

氏 名	吉田 国弘
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7012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	Rab11 Suppresses Head and Neck Carcinoma by Regulating EGFR and EpCAM Exosome Secretion (Rab11 は EGFR 発現と EpCAM 含有エクソソームの分泌を制御することで頭頸部癌を抑制する)
論文審査委員	岡村 裕彦 教授 西田 崇 准教授 天野 克比古 准教授

学位論文内容の要旨

【緒言】

頭頸部癌の進行例の多くは顎骨浸潤を伴うことが多く、患者の Quality of Life (QOL)を低下させ、予後も非常に悪い。この顎骨への浸潤はカテプシン K (Cathepsin K: CTSK) やマトリックスメタロプロテアーゼ (Matrix Metalloprotease: MMP) などの関与が知られている。また近年、CTSK や MMP に加えて、がん細胞の浸潤や転移における細胞外小胞 (Extracellular Vesicle: EV) の役割も注目されている。EV は、内包する RNA、タンパク質、脂質などの分子を、局所や遠隔組織の受容細胞に転送することで、腫瘍微小環境や前転移ニッチを形成し、腫瘍の増殖や浸潤、さらには転移をコントロールしていると言われている。この EV の分泌機構には、細胞内小胞輸送分子 Rab タンパク質、特に Rab11 (Rab11a, Rab11b) が深く関与しているが、その制御機構は不明な点も多い。一方、癌の細胞増殖や浸潤に関与している上皮成長因子受容体 (Epithelial Growth Factor Receptor : EGFR) も、細胞膜への輸送やそのリサイクリングに Rab11 が関与している。そこで我々は、Rab11 が細胞膜上の EGFR 発現とリサイクリング、EV 中に内包されたタンパク質を調節することによって、癌細胞を制御しているという仮説を立て、癌細胞の増殖や遊走、浸潤における Rab11 の役割を検討した。

【方法】

HNSCC 細胞株 (SAS, Ca9-22, OSC-19, HSC2, HSC3 and HSC4) を用い、Rab11a と Rab11b の発現をウェスタンブロット (WB) 法により確認し、その後の実験に使用する細胞として、SAS 細胞を選択した。同時に、SAS 細胞をヌードマウスへ移植 (岡山大学動物実験委員会承認 : OKU-2023554) し、Rab11 の発現および局在を免疫組織学的に解析した。また、レトロウイルスを用いた Rab11a および Rab11b の過剰発現株と、short heapin (sh)RNA を用いた発現抑制株を作製し、癌細胞の増殖能・遊走能・浸潤能へ与える影響を検討した。さらに、それぞれの変異細胞株において、癌の細胞増殖や浸潤に関与している EGFR の発現を WB 法にて調べるとともに、EV を採取し、電子顕微鏡

解析 (TEM) と Zetasizer Nano ZSP を用いた粒子径の解析、さらには、EV のマーカートンパク質である EpCAM と CD9 の発現を WB 法にて行った。最後に、公共データベース解析 (Kaplan・マイヤー法) と組織マイクロレイによる免疫組織学的解析により、頭頸部癌における Rab11b 発現の臨床的意義を検討した。

【結果】

ヌードマウスを用いた in vivo 実験では、Rab11a、Rab11b とともに腫瘍と上皮の境界あたりに発現していた。Rab11a または Rab11b の発現抑制株では、SAS 細胞の遊走能と浸潤能が促進されており、EGFR の発現には有意な差は認められなかったが、EpCAM/CD9 を内包したエクソソームの分泌が増加していた。一方、Rab11a または Rab11b を過剰発現株においては、SAS 細胞の遊走能と浸潤能が抑制され、EGFR の発現も有意に低下、EpCAM/CD9 を内包したエクソソーム分泌も低下した。Kaplan・マイヤー法では、Rab11b mRNA 発現が HNSCC の患者生存率の向上と有意に関連することが明らかになった。また、組織マイクロレイ解析から、Rab11b の発現は正常組織で最も高く、HNSCC の悪性度が進行するに従って、徐々に発現が減少することが明らかになった。

【考察】

Rab11 は細胞内タンパクだけでなく、膜受容体、分泌タンパク質など、様々な分子の膜輸送機構に関わっており、物質の輸送にはなくてはならないタンパク質の一つである。一般に、Rab11 を過剰発現させると、細胞内および細胞外への様々な輸送が促進され、癌の増殖や浸潤が促進する報告がある。しかし、今回の研究において、頭頸部癌においては、反対の機構が働いている可能性が示唆された。

【結論】

Rab11 は、HNSCC 細胞における細胞膜上の腫瘍受容体のリサイクルを制御するとともに、エクソソームの分泌を阻害し、癌細胞の遊走能や浸潤能を抑制し癌抑制因子として働くことが明らかにされた。特に、Rab11b の発現レベルは HNSCC の予後改善と相関していることから、Rab11 は HNSCC の潜在的な予後指標であり、予後予測の指標や新規治療標的分子となりうると考えられた。

論文審査結果の要旨

【緒言】

Small GTPase Rab タンパク質は細胞内小胞輸送を制御しており、特に Rab11 (Rab11a, Rab11b) は膜タンパク質のリサイクリングや細胞外小胞 (Extracellular Vesicles: EVs) の分泌に深く関与しているが、その制御機構は不明な点も多い。癌における、膜タンパク質発現や EVs の分泌は腫瘍の増殖や浸潤、転移を制御していると言われている。そこで本研究では、頭頸部癌における Rab11 の役割とその制御機構を検討した。

【方法】

頭頸部扁平上皮癌 (HNSCC) 細胞の 1 つである SAS 細胞を用いて Rab11a および Rab11b の過剰発現株と、発現抑制株を樹立した。それぞれの細胞株を用いて、CCK-8 を用いた増殖アッセイ、スクラッチアッセイ、マトリゲルインベージョンチャンバーを用いた浸潤アッセイを行い、増殖能・遊走能・浸潤能を比較検討した。また、上皮成長因子受容体 (Epithelial Growth Factor Receptor : EGFR) の発現を Western Blotting (WB) 法にて調べるとともに、EVs を採取し、電子顕微鏡解析と Zetasizer Nano ZSP を用いた粒子径解析、さらには、EVs のマーカータンパク質である EpCAM と CD9 の発現を WB 法にて調べた。最後に、公共データベース解析と組織マイクロアレイによる免疫組織学的解析により、頭頸部癌における Rab11 発現の臨床的意義を検討した。

【結果】

Rab11a および Rab11b の発現抑制株では、SAS 細胞の遊走能と浸潤能が促進されており、EGFR の発現には有意な差は認められなかったが、EpCAM/CD9 を内包した EVs の分泌が増加していた。一方、Rab11a および Rab11b の過剰発現株においては、SAS 細胞の遊走能と浸潤能が抑制され、EGFR の発現も有意に低下、EpCAM/CD9 を内包した EVs の分泌も低下していた。公共データベースを用いた Kaplan-Meier 法では、Rab11b mRNA の発現低下が頭頸部癌の患者生存率低下と有意に相関していた。また、組織マイクロアレイ解析から、Rab11b の発現は正常組織で最も高く、頭頸部癌のステージが進行するに従って、発現が低下していた。

【考察】

Rab11 は、HNSCC 細胞における EGFR の膜へのリサイクルを制御するとともに、EpCAM/CD9 を内包した EVs の分泌を阻害することで、癌細胞の遊走能や浸潤能を抑制し、癌抑制因子として働くことが明らかにされた。特に、Rab11b の発現レベルは頭頸部癌の予後と相関していることから、Rab11 は頭頸部癌の新規治療薬や新規腫瘍マーカーを開発するうえで有用な情報となると考えられる。

本研究は、頭頸部癌における Rab11 の機能を基礎的に解析したものであり、得られた成果は、すでに Journal of Oral Biosciences に受理され、国際的にも評価されている。

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。