

学内グラント 報告書

平成24年度 学内グラント終了時報告書

下咽頭癌三剤併用導入化学療法の効果予測因子の探索と  
多因子に基づくテイラード療法

研究代表者 中平 光彦 (国際医療センター 耳鼻咽喉科(頭頸部腫瘍科))

研究分担者 西山 正彦<sup>1)</sup>, 江口 英孝<sup>1)</sup>, 和田 智<sup>2)</sup>, 菅澤 正<sup>3)</sup>

緒言

下咽頭癌は頭頸部癌の約10%を占め、本邦における下咽頭癌の年間罹患率は100万人比約8人と推測される。診断時には進行癌が約80%を占め、5年生存率は30%前後と頭頸部癌の中で最も予後不良な疾患の一つである。進行下咽頭癌切除不能症例や臓器温存希望症例に対しては非外科的治療として放射線治療・化学療法が適応となっている。局所制御率や臓器温存の改善を目的として、放射線治療や手術前に行う導入化学療法が以前から用いられている。その標準的レジメンは白金製剤である cisplatin (CDDP) とピリミジン系代謝拮抗薬 5-fluorouracil (5-FU) の併用療法 (PF療法) であったが、近年、PF療法にタキサン系抗癌剤 docetaxel (TXT) を加えた TPF 3剤併用療法が注目されている。局所進行頭頸部扁平上皮癌を対象に放射線療法前の導入化学療法として TPF療法とPF療法を比較検討した第3相試験 (TAX323試験: Vermorken JB, Remenar E, van Herpen C, et al. Cisplatin, fluorouracil, and docetaxel in unresectable head and neck cancer. *N Engl J Med* 2007;357:1695-704.) ならびに、局所進行頭頸部扁平上皮癌を対象に白金製剤である carboplatin 併用化学放射線療法前の導入化学療法としての TPF療法とPF療法を比較検討した第3相試験 (TAX324試験: Posner MR, Hershock DM, Blajman CR, et al. Cisplatin and fluorouracil alone or with docetaxel in head and neck cancer. *N Engl J Med* 2007;357:1705-15.) の結果が報告され、いずれも TPF療法はPF療法と比較して全生存期間が有意に長いことが示された。これらの試験結果を鑑み、本院でも2008年9月より TPF療法を開始し、2010年7月までに17例の下咽頭扁平上皮癌症例

に導入化学療法を行ない、原発巣で82%、頸部リンパ節で59%の奏効率が得られている。しかしながら、このレジメンでは CTCAE Grade3-4の重篤な有害事象、特に白血球減少13例、好中球減少13例、好中球減少性発熱11例が認められており、治療効果ならびに副作用を予測するシステムの確立が急務となっている。

腫瘍組織を用いた効果予測マーカー遺伝子が、同じ薬剤であっても臓器によって必ずしも同一でないことを考慮すると、頭頸部癌のうち下咽頭癌に限定したこうした研究はほとんどなされていない。そこで本研究では咽頭癌由来細胞株を用いて、TPF療法の治療効果予測候補因子の探索を試みた。

材料・方法

1) 薬剤

CDDPはシグマ アルドリッチ社より、TXTはトロントリサーチケミカル社、5-FUは和光純薬より購入した。

2) 細胞株

FaDu, Detroit 562はATCCから、BICR 6はECACCより入手した。HPC-921Y, MPC-881T, MPC-882Yは横浜市立大学 矢野間俊介博士より、UMB-SCC-745はUniversity Hospital Giessen and Marburg, Dept. of Otolaryngology, Head & Neck Surgery Robert Mandic博士より供与いただいた。また、UT-SCC-4, UT-SCC-26A, UT-SCC-26B, UT-SCC-62, UT-SCC-66, UT-SCC-70, UT-SCC-89, UT-SCC-94はUniversity of Turku and Turku University Hospital, Dept. of Otorhinolaryngology - Head and Neck Surgery Reidar Grénman教授より入手した。各細胞は、推奨された培地に10% FBSを加え、37℃、5%二酸化炭素濃度下で培養した。

3) 細胞毒性試験

咽頭癌由来細胞株15株を用いてMTTアッセイを行い、TXT, CDDP, 5-FU各種薬剤に対するIC<sub>50</sub> (50%

1) ゲノム医学研究センター トランスレーショナルリサーチ部門  
2) 国際医療センター 乳腺腫瘍科  
3) 国際医療センター 耳鼻咽喉科(頭頸部腫瘍科)

阻害濃度)を決定した。MTT アッセイは従来法の3-(4,5-ジ-メチルチアゾール-2-イリド)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロマイド (MTT) 色素減少分析法で評価した。96ウェルプレートに1ウェルあたり $4 \times 10^3 \sim 1.2 \times 10^4$ 個で播種した。各濃度の薬剤を加え、72時間インキュベーションした。各ウェルにPBS 100  $\mu$ lを加え上清吸引したのち、0.4% MTT 10  $\mu$ l, 0.1 mol/l コハク酸ナトリウム 10  $\mu$ lを加えた。1~3時間インキュベーションした後、ジメチルスルホキシド (DMSO) 150  $\mu$ lを加えホルマザン色素を溶解した。得られた着色溶液の570 nmと650 nmの波長の吸光度を分光光度計で測定し定量化を行った。データはコントロール群に対する薬剤暴露群における生存細胞の割合で数値化し、細胞毒性は $IC_{50}$ で評価した。

#### 4) 網羅的遺伝子発現解析

各細胞株からNucleoSpin RNA 抽出キット (Macherey-Nagel)を用いてtotal RNAを抽出・精製し、Quick Amp Labeling Kit (Agilent) でcRNA合成によるラベリングを行い、SurePrint G3 Human GE マイクロアレイキット 8  $\times$  60 K (Agilent)によりmRNAおよびnon-coding RNAの網羅的遺伝子発現解析を行った。Agilent社の推奨する方法により、解析環境言語Rを用いて標準化を行った。

#### 5) 定量的遺伝子発現解析

相関解析から選ばれた遺伝子について、Real-time RT-PCR法により遺伝子発現量の測定を行った。Total RNAをReverTra Ace<sup>®</sup> qPCR RT Kit (東洋紡)を用いて逆転写し、ロシュ社のUniversal Probe Libraryアッセイデザインセンターにて設計したプライマーならびにプローブを用いて、LightCycler480 (ロシュ)にて測定を行った。ACTBおよびGAPDH遺伝子については、インビトロジェン社のEndogenous Control (VIC<sup>®</sup>/MGB Probe, Primer Limited)により測定した。各遺伝子の発現量は、ACTB, GAPDHならびにHPRT1遺伝子の相乗平均値を用いて標準化を行った。

#### 6) 統計学的解析

各細胞株におけるマイクロアレイで得られた遺伝子発現レベルと $IC_{50}$ 値との相関解析を行い、各種抗癌剤の感受性/耐性関連候補遺伝子を抽出した。

上記により選出された候補遺伝子をReal-time RT-PCR法により各細胞株での遺伝子発現量を定量的に測定し、 $IC_{50}$ 値との相関について線形回帰分析により確認を行った。

## 結果

各細胞における3剤の $IC_{50}$ 値を決定した (Table 1)。マイクロアレイで得られた遺伝子発現レベルと抗癌剤感受性の相関解析により、16種の薬剤感受性/耐性関連候補遺伝子を抽出した (Table 2)。Real-time RT-PCRによる定量的遺伝子発現レベルと $IC_{50}$ 値の相関解析

により、これらのうち10遺伝子 (5FU: AGR2, RCAN3, SEPWI, PBX3, CDC25B. TXT: AGR2, PED4D, RAB15; CDDP: PED4D, PTGS1, NINJ2, KLK11, 重複含む)が有意に $IC_{50}$ 値と相関することが確認された (Table 3)。

## 考察

今回同定された感受性/耐性関連候補遺伝子には、喉頭癌の予後との関連が報告されているKLK11や、卵巣癌の予後との関連が認められているAGR2などの遺伝子が含まれており、これらの候補遺伝子が下咽頭癌 TPF 療法のバイオマーカーとなる可能性を示唆している。今後は、これらの遺伝子が単なるバイオマーカーでなく、感受性/耐性規定因子となり得るかについて、siRNAを用いたノックダウンや安定発現形質転換株を用いた実験より検討を進める。

一方、現在進行中である下咽頭癌に対する TPF 療法の第2相臨床試験にて、種々の臨床情報の集積を行うとともに、術前内視鏡切除組織ならびに末梢血リンパ球DNAを収集している。検体数が解析に耐える症例数まで到達した際には、今回の研究で示唆された遺伝子についてその発現量を定量化し、腫瘍縮小効果や再発あるいは全生存期間の効果予測モデルが構築できるかについて検討する。咽頭癌由来細胞株ならびに組織検体を用い、miRNAも含む網羅的遺伝子発現、パスウェイ解析、定量的遺伝子発現、遺伝子多型、遺伝子再構成を含む体細胞変異解析により、下咽頭癌導入 TPF 化学療法の治療効果や副作用を予測する新規バイオマーカーを探索し、既存の知見により得られている因子との比較検討を行ない、さらにこれらの因子を有機的に結びつけた多因子による効果予測式の策定を行う。

Table 1. 各種細胞株における、5-FU, TXT, CDDPの $IC_{50}$ 値

Cells	IC50		
	5-FU ( $\mu$ g/ml)	TXT (pg/ml)	CDDP ( $\mu$ g/ml)
UT-SCC-26A	0.821	47.909	8.386
UT-SCC-26B	0.056	0.169	0.283
UT-SCC-4	39.887	8898.846	0.944
UT-SCC-62	1.158	6.206	1.615
UT-SCC-66	0.121	207.924	1.604
UT-SCC-70	0.208	9191.086	2.357
UMB-SCC-745	0.308	0.094	0.974
UT-SCC-89	0.044	0.403	0.549
UT-SCC-94	0.077	0.781	1.370
BICR6	0.481	0.104	0.212
Detroit562	2.124	3.362	1.513
FaDu	2.240	3798.933	1.090
HPC921Y	1.151	9980.447	2.867
MPC881T	0.055	0.042	0.349
MPC882Y	0.959	22607.490	0.360

**Table 2.** 各種薬剤に対するIC<sub>50</sub>値とマイクロアレイによる発現レベルが相関した候補遺伝子リスト

	probe_id	SYMBOL	GENE_NAME	R	R for Cat
5FU	A_23_P414964	<i>ZNF584</i>	zinc finger protein 584	-0.834	
	A_23_P35205	<i>RCAN3</i>	RCAN family member 3	-0.806	
	A_23_P391275	<i>RCAN3</i>	RCAN family member 3	-0.801	
	A_32_P2392	<i>GOLGA8A</i>	golgin A8 family, member A	0.786	
	A_23_P117582	<i>JDP2</i>	Jun dimerization protein 2	0.766	
	A_33_P3326432	<i>SEPW1</i>	selenoprotein W, 1	-0.765	
	A_23_P71821	<i>PBX3</i>	pre-B-cell leukemia homeobox 3	-0.760	
	A_23_P210726	<i>CDC25B</i>	cell division cycle 25 homolog B	-0.753	
	A_24_P201171	<i>STXBP1</i>	syntaxin binding protein 1	-0.750	
CDDP	A_23_P101505	<i>KLK11</i>	kallikrein-related peptidase 11	-0.753	
	A_23_P48109	<i>NINJ2</i>	ninjurin 2	-0.818	
	A_33_P3212640	<i>NOTCH2NL</i>	notch 2 N-terminal like	0.757	
	A_23_P216966	<i>PTGS1</i>	prostaglandin-endoperoxide synthase 1	-0.831	
TXT	A_23_P31407	<i>AGR2</i>	anterior gradient 2 homolog	0.701	0.802
	A_33_P3389653	<i>PDE4D</i>	phosphodiesterase 4D, cAMP-specific	0.588	0.753
	A_24_P193295	<i>RAB15</i>	RAB15, member RAS oncogene family	0.530	0.780
	A_33_P3379091	<i>SYNGR1</i>	synaptogyrin 1	0.626	0.799

**Table 3.** Real-time RT-PCRによる遺伝子発現レベルと各種薬剤IC<sub>50</sub>値の相関

Drug	Gene	Linear Regression	
		R <sup>2</sup>	P
5FU	<i>RCAN3</i>	0.406	0.0106
	<i>SEPW1</i>	0.498	0.0033
	<i>PBX3</i>	0.298	0.0354
	<i>CDC25B</i>	0.414	0.0097
	<i>AGR2</i>	0.346	0.021
CDDP	<i>PTGS1</i>	0.596	0.0007
	<i>NINJ2</i>	0.728	<0.0001
	<i>KLK11</i>	0.449	0.0063
	<i>PED4D</i>	0.275	0.0449
TXT	<i>AGR2</i>	0.486	0.0038
	<i>SYNGR1</i>	0.391	0.0223
	<i>PDE4D</i>	0.556	0.0014
	<i>RAB15</i>	0.405	0.0107

## 研究成果リスト

## 論文

- 1) Nakahira M, Sugasawa M, Morita K. Monophasic synovial sarcoma of the nasopharynx. Auris Nasus Larynx 2013;40:413-6.

## 学会発表

- 1) 松村聡子, 井上準, 久場潔実, 小村豪, 高城文彦, 盛田恵, 中平光彦, 菅澤正. 当科における進行下咽頭癌に対するTPF(TXT/CDDP/5-FU)療法の検討, 第113回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会, 2012年5月10-12日, 新潟
- 2) 久場潔実, 井上準, 松村聡子, 高城文彦, 盛田恵, 中平光彦, 菅澤正. 下咽頭癌放射線化学療法後に化膿性脊椎炎から硬膜外膿瘍を発症した一例, 第113回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会, 2012年5月10-12日, 新潟
- 3) 久場潔実, 井上準, 野島淳也, 松村聡子, 高城文彦, 盛田恵, 横川秀樹, 中平光彦, 菅澤正. 当科における中咽頭癌症例の臨床的検討, 第36回日本頭頸部癌学会, 2012年6月6-8日, 松江

- 4) 井上準, 久場潔実, 松村聡子, 高城文彦, 盛田恵, 中平光彦, 菅澤正. 当院における喉頭癌の臨床的検討, 第112回日本耳鼻咽喉科学会埼玉県地方部会, 2012年10月14日, 浦和
- 5) 井上準, 久場潔実, 松村聡子, 高城文彦, 盛田恵, 中平光彦, 菅澤正. 当院における喉頭癌の臨床的検討, 第64回日本気管食道科学会, 2012年11月8-9日, 東京
- 6) 中平光彦, 菅澤正, 盛田恵, 高城文彦, 南和彦, 久場潔実, 井上準. 上咽頭癌の治療成績, 第114回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会, 2013年5月16-18日, 札幌
- 7) 中平光彦. TPF療法 studyについて, 第2回埼玉県頭頸部腫瘍セミナー, 2013年4月4日, 大宮

## 学会発表予定

- 1) 嶋村由美子, 江口英孝, 和田智, 中平光彦, 岡崎康司, Reidar Grénman, 依田哲也, 菅澤正, 西山正彦. 下咽頭がんTPF療法の新規感受性/耐性予測遺伝子の探索, 第51回日本癌治療学会学術集会, 2013年10月24-26日, 京都