図 8)。

以上の結果より、

[EGF 受容体リン酸化(erbB ホモ二量体) \Rightarrow PLC γ 活性化 \Rightarrow PKC 活性化]

又は

[EGF 受容体リン酸化(erbB, erbB3 ヘテロ二量体) \Rightarrow PI3K 活性化 \Rightarrow PKC の活性化]
の二つの経路によって EGF 刺激後の運動能の亢進が伝達されていることが示された。

また、共焦点レーザー顕微鏡にて EGF 刺激後の PKC 各分子種細の胞内局在様式を観察

した所、nPKC δ , aPKC ξ の2つの分子種が関与していることが明らかとなった(図 9,10)。さらに、この二つの分子種について、EGF 刺激と各種阻害剤との関連をあきらかとするために Western blotting を行った所、EGF 受容体リン酸化(erbB ホモ二量体) \Rightarrow PLC γ 活性化 \Rightarrow PKC 活性化の経路では nPKC δ 活性化が関与すること、EGF 受容体リン酸化(erbB, erbB3 ヘテロ二量体) \Rightarrow PI3K 活性化 \Rightarrow PKC の活性化経路では aPKC ξ 活性化が関与することが明らかとなった(図 11, 12)。また、重要な点は、これら二つの経路の内、何れか一方の抑制・阻害により運動能の亢進は見られなくなることで、図 13 に示す、現在開発が進められている EGF 関連の各分子ないし受容体そのものも一定の効果を示し得ると考えられるが、更に進めて aPKC ξ ないし nPKC δ を標的とする戦略もあり得ると考えられた。この様に分子標的を絞り上げることにより、よりがん細胞特異的な効果が期待されると考えられた。

一方、本研究を開始する契機となった SHR ラット乳がん細胞より樹立された極度に造腫瘍性・転移能の低下した ER-1 においては、ヒト口腔扁平上皮がん細胞と同様に、EGF 刺激により造腫瘍性・浸潤転移能の亢進が観察され、さらに、*in vitro* での EGF 長期間(1ヶ月間)刺激により、その後、2月間(最低)は、高い造腫瘍性・浸潤転移能を維持したまま(悪性形質の獲得)であることが示されている(図 14)。この悪性形質の獲得機序として、EGF 刺激後に細胞内に生じる Reactive oxygen radicals: ROS が重要な鍵を握っている事が示されて来た。即ち、EGF を ER-1 細胞に作用させると、細胞内に Reactive oxygen radicals が発生し、8-OHdG の増加と peroxylase の枯渇が観察された。一方、Reactive oxygen radicals の scavenger を誘導する NAC、Selenium 添加培地で培養すると上記の現象は消失・抑制され、*in vivo* における造腫瘍性・浸潤転移能も亢進されなかった(図 15-25)。この現象は、EGF 刺激が特に EGF 受容体およびその下流のシグナル伝達分子を介することなくがん細胞の形質に影響を及ぼす可能性を示し、本研究で行って来た PKC を主体とする運動能の亢進とは別次元ないし全く別の作用機序が存在する可能性を暗示した。

そこで、我々は EGF 刺激がヒト口腔がん細胞に及ぼす影響を網羅的に解析するために(即ち、前述した、別次元の現象が存在するか否かを検証するため) EGF 刺激後の s-1 細胞と i-1 細胞の mRNA の変化を DNA チップにて測定した(図 26-32)。

この結果、EGF 刺激による反応系として約 20-30 の遺伝子が増加することが示され、ヒト口腔扁平上皮がん細胞の 24 時間処理では、Reactive oxygen radicals に関わる因子の変化は観察されなかった。しかしながら、長期間処理となった場合には留意が必要と考えられた。章を閉じるに当たり、EGF 高感受性クローン s-1 に EGF を作用させた場合の mRNA の動きにおいて有意に変化したものの表を添付した。まだ纏めることの出来ていない生のデータであるが、WNT1, ESTs に関わる遺伝子の動きが見られるのと、細胞がマトリックス分解酵素関連の遺伝子変化が観察され今後の展望において大いなる示唆を感じている。

研究発表

学会誌等 (2003 4. 1~2006 3. 31)

Shibata T, Nagayasu H, Kitajo H, Arisue M, Yamashita T, Hatakeyama D, Iwasaki T, Kobayashi H.: Inhibitory effects of fermented brown rice and rice bran on the development of acute hepatitis in Long-Evans Cinnamon rats. *Oncol Rep.* 2006 Apr;15(4):869-74.

Suwa T, Saio M, Umemura N, Yamashita T, Toida M, Shibata T, Takami T.: Preoperative radiotherapy contributes to induction of proliferative activity of CD8+ tumor-infiltrating T-cells in oral squamous cell carcinoma. *Oncol Rep.* 2006 Apr;15(4):757-63.

Toida M, Shimokawa K, Makita H, Kato K, Kobayashi A, Kusunoki Y, Hatakeyama D, Fujitsuka H, Yamashita T, Shibata T.: Intraoral minor salivary gland tumors: a clinicopathological study of 82 cases. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2005 Jul;34(5):528-32. Epub 2005 Jan 24.

Toida M, Shimokawa K, Makita H, Kato K, Kobayashi A, Kusunoki Y, Hatakeyama D, Fujitsuka H, Yamashita T, Shibata T.: Analysis of ameloblastomas by comparative genomic hybridization and fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet.* 2005 Jun;159(2):99-104.

Yoshida K, Tanaka T, Hirose Y, Yamaguchi F, Kohno H, Toida M, Hara A, Sugie S, Shibata T, Mori H.: Dietary garcinol inhibits 4-nitroquinoline 1-oxide-induced tongue carcinogenesis in rats. *Cancer Lett.* 2005 Apr 18;221(1):29-39.

Kato K, Hara A, Kuno T, Kitaori N, Huilan Z, Mori H, Toida M, Shibata T.: Matrix metalloproteinases 2 and 9 in oral squamous cell carcinomas: manifestation and localization of their activity. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2005 Jun;131(6):340-6. Epub 2004 Dec 22.

Kanno Y, Tokuda H, Nakajima K, Ishisaki A, Shibata T, Numata O, Kozawa O.: Involvement of SAPK/JNK in prostaglandin E(1)-induced VEGF synthesis in osteoblast-like cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2004 May 31;220(1-2):89-95.

Ishisaki A, Tokuda H, Yoshida M, Hirade K, Kunieda K, Hatakeyama D, Shibata T, Kozawa

O.: Activation of p38 mitogen-activated protein kinase mediates thyroid hormone-stimulated osteocalcin synthesis in osteoblasts. *Mol Cell Endocrinol.* 2004 Feb 12;214(1-2):189-95.

Abiko Y, Ogawa I, Hattori Y, Kusano K, Nishimura M, Ohuchi T, Abe U, Shibata T, Matsuda S, Takata T, Kaku T.: Atypical carcinoid (neuroendocrine carcinoma) of the gingiva: Counterpart of a laryngeal tumor. *Pathol Int.* 2004 Feb;54(2):97-100.

Toida M, Watanabe F, Goto K, Shibata T.: Usefulness of low-level laser for control of painful stomatitis in patients with hand-foot-and-mouth disease. *J Clin Laser Med Surg.* 2003 Dec;21(6):363-7.

Ishimaru JI, Ogi N, Mizui T, Miyamoto K, Shibata T, Kurita K.: Effects of a single arthrocentesis and a COX-2 inhibitor on disorders of temporomandibular joints. A preliminary clinical study. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2003 Oct;41(5):323-8.

Yoshida K, Hirose Y, Tanaka T, Yamada Y, Kuno T, Kohno H, Katayama M, Qiao Z, Sakata K, Sugie S, Shibata T, Mori H.: Inhibitory effects of troglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand, in rat tongue carcinogenesis initiated with 4-nitroquinoline 1-oxide. *Cancer Sci.* 2003 Apr;94(4):365-71.

Toida M, Hasegawa T, Watanabe F, Kato K, Makita H, Fujitsuka H, Kato Y, Miyamoto K, Shibata T, Shimokawa K.: Lobular capillary hemangioma of the oral mucosa: clinicopathological study of 43 cases with a special reference to immunohistochemical characterization of the vascular elements. *Pathol Int.* 2003 Jan;53(1):1-7.]

Abe M, Hamada J, Takahashi O, Takahashi Y, Tada M, Miyamoto M, Morikawa T, Kondo S, Moriuchi T.: Disordered expression of HOX genes in human non-small cell lung cancer. *Oncol Rep.* 2006 Apr;15(4):797-802.

Abe T, Tada M, Shinohara N, Okada F, Itoh T, Hamada J, Harabayashi T, Chen Q, Moriuchi T, Nonomura K.: Establishment and characterization of human urothelial cancer xenografts in severe combined immunodeficient mice. *Int J Urol.* 2006 Jan;13(1):47-57.

Zhao W, Darmanin S, Fu Q, Chen J, Cui H, Wang J, Okada F, Hamada J, Hattori Y, Kondo T, Hamuro J, Asaka M, Kobayashi M.: Hypoxia suppresses the production of matrix metalloproteinases and the migration of human monocyte-derived dendritic cells. *Eur J*

Immunol. 2005 Dec;35(12):3468-77.

Komuro K, Tada M, Tamoto E, Kawakami A, Matsunaga A, Teramoto K, Shindoh G, Takada M, Murakawa K, Kanai M, Kobayashi N, Fujiwara Y, Nishimura N, Hamada J, Ishizu A, Ikeda H, Kondo S, Katoh H, Moriuchi T, Yoshiki T. Prediction of lymphatic invasion/lymph node metastasis, recurrence, and survival in patients with gastric cancer by cDNA array-based expression profiling. J Surg Res. 2005 Apr;124(2):225-36.

Murakawa K, Tada M, Takada M, Tamoto E, Shindoh G, Teramoto K, Matsunaga A, Komuro K, Kanai M, Kawakami A, Fujiwara Y, Kobayashi N, Shirata K, Nishimura N, Okushiba S, Kondo S, Hamada J, Katoh H, Yoshiki T, Moriuchi T.: Prediction of lymph node metastasis and perineural invasion of biliary tract cancer by selected features from cDNA array data. J Surg Res. 2004 Dec;122(2):184-94.

Maeda K, Hamada J, Takahashi Y, Tada M, Yamamoto Y, Sugihara T, Moriuchi T.: Altered expressions of HOX genes in human cutaneous malignant melanoma. Int J Cancer. 2005 Apr 10;114(3):436-41.

Takada M, Tada M, Tamoto E, Kawakami A, Murakawa K, Shindoh G, Teramoto K, Matsunaga A, Komuro K, Kanai M, Fujiwara Y, Shirata K, Nishimura N, Miyamoto M, Okushiba S, Kondo S, Hamada J, Katoh H, Yoshiki T, Moriuchi T.: Prediction of lymph node metastasis by analysis of gene expression profiles in non-small cell lung cancer. J Surg Res. 2004 Nov;122(1):61-9.

Tsutsumida A, Hamada J, Tada M, Aoyama T, Furuuchi K, Kawai Y, Yamamoto Y, Sugihara T, Moriuchi T.: Epigenetic silencing of E- and P-cadherin gene expression in human melanoma cell lines. Int J Oncol. 2004 Nov;25(5):1415-21.

Hirai A, Tada M, Furuuchi K, Ishikawa S, Makiyama K, Hamada J, Okada F, Kobayashi I, Fukuda H, Moriuchi T.: Expression of AIE-75 PDZ-domain protein induces G2/M cell cycle arrest in human colorectal adenocarcinoma SW480 cells. Cancer Lett. 2004 Aug 10;211(2):209-18.

Tamoto E, Tada M, Murakawa K, Takada M, Shindo G, Teramoto K, Matsunaga A, Komuro K, Kanai M, Kawakami A, Fujiwara Y, Kobayashi N, Shirata K, Nishimura N, Okushiba S, Kondo S, Hamada J, Yoshiki T, Moriuchi T, Katoh H.: Gene-expression profile changes

correlated with tumor progression and lymph node metastasis in esophageal cancer. *Clin Cancer Res.* 2004 Jun 1;10(11):3629-38.

Takahashi Y, Hamada J, Murakawa K, Takada M, Tada M, Nogami I, Hayashi N, Nakamori S, Monden M, Miyamoto M, Katoh H, Moriuchi T.: Expression profiles of 39 HOX genes in normal human adult organs and anaplastic thyroid cancer cell lines by quantitative real-time RT-PCR system. *Exp Cell Res.* 2004 Feb 1;293(1):144-53.

Yamada H, Furuuchi K, Aoyama T, Kataoka A, Hamada J, Tada M, Okushiba S, Kondo S, Moriuchi T, Katoh H.: Reconstructed beta-catenin/TCF4 signaling in yeast applicable to functional evaluation of APC mutations. *Am J Pathol.* 2003 Dec;163(6):2201-9.

Kitajo H, Shibata T, Nagayasu H, Kawano T, Hamada J, Yamashita T, Arisue M.: Rho regulates the hepatocyte growth factor/scatter factor-stimulated cell motility of human oral squamous cell carcinoma cells. *Oncol Rep.* 2003 Sep-Oct;10(5):1351-6.

EGF 受容体・シグナル伝達を分子標的とする口腔がん治療の基礎的検討

研究報告主要論文