

氏 名	小川 辰雄
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7009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	頭頸部扁平上皮癌における細胞外小胞と銅輸送経路が関与するシスプラチン耐性の新しいメカニズム
論文審査委員	長塚 仁 教授 岡元 邦彰 教授 天野 克比古 准教授

学位論文内容の要旨

【目的】

頭頸部扁平上皮癌（HNSCC）の標準的治療は外科的切除であり、根治的治療を目的としている。しかし、進行癌に対する外科的切除による広範囲な損傷は、患者の口腔機能や審美性に大きな悪影響を及ぼし、患者のQOLを著しく低下させる。このような問題点を考慮し、HNSCCに対する非侵襲的治療として、抗がん剤による化学療法や放射線療法も行われている。HNSCCに対する併用化学療法は進行症例の全生存期間を改善することが期待されている。しかし、治療法の進歩にもかかわらずHNSCCの治療成績はほとんど向上していない。

CDDP 耐性のメカニズムについてはいくつかの可能性が検討されており、そのうちの一つに、銅輸送経路の関係が報告されている。銅輸送経路のうち、ATPase copper transporting alpha (ATP7A) と ATPase copper transporting beta (ATP7B) が CDDP の細胞外排出に関与していることが示唆されている。

細胞外小胞 (EV) は、多くの種類の細胞から放出される脂質二重膜構造を有する小胞であり、血清、尿、唾液、牛乳など、すべての体液中に存在するとされている。特に HNSCC では、唾液中の EV が診断バイオマーカーとして有用である可能性が多くの研究で報告されている。それとともに、EV が細胞間コミュニケーションの重要なメディエーターとして機能することを示す報告も増えている。EV の機能の根底にあるメカニズムは、タンパク質、膜受容体、mRNA、マイクロ RNA などの様々な内因性分子をドナー細胞からレシピエント細胞に輸送することによって、レシピエント細胞に直接的な作用をすることが報告されており、腫瘍由来の EV は、化学療法抵抗性に関与していることも報告されている。

当分野において、HNSCC 細胞が上皮成長因子受容体 (EGFR) を含む EV を分泌し、それが抗 EGFR 抗体セツキシマブに対する抵抗性を付与するメカニズムを明らかにした。HNSCC の腫瘍制御と進行における EV の役割に関しては解明されていない点が多くあり、銅の輸送経路と EV を関連付けた発表報告は見つかっていない。

本研究では HNSCC における EV と銅輸送経路を介した CDDP 耐性のメカニズムを解明するために行った。

【方法】

当分野にて HNSCC 細胞を用いて CDDP 耐性亜株を作成した。各細胞の ATP7B 発現量を western blot(WB) と蛍光免疫染色(IC) を用いて検討した。さらにそれぞれの細胞での CDDP 殺細胞効果を WB と MTT アッセイを用いて検討した。次に shRNA を用いて ATP7B ノックダウンによる CDDP 作用の変化と EV 生成量の変化を検討した。

ノックダウン効率は WB と IC を用いて検討した。EV 生成量は細胞全タンパク量と EV タンパク量を比として算出した。次に、EV の生成抑制により ATP7B 発現量が低下するかを検討した。EV 生成抑制は中性スフィンゴミエリナーゼ阻害薬 (GW4869) を用いた。前述と同様の方法で EV 生成量と ATP7B 発現量を検討した。さらに、EV の抑制は CDDP 殺細胞効果を高めるか検討した。WB, IC を用いて検討した。いずれの実験系においても、統計学的優位差は Excel と GraphPad Prism8 を用いて行った。統計学的解析は 2 つのデータセット間の差を Welch の t 検定で、3 つ以上のデータセット間の差を Kruskal-Wallis 検定を用いて解析した。

【結果】

組織マイクロアレイでは癌進行度と ATP7B 発現量に正の相関関係を認めた。CDDP 耐性亜株を用いた検討では、ATP7B の高発現は CDDP 殺細胞効果の減弱を認めた。shRNA 導入による ATP7B の発現抑制は CDDP の効果を高めた。さらに、EV 分泌の抑制を認めた。EV 生成阻害剤である GW4869 は、EV の生成抑制と同時に ATP7B の発現抑制を認め、GW4869 と CDDP の併用は CDDP の殺細胞効果を高めた。

銅トランスポーターATP7B が CDDP 耐性 HNSCC 細胞で高発現しており、EV を介した薬剤耐性機構と関連していることが示された。

【考察】

本研究の結果より、ATP7B の発現量の増減が CDDP 治療の奏効に大きく関与する可能性があること示した。さらに、ATP7B の発現抑制が CDDP の殺細胞効果を増強したことに加え、EV 分泌を抑制したことから、ATP7B が CDDP 効果や EV 分泌の重要な調節因子であると考えた。

【結論】

HNSCC の CDDP 治療において、EV 生成阻害剤の併用は ATP7B の発現を抑制し、上乗せ効果を期待した新規補助的治療選択肢となる可能性がある。

論文審査結果の要旨

【緒言】頭頸部扁平上皮癌 (Head and Neck Squamous Cell Carcinoma : HNSCC) の治療は、いくつかの方法があるが、近年のHNSCCの治療成績はほとんど向上していない。その原因の一つとして、抗癌剤に対する治療抵抗性が挙げられる。癌の進行過程において、腫瘍微小環境の変化と連動して治療抵抗性獲得に関与するのか未だ不明な点が多い。本研究では、HNSCCにおける細胞外小胞 (Extracellular Vesicles : EV) と銅輸送経路を介したシスプラチン (Cis-diaminedichloroplatinum : CDDP) 耐性のメカニズムを解明し、CDDP耐性を克服する新たな治療戦略を探る事を目的とした。研究の方法と結果は以下のとおりであった。

【方法】組織マイクロアレイにてHNSCCの進行とATPase copper transporting beta (ATP7B) の発現量の相関関係について免疫組織化学染色法を用いて比較検討した。HNSCC細胞株 (SAS, HSC-3, HSC-4) を用いてwestern blotting法 (WB) でATP7Bの発現量を比較検討した。HNSCC細胞株からSASとHSC-3を選択し、それぞれのCDDP耐性株を作成した。耐性獲得はアポトーシスの誘導をcleaved caspase-3で評価しWBで確認した。さらに蛍光免疫細胞染色 (Immunocytochemistry : IC) を用いてATP7Bの発現量を確認した。HNSCC細胞にエレクトロポレーション法を用いてATP7BshRNAトランスフェクションを行なった。導入効率はWBとICを用いて確認した。トランスフェクションした細胞からEVを回収しEV分泌量の変化を検討した。EV分泌阻害剤を用いてHNSCCのEV分泌減少による発現分子の変化をWBとICを用いて確認した。トランスフェクションしたHNSCC細胞とEV分泌阻害を行なったHNSCC細胞にCDDPを暴露し、細胞生存率の変化を検討した。細胞生存率とEV分泌量はそれぞれ統計学的解析を用いて有意差を算出した。

【結果】HNSCCの進行はATP7B発現の増加を認めた。耐性株ではATP7B発現が増加することを認めた。ATP7B発現抑制はCDDPの感受性を増強するとともにEV分泌量の減少を認めた。EV分泌阻害剤はEV分泌量を減少させるとともに、ATP7B発現抑制を認めた。さらにEV分泌阻害剤とCDDPの併用はCDDPの殺細胞効果を増強することを認めた。

【考察】EV分泌阻害剤によるATP7B発現抑制とATP7BshRNAトランスフェクションによるEV分泌抑制という結果はATP7BとEVによる相補的な補完をしている可能性が示唆された。さらにEV分泌の阻害によるATP7Bの減少はEV内在分子による腫瘍微小環境の変化をもたらす可能性が示された。本研究結果は、抗癌剤治療において新規補助的治療戦略となる可能性を認めた。

本論文は癌化学療法による新規治療戦略になる可能性が認められる。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。