

氏名	清水 理恵子
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6154号
学位授与の日付	令和2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	The role of nicotine in metastasis and anticancer drug resistance of head and neck squamous cell carcinoma (頭頸部扁平上皮癌の転移と抗癌剤耐性におけるニコチンの役割)
論文審査委員	柳 文修 教授      飯田 征二 教授      十川 千春 准教授

## 学位論文内容の要旨

### 【緒言】

タバコの主要成分の1つであるニコチンは、喫煙により肺胞や口腔粘膜から吸収され、血液中に移行する。血液中のニコチンは、中枢神経系のニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) に結合し、タバコ依存に関与する。nAChRは中枢神経系を中心に、癌細胞を含む様々な非神経細胞にも存在することが明らかとなった。最近の研究ではニコチンがnAChRを介し、乳癌や肺癌の転移と抗癌剤耐性に寄与することが報告されている。しかしタバコ煙に最初に曝露される頭頸部領域においては、ニコチン-nAChRのシグナル伝達を利用し、転移および抗癌剤に対する耐性を獲得できるかどうかは不明のままである。よって本研究では頭頸部扁平上皮癌 (HNSCC) 細胞の転移と抗癌剤耐性におけるニコチンの役割について検討した。

### 【方法と結果】

#### 1) 頭頸部扁平上皮癌細胞における nAChR の発現

頭頸部扁平上皮癌細胞株である HSC-2, HSC-3, OSC-19, OSC-20 及びヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)における nAChR の発現をウエスタンブロット法を用いて検討した。いずれの細胞株においても陽性対照群である HUVEC よりも強い nAChR の発現を認めた。

#### 2) ニコチンが頭頸部扁平上皮癌細胞に与える影響

In vitro では HSC-3 細胞, OSC-19 細胞の培養液中に nAChR の非選択的阻害薬であるメカミラミン塩酸塩(MCA),  $\alpha 7$  選択的阻害薬である  $\alpha$ -ブンガロトキシシン( $\alpha$ -BTX), セツキシマブを添加した後に、ニコチンを添加し、cell proliferation assay で

増殖能, migration assay で遊走能, invasion assay で浸潤能を評価した。両細胞株においてニコチン投与群が対照群と比べて有意に増殖能, 遊走能, 浸潤能を促進していたが, MCA,  $\alpha$ -BTX はその効果を抑制した。MCA,  $\alpha$ -BTX のみを投与した群では, 対照群と比べ有意な差を認めなかった。またセツキシマブ投与群は, 対照群と比べ有意に増殖能, 遊走能, 浸潤能を抑制したが, ニコチンはその効果を解消した。

### 3) 頭頸部扁平上皮癌リンパ節転移動物モデルにおけるニコチンの影響

ニコチンの頭頸部扁平上皮癌細胞株における腫瘍増殖及びリンパ節転移への影響について, 頭頸部扁平上皮癌リンパ節転移動物モデルを作製し, *in vivo* にて検討を行った。BALB/c 系 nu/nu マウスの足底皮下に OSC-19 を移植し, 連日 MCA, セツキシマブを投与後に, ニコチンを投与し, 腫瘍体積を経時的に計測した。ニコチン単体投与群は対照群と比べて有意に腫瘍体積が増大していたが, MCA はその効果を抑制した。またセツキシマブ単体投与群は, 腫瘍体積の増大を抑制したが, ニコチンはその効果を減弱した。OSC-19 移植 6 週間後にマウスを屠殺し, 移植部と膝下リンパ節を組織学的に検討した。ニコチン単体投与群は対照群に比べて移植部におけるリン酸化 EGFR 核内陽性率の割合が増加していたが, MCA はその効果を抑制した。またニコチン投与群では対照群に比べ, 膝下リンパ節への転移の頻度が増加していたが, MCA はその効果を抑制した。セツキシマブ単体投与群とセツキシマブ及びニコチン投与群においては, リンパ節転移を認めなかった。

#### 【考察】

本研究において, ニコチンは頭頸部扁平上皮癌細胞の増殖能, 遊走能, 浸潤能を有意に促進した。さらにその効果は, nAChR の非選択的阻害剤である MCA や  $\alpha$ 7nAChR 選択的阻害剤である  $\alpha$ -BTX 添加により阻害された。今回, 頭頸部扁平上皮癌細胞において  $\alpha$ 7nAChR の発現が強く認められた。 $\alpha$ 7nAChR は, 肺癌や大腸癌において細胞増殖に関与すると報告されている。ニコチンによる頭頸部扁平上皮癌細胞の増殖能, 遊走能, 浸潤能の亢進は  $\alpha$ 7nAChR を介していることが示唆された。

抗ヒト EGFR キメラ化モノクローナル抗体セツキシマブは, 頭頸部癌初の分子標的治療薬として世界的に注目を浴びている。本研究では, セツキシマブによって抑制されていた頭頸部扁平上皮癌細胞の増殖能, 遊走能, 浸潤能がニコチンによって上昇していた。リンパ節転移動物モデルにおいては, ニコチンは腫瘍を増大させ, リン酸化 EGFR の核内移行を促進した。EGFR がニコチンにより核内移行すると, セツキシマブが結合できなくなるため, セツキシマブの抗腫瘍効果を減弱させると推察された。

またリンパ節転移動物モデルにおいて, ニコチンはリンパ節転移を促進した。*in vitro* でもニコチン投与群が対照群と比較して, いずれの細胞株においても増殖能, 遊走能, 浸潤能を促進していたことから, リンパ節転移の促進は, ニコチンによる細胞活性の上昇によるものと考えられた。

今回 nAChR 阻害のため使用した MCA は, *in vitro*, *in vivo* とともにニコチンの効果を

抑制した。MCA は降圧薬として古くから知られており，安全性が高い。喫煙している頭頸部扁平上皮癌患者の転移抑制や抗癌剤の感受性増強などへの応用，いわゆるドラッグリポジショニングの可能性があると考えられた。

## 論文審査結果の要旨

タバコ主流煙の主要成分であるニコチン(Nic)は、喫煙により肺胞や口腔、気道、胃、腸管の粘膜から吸収され、血液中に移行する。血液中の Nic は、中枢神経系のニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) に結合することによって依存を生じるとされる。最近の研究では、Nic が nAChR を介し、乳癌や肺癌の転移や抗癌剤耐性に関与することが明らかとなっている。

本研究は、喫煙が発癌因子の一つとされる頭頸部扁平上皮癌における転移と抗癌剤耐性発現への Nic の関与について検討したものである。

5種の HNSCC 細胞株(HSC-2, HSC-3, OSC-19, OSC-20)を使用し、nAChR 発現の有無についての確認後、HSC-3, OSC-19 細胞株を使用し、Nic による細胞増殖能、遊走能、浸潤能への影響を検討していた。さらに、BALB/c 系 nu/nu マウスの足底皮下に OSC-19 を移植後、経時的な腫瘍体積の測定を行い、移植部と膝下リンパ節転移の有無について組織学的に検討していた。

主要研究結果は以下の内容である。HNSCC 細胞株すべてにおいて、陽性対照群であるヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)よりも高い nAChR の発現を認めた。Nic は増殖、遊走、浸潤能をすべて促進し、これらの作用は非選択的 nAChR 阻害薬であるメカミラミン(MCA)、および  $\alpha 7$  サブユニット選択的阻害薬  $\alpha$ -ブングロトキシンによって抑制された。一方、頭頸部癌初の分子標的治療薬であるセツキシマブ(Cmab)は HNSCC の増殖能、遊走能、浸潤能を抑制したが、Nic は Cmab の効果を減弱した。リンパ節転移動物モデルにおいては、Nic により腫瘍増大および、膝下リンパ節への転移促進がみられ、この作用は MCA によって抑制された。また、Nic は Cmab による腫瘍形成抑制効果を減弱した。さらに、Nic による腫瘍細胞におけるリン酸化 EGFR の核内移行が認められた。

Nic は HNSCC において、細胞増殖、遊走、浸潤、転移を促進し、その作用には  $\alpha 7$ nAChR が関与することが明らかとなった。さらに、Nic による Cmab の抗癌作用減弱には、Nic による EGFR 核内移行促進作用の関与が示唆された。また、Nic の HNSCC 腫瘍増大作用を抑制した MCA はすでに安全性の高い降圧薬として使用されており、Nic により惹起される腫瘍の悪性能の促進および治療抵抗性に対する有用な治療薬として、いわゆる Drug repurposing (既存薬再配置)としての臨床応用が期待される。

本論文は Nic による HNSCC の転移促進と抗癌剤耐性が nAChR を介していることを明らかとし、nAChR が頭頸部癌治療における標的となる可能性を示唆するものであり、極めて有用な知見を与えている。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。