

氏 名	大道 培
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7441号
学位授与の日付	令和 8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	口腔扁平上皮癌におけるインテグリン $\alpha\text{v}\beta 5$ の発現と腫瘍浸透ペプチド iRGD による抗腫瘍効果の解析
論文審査委員	長塚 仁 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：口腔扁平上皮癌における化学療法のkey drugはシスプラチン(CDDP)であるが，腎毒性があるため腎機能低下を有する症例では適応困難であり，また腎毒性により治療が中断されることも少なくない．これに代わる治療法は未だ限られており，より効果的かつ安全性の高い治療戦略の開発が求められている．腫瘍組織におけるインテグリン $\alpha\text{v}\beta 5$ の発現は膵管腺癌や肺扁平上皮癌で予後不良因子と報告されているが，口腔扁平上皮癌ではその役割は明らかでない．腫瘍浸透ペプチドiRGDは膵管腺癌におけるインテグリン $\alpha\text{v}\beta 5$ を標的として作られたペプチドであり，iRGDと共に投与した薬剤の腫瘍組織への浸透を促進する．本研究では，口腔扁平上皮癌細胞におけるインテグリン $\alpha\text{v}\beta 5$ 発現と予後との関連などの未だ解明されていない基礎的事項を明らかにし，CDDP単独療法とiRGD併用療法における抗腫瘍効果の差異を*in vitro*および*in vivo*で検討し，iRGDによる口腔扁平上皮癌に対する新たな治療法の可能性を検討することを目的とした．

方法：当科で手術を施行した口腔扁平上皮癌の切除標本を用い，免疫組織化学染色を行った．マウスおよびヒトの口腔扁平上皮癌細胞株を培養し，インテグリン $\alpha\text{v}\beta 5$ の発現解析を行った．さらにインテグリン $\alpha\text{v}\beta 5$ 陽性のマウス口腔扁平上皮癌細胞株SCC7を用いて，CDDP単独またはCDDPおよびiRGD処理を行い，細胞増殖能，細胞代謝の評価，アポトーシス誘導の解析を行った．また，マウス背部にSCC7を移植し，CDDP単独またはCDDPおよびiRGDの投与を行い，経時的に腫瘍径を測定し，抗腫瘍作用を評価した．

結果：

1. 口腔扁平上皮癌切除標本におけるインテグリン $\beta 5$ の発現

当科で手術を施行した口腔扁平上皮癌の切除標本を用いて，インテグリン $\beta 5$ の発現について解析したところ，ほとんどの切片においてインテグリン $\beta 5$ の発現が認められた．また，染色切片を低発現群と高発現群に分けて，Kaplan-Meier 解析を行ったところ，インテグリン $\beta 5$ 高発現群は低発現群と比較して5年生存率が低い傾向を示した．

2. マウス口腔扁平上皮癌細胞株，ヒト口腔扁平上皮癌細胞株におけるインテグリン $\alpha\text{v}\beta 5$ の発現解析

口腔扁平上皮癌細胞株におけるインテグリン $\alpha\text{v}\beta 5$ の発現解析を，マウス口腔扁平上皮癌細胞株 (SCC7, MOC1, MOC2)およびヒト口腔扁平上皮癌細胞株(HSC-2, HSC-3, HSC-3M3, HSC-4, SAS)を用いて実施した．インテグリン $\alpha\text{v}\beta 5$ 複合体はインテグリン αv サブユニットと $\beta 5$ サブユニットで構成されており，インテグリン $\beta 5$ は αv とのみヘテロダイマーを形成して機能する．そのため，最初にインテグリン $\beta 5$ の発現をウェスタンブロッティング法で確認したところ，すべての細胞株で発現を認めた．一方，インテグリン $\alpha\text{v}\beta 5$ 複合体の発現をフローサイトメトリーで解析したところ，陽性と陰性の細胞株を認めた．また，蛍光免疫細胞化学染色においてはフローサイトメトリーと同様に，SCC7

では陽性であったが、MOC2では陰性を示した。さらに同じ細胞株でも発現強度の差を認め、インテグリンは接着分子であることから、経時的に変動する可能性を考えた。そこで、インテグリン $\beta 5$ の発現をウェスタンブロッティング法で SCC7において経時的解析を行った結果、培養初期では弱く、時間経過とともに増強を認めた。

3. インテグリン $\alpha v\beta 5$ 陽性細胞株に対するCDDPおよびiRGD併用による抗腫瘍効果の評価

インテグリン $\alpha v\beta 5$ 陽性細胞であるSCC7細胞を用いて、CDDP単独またはCDDPおよびiRGD処理を行い、*in vitro*で細胞増殖能、細胞代謝の評価、アポトーシス誘導を評価した。細胞増殖解析において、低濃度CDDP条件下ではiRGD併用培養により細胞増殖能の低下を認め、MTTアッセイでは細胞代謝の低下が確認された。また、cleaved-caspase 3発現の増強からアポトーシスが促進されることが示された。

4. 癌細胞株皮下移植マウスモデルにおけるCDDPおよびiRGD併用による抗腫瘍増強作用の有無

C3H/HeNjclマウスの背部にSCC7を移植し、マウス腫瘍モデルを作製した。その後7日目から CDDP(5mg/kg/week)を腹腔内投与し、同時にiRGD (300 μ g/25g/week)を静脈投与した結果、CDDP単独群はPBS群に比べ有意な抗腫瘍効果を示し、さらにiRGD併用群ではCDDP単独群と比較し、より強い抗腫瘍効果を示した。

考察：本研究では、マウスおよびヒト口腔扁平上皮癌細胞株、さらに臨床検体においてインテグリン $\alpha v\beta 5$ の発現を確認した。インテグリン $\beta 5$ においては、SCC7では経時的に増強することを示した。これはインテグリン $\alpha v\beta 5$ が腫瘍進展や細胞生存に関与する可能性を示唆する。機能解析では、CDDPおよびiRGDの併用により細胞増殖抑制とアポトーシスの促進が増強された。また、マウス腫瘍モデルにおいてCDDPおよびiRGD併用療法で有意な抗腫瘍作用を認めた。以上より、iRGDによる臨床応用が可能となれば、副作用を抑えつつ、より強い抗腫瘍作用を有する治療の選択肢が広がる可能性が期待できる。

論文審査結果の要旨

【緒言】口腔扁平上皮癌(OSCC)の化学療法ではシスプラチン(CDDP)がkey drugであるが、腎障害などの副作用が知られている。腫瘍浸透ペプチドiRGDはインテグリン $\alpha v\beta 5$ を介してCDDPなどの併用薬剤の腫瘍への浸透を促進することが報告されている。iRGDを併用することで、CDDPの効果を保ちつつ、その使用量を減少できる可能性から、本研究ではOSCCにおけるインテグリン $\alpha v\beta 5$ 発現を明らかにするとともに、iRGD併用によるCDDPの抗腫瘍効果の増強の可能性をOSCC細胞株を用いた*in vitro*および*in vivo*で検討した。

【方法】当科で手術を施行したOSCC切除標本に対して、抗インテグリン $\beta 5$ 抗体を用いた免疫組織化学染色を行った。また、マウスOSCC細胞株およびヒトOSCC細胞株を用いて、インテグリン $\alpha v\beta 5$ 発現をwestern blotting、フローサイトメトリー、蛍光細胞免疫染色にて検討した。さらに、インテグリン $\alpha v\beta 5$ 陽性細胞株であるマウスOSCC細胞株SCC7を、CDDP単独またはCDDP+iRGD処理し、細胞数の測定、MTT法による細胞の代謝活性の評価、western blottingによるcleaved caspase 3産生量の評価を行った。また、マウス背部にSCC7を移植し、CDDP単独またはCDDP+iRGD併用投与を行い、経時的に腫瘍径を測定し、抗腫瘍効果を評価した。

【結果】インテグリン $\beta 5$ の発現を臨床検体で認め、高発現群は低発現群と比較して5年生存率が低い傾向を示した。今回用いたマウスおよびヒトOSCC細胞株全てにおいてインテグリン $\beta 5$ の産生を確認したが、インテグリン $\alpha v\beta 5$ 抗体を用いたフローサイトメーターの解析においては陽性と陰性の細胞株を認めた。また、インテグリン $\alpha v\beta 5$ 陽性細胞株であるSCC7は培養日数に応じてインテグリン $\beta 5$ の産生が増強した。CDDP+iRGD併用により、低濃度のCDDPで細胞増殖の低下とアポトーシス細胞の増加を認めた。さらにマウス腫瘍モデルにおいても、CDDP+iRGD併用群はCDDP単独群と比較してより強い抗腫瘍効果を示した。

【考察】本研究はOSCCにおいて、CDDPとiRGDの併用投与がCDDP単独投与よりも抗腫瘍効果を発揮することを示唆している。本研究成果はiRGDの臨床応用に向けた基礎的な研究と位置付けられ、CDDPによる腎障害を軽減できる可能性が考えられる。今後、iRGDがどのように代謝されるかなどの薬物動態の解明が必要である。

本研究では、口腔扁平上皮癌におけるインテグリン $\alpha v\beta 5$ の発現意義とiRGD併用によるCDDP抗腫瘍効果増強を明らかにした。本成果はiRGDの臨床応用への基盤となり、作用機序の解明が今後期待される。

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。