

氏名	藤原 敏史		
授与した学位	博士		
専攻分野の名称	歯学		
学位授与番号	博甲第5931号		
学位授与の日付	平成31年3月25日		
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)		
学位論文の題目	Anti-EGFR antibody cetuximab is secreted by oral squamous cell carcinoma and alters EGF-driven mesenchymal transition (抗EGFR抗体セツキシマブは、口腔扁平上皮癌によって分泌され、EGF駆動間葉転換移行を変化させる)		
論文審査委員	岡村 裕彦 教授	佐々木 朗 教授	中野 敬介 准教授

学位論文内容の要旨

論文内容の要旨（2000字程度）

【緒言】

EGF受容体（EGFR）は、口腔扁平上皮癌（OSCC）において重要な形質転換受容体チロシンキナーゼの一つである。EGFRからの遺伝的増幅、過剰発現、および増加したシグナル伝達は、大腸癌やOSCCにおいてしばしば見出され、EGFRは治療抗体であるセツキシマブによって分子標的化されることが多い。セツキシマブはEGFRと結合し、EGFRの二量体化、および下流のRAS-MEK-ERKシグナルを阻害することで抗癌作用を示すが、大腸癌において、EGFR伝達経路に関するKRAS遺伝子変異により、セツキシマブ抵抗性が生じることが明らかになってきた。

EV（細胞外小胞）は正常細胞およびがん細胞より放出される脂質二重層に囲まれた小胞であり、メッセンジャーRNA、マイクロRNA、DNA、脂質、転写因子が内包されている。EVが受容細胞に取り込まれることで生物学的な機能に影響を及ぼす。近年、EVが抗癌剤耐性に関与すること、EGFRを高発現する癌種がEGFRを含有する細胞外小胞（EGFR-EV）を放出することが明らかになってきたが、OSCC細胞の放出するEGFR-EVとセツキシマブの関連性についての情報は少ない。

上皮間葉転換（EMT）は悪性形質転換の一種であり、上皮細胞間の細胞接着が喪失し、細胞形態が変化し、運動性が増大することが知られている。EMTは、上皮系マーカーであるE-カドヘリンの発現減少および間葉系マーカーであるビメンチンの発現増加を特徴とする。前癌性細胞はしばしばEMTを示し、腫瘍環境内の細胞の遊走および浸潤を促進する。EGFRを高発現する癌細胞は、EGF刺激により、EMTを誘導することが知られているが、OSCC細胞の放出するEGFR-EVとセツキシマブ、およびEMTの三者の関連性についての情報は少ない。

そこで我々は、OSCC細胞が放出するEGFR-EVのセツキシマブ動態への関与およびEMTとの関連を検討した。

【材料と方法】

OSCC癌細胞株HSC-3にin vitroでEGFおよびセツキシマブを添加し、無血清で培養後に細胞画分とEV画分を調製し、エクソソームマーカーであるCD9, EGFRおよびセツキシマブ、間葉系細胞マーカーであるビメンチン, 上皮系細胞マーカーであるE-カドヘリン, をウェスタンブロット解析した。EMTは細胞長計測によっても評価した。EVは、培養上清からポリマー沈殿法変法にて調製し、透過型電子顕微鏡およびゼータサイザーを用いて解析した。

【結果】

最初に我々は、OSCC細胞が分泌するEGFR-EVのセツキシマブ動態への関与を評価した。研究結果は以下の内容であった。

①OSCC細胞を無血清培地で培養し、培養上清から細胞外小胞を回収したところ、粒子径の直径160nmの範囲に脂質二重層に囲まれた粒子の存在が確認でき、細胞外小胞の定義と一致した。

②OSCC細胞はEGF刺激下でEVの放出が促進され、ウェスタンブロット法(WB法)により抗EGFR抗体を反応させたところ、EV画分にEGFRが検出された。

③OSCC細胞にセツキシマブを投与し、無血清培地で培養後、細胞とEVを回収し、WB法にて抗EGFR抗体および抗IgG抗体を反応させたところ、EGFR-EVの発現量に変化は認められなかった。また、細胞画分およびEV画分においてセツキシマブが検出された。このことから、OSCC細胞はEVを介してセツキシマブを細胞外へ排出する可能性が示唆された。

次に、EGF誘導性のEMTの制御におけるEGFR-EVの関与を評価した。研究結果は以下の内容であった。

①OSCC細胞では、EGF刺激下で紡錘形を呈する細胞が増加した。WB法により抗E-カドヘリン抗体および抗ビメンチン抗体を反応させたところ、細胞画分で、E-カドヘリンの発現が減少し、ビメンチンの発現が増加した。

②OSCC細胞にセツキシマブを投与すると、EGF刺激下条件と比較し、紡錘形を呈する細胞数に有意差は認められなかった。WB法において、細胞画分のビメンチンは発現減少したが、E-カドヘリンの発現に変化は認められなかった。

③同細胞上清からEVを回収し、WB法にて抗セツキシマブ抗体を反応させたところ、EVとセツキシマブの結合が認められた。

【考察および結論】

以上のことから、OSCC細胞は、EGFR-EVを介してEGFR標的抗体薬セツキシマブを細胞外へと排泄し、セツキシマブが有するEMT阻害効果を抑制し、セツキシマブ耐性に寄与する可能性が示唆された。したがって、今回の研究から、OSCC細胞におけるEVを介したセツキシマブ耐性機序の一部が明らかとなった。

論文審査結果の要旨

抗 EGFR モノクローナル抗体であるセツキシマブは、癌細胞の EGF 受容体(EGFR)と結合することで抗癌作用を示す。しかし、EGFR を発現するにもかかわらず、セツキシマブに耐性を示す癌細胞の存在が報告されており、その機構解明が待たれている。近年、癌細胞が放出する細胞外小胞 (Extracellular vesicle :EV) が抗癌剤耐性に関与することが明らかとなってきたが、口腔扁平上皮癌 (Oral squamous cell carcinoma :OSCC) の放出する EGFR 含有細胞外小胞 (EGFR-EV) とセツキシマブの関連性についての報告はほとんどない。

本研究は、OSCC 細胞が放出する EGFR-EV がセツキシマブ排出に関与している可能性を考え、OSCC が放出する EV とセツキシマブの関連性について行った *in vitro* 研究である。

研究対象は EGFR を高発現する OSCC 細胞株である HSC-3 細胞を実験に用いた。HSC-3 細胞を無血清培地で培養し、EGF およびセツキシマブで処理した条件で行っている。回収した細胞と EV から蛋白を調整し、EV のマーカーである CD9 と EGFR およびセツキシマブ抗体を用いたウェスタンブロット (WB) 解析にてタンパク発現を検討している。セツキシマブによる抗癌作用は上皮間葉転換 (Epithelial mesenchymal transition :EMT) により検討している。EMT は、細胞を間葉系細胞マーカーであるビメンチン、上皮系細胞マーカーである E-カドヘリン抗体による WB 解析および細胞長計測により評価している。EV の同定は、透過型電子顕微鏡およびゼータサイザーを用いて評価している。

主要研究結果は以下の内容である。①HSC-3 細胞を無血清培地で培養し、培養上清から回収した EV は、粒子径の直径 160nm の脂質二重層に囲まれた粒子として確認でき、EV の定義と一致した。②HSC-3 細胞は EGF 刺激下で EGFR-EV の放出が促進していた。③HSC-3 細胞にセツキシマブを投与後、培養上清から回収した EV および細胞の両方の画分においてセツキシマブが検出された。④HSC-3 細胞では、EGF 刺激により、紡錘形を呈する細胞が増加し、細胞画分の E-カドヘリンの発現が減少し、ビメンチンの発現が増加した。

⑤セツキシマブを投与した場合、EGF 刺激下条件と比較し、紡錘形を呈する細胞数に有意差は認めず、細胞画分のビメンチンは発現減少したが、E-カドヘリンの発現に変化は認めなかった。また、同細胞上清から回収した EV 画分において、セツキシマブの検出を認めた。

以上の結果より、HSC-3 細胞は、EGFR-EV を介して EGFR 標的抗体薬セツキシマブを細胞外へと排出し、セツキシマブが有する EMT 阻害効果を抑制し、セツキシマブ耐性に関与する可能性が示唆された。

本論文は、抗癌剤に対する新たな排出機構の一部を明らかにした内容であり、それを標的とした新たな癌治療の開発につながる重要な知見を含んでいる。よって審査委員会は本論文に博士 (歯学) の学位論文としての価値を認める。