

氏 名	梅森 洸樹
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7008号
学位授与の日付	令和6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	EpEX, the soluble extracellular domain of EpCAM, resists cetuximab treatment of EGFR-high head and neck squamous cell carcinoma (EpCAMの可溶性細胞外ドメインであるEpEXは、EGFR高発現頭頸部扁平上皮癌のセツキシマブ治療抵抗性に関与する)
論文審査委員	沢 楨彦 教授 飯田 征二 教授 中野 敬介 准教授

学位論文内容の要旨

目的：セツキシマブ (Cmab) は頭頸部扁平上皮癌 (HNSC) に使用可能な分子標的薬である。上皮成長因子受容体 (EGFR) に結合することで抗腫瘍効果を発揮するが、再発および転移HNSCに対する耐性と低奏効率が深刻な課題である。上皮細胞接着分子 (EpCAM) は細胞膜貫通型糖タンパク質であり、接着因子として正常細胞に発現する一方で、多くの上皮性悪性腫瘍のマーカーとして確立されている。EpCAMの細胞外ドメイン (EpEX) はEGFRのリガンドとしてEGFRシグナル伝達経路を活性化することが報告されている。またその際、腫瘍細胞の細胞膜上に存在するEpCAMは切断を受け、細胞内ドメイン (EpICD) は核内へと移行し、腫瘍の進展に関与することが報告されている。本研究では、Cmabと同じくEGFRを標的とするEpEXがCmab耐性に関与していると考え、HNSCにおけるEpCAMの発現やCmab作用との関与、さらにEpEXによるEGFRシグナル伝達の活性化がCmab耐性に果たす役割についてその機序に着目し検討した。

材料と方法：まず、遺伝子発現アレイデータベース (TCGA data base, Onco DB, cBioportal) の検索と、HNSC Tissue microarray を用いた免疫組織化学染色により正常組織と腫瘍組織におけるEpCAMの発現率を比較した。また発現群については、病期、全生存期間、リンパ節被膜外浸潤、組織学的悪性度などの病理学的因子との相関性を検討した。次に、*In-vitro* においてHNSC細胞

株（HSC-3 と SAS）に対して EpEX を作用させ、EGFR-ERK 経路の活性化および EpICD の核内移行について検証した。また、EpEX が HNSC 細胞の Cmam 感受性に与える影響については、MTT assay による細胞生存率の評価および HNSC スフェロイドモデルを作製し、EpEX、Cmam 投与時のスフェロイドの形態変化や内部の低酸素領域に着目し評価した。

結果：データベース解析およびTissue microarrayを用いた免疫組織化学染色の結果、HNSC腫瘍組織では正常組織と比較してEpCAMの発現が亢進しており、その亢進は病期の進行や予後、腫瘍の悪性度と相関していた。またEpEXは、HNSC細胞においてEGFR-ERKシグナル伝達経路を活性化させ、それに伴いEpICDの核内移行が促進した。さらに、HNSC細胞に対するEpEXおよびCmamの同時投与時の細胞生存率は、Cmam単独投与時と比較して有意な増加を認めたことに加えて、HNSCスフェロイドモデルを用いた検証では、Cmamによるスフェロイド崩壊がEpEXの投与により抑制されたとともに、低下したスフェロイド内の低酸素領域が有意に回復されたことから、EpEXはCmamの抗腫瘍効果を有意に抑制した。

考察：HNSC における EpCAM の発現亢進が組織学的悪性度と相関していることから、EpCAM は HNSC の予後不良マーカーとして有用と考えられる。EpEX が EGFR-ERK シグナル伝達経路を活性化させ、EpICD の核内移行が亢進したことや Cmam の抗腫瘍効果を抑制したことを考慮すると、Cmam 耐性獲得機序には EpEX が Cmam に対して競合的拮抗作用を発揮すること、また EpICD の核内移行が関与していると考えられた。

結論：EpEX は EGFR-ERK 経路を活性化し、HNSC 細胞の Cmam 耐性を促進することが示された。この EpEX 誘導性の Cmam 耐性は、EGFR-ERK シグナル伝達経路の活性化および EpCAM の切断によって誘導される EpICD の核内移行によって引き起こされる可能性が明らかとなった。したがって、EpCAM は Cmam の抗腫瘍効果を補完する新規薬剤の開発や薬剤耐性を予測するための潜在的なバイオマーカーに応用できる可能性がある。

論文審査結果の要旨

【緒言】分子標的薬セツキシマブ（Cmab）は頭頸部扁平上皮癌（HNSC）に使用される。Cmab は上皮成長因子受容体（EGFR）に結合し、抗腫瘍効果を発揮するが、再発および転移 HNSC に対する耐性と低奏効率が問題となっている。HNSC に高発現する上皮細胞接着分子（EpCAM）は、細胞外ドメイン EpEX が EGFR のリガンドとして EGFR シグナル伝達経路を活性化させ、腫瘍細胞の EpCAM は細胞内ドメイン EpICD が核内に移行し、腫瘍細胞の増殖、転移などに関与するとされる。そこで、EpEX が HNSC の EGFR に結合し、Cmab の EGFR 結合を阻害する Cmab 耐性機序を考えた。本研究では、HNSC における EpCAM の発現、EpEX による EGFR の活性化が Cmab 耐性獲得に果たす役割について検討した。

【方法】HNSC 遺伝子アレイデータベース (TCGA data base, Onco DB, cBioportal) で正常組織と腫瘍組織における EpCAM の発現率を比較し、発現群の病期、全生存期間、組織学的悪性度などとの相関性について、Kaplan–Meier テスト、Pearson’s Chi-square test や Fisher’s exact test などを使用し、統計学的に分析した。また、HNSC 細胞株に EpEX を作用させ、EGFR-ERK 経路の活性化を Western-blot にて評価した。EpEX 投与時の EpICD の核内移行については Western-blot に加えて蛍光免疫染色法により評価した。HNSC 細胞に対する Cmab 感受性試験は、EpEX および Cmab 同時投与時の細胞生存率を MTT assay にて検証し、また HNSC スフェロイドモデルに対し、内部の低酸素領域を定量化することで評価した。

【結果】HNSC 腫瘍組織では正常組織と比較して EpCAM の発現が亢進しており、全生存期間、病期、組織学的悪性度と相関していた。また、EpEX は HNSC 細胞において EGFR-ERK シグナル伝達経路を活性化させ、EpICD の核内移行を誘導した。さらに、EpEX および Cmab の同時投与時の HNSC 細胞生存率は、Cmab 単独投与時と比較して有意な増加を認め、スフェロイドモデルでは Cmab により低下した低酸素領域が EpEX の投与により有意に回復したことから、EpEX による Cmab 抗腫瘍効果の抑制が確認された。

【考察】HNSC における EpCAM の発現亢進が組織学的悪性度と相関していることから、EpCAM は HNSC の予後不良マーカーとして有用である。EpEX は HNSC 細胞に対する Cmab の抗腫瘍効果を抑制し、EpEX が EGFR-ERK シグナル伝達経路を活性化したことや EpICD の核内移行が亢進したことを考慮すると、Cmab 耐性獲得機序には EpEX が Cmab に対して競合的拮抗作用を発揮すること、また EpICD の核内移行に伴う転写調節が関与することが考えられた。

本論文は、EpCAM による Cmab の抗腫瘍効果の抑制という新しい知見を示す画期的な研究であり、Cmab の抗腫瘍効果を補完する新剤開発やバイオマーカーへの応用の可能性を示している。Oral Oncology に受理され国際的に評価されていることも併せて、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。