

## 【11】

氏 名	澤 <sup>さわ</sup> 谷 <sup>たに</sup> 祐 <sup>ゆう</sup> 大 <sup>た</sup>
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第776号
学位授与の日付	令和3年3月3日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項 (口腔外科学)
学位論文題目	<b>Paclitaxel potentiates the anticancer effect of Cetuximab by enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity on oral squamous cell carcinoma cells in vitro</b> (口腔癌細胞に対してPaclitaxelはCetuximabのADCC活性化を介した抗腫瘍作用を増強する)
論文審査委員	(主査) 教授 千 田 雅 之 (副査) 教授 林 光 弘 教授 徳 田 信 子

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 【背 景】

口腔癌に対する治療法として、手術療法をはじめ、分子標的薬や免疫チェックポイント阻害薬を含む化学療法、放射線療法が挙げられる。これらの治療法の改良に伴い、全生存率や無病生存率が改善されてきている。しかし、一次治療後に局所再発や頸部リンパ節転移、遠隔転移をきたし、治療に難渋する症例も経験する。わが国において2012年に局所進行扁平上皮頭頸部癌と再発/転移性扁平上皮頭頸部癌に対するcetuximab (C-mab) が保険収載され、他の抗癌剤との併用や放射線療法との併用による有効性が認められている。C-mabの作用機序として上皮成長因子受容体 (epidermal growth factor receptor : EGFR) に結合することでEGFRリガンドのEGFRへの結合を阻害し、その結果、細胞増殖、細胞浸潤、転移、細胞生存、腫瘍内血管新生を抑制するとされている。しかし、われわれの先行研究では、口腔扁平上皮癌にはその作用機序による効果は限定的で、むしろ、抗体依存性細胞障害活性 (antibody dependent cellular cytotoxicity : ADCC) が抗腫瘍効果の中心と考えている。実臨床において、C-mabとpaclitaxel (PTX) との併用療法が効果的と報告され、われわれも実臨床でC-mabとPTXの併用療法を行っているが、忍容性の高い、有効な治療方法と感じている。しかしながら、その効果発現、特に併用による増強効果のメカニズムは明らかにされていない。

#### 【目 的】

本研究の目的は、「C-mabの抗腫瘍効果の本質はADCC活性の誘導であり、PTXがそれを増強して

いるか？」という仮説に対してin vitroでその検証を行い、その結果を臨床にフィードバックすることである。

#### 【対象と方法】

本研究では、EGFR発現量の異なる口腔扁平上皮癌由来の細胞株 HSC4、OSC19とEGFRが過剰発現していることが知られている外陰部扁平上皮癌由来のA431を用いた。まず、0.01から1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度のC-mab、0.3から30,000nMの濃度のPTXを単独投与し48時間後に各癌細胞への影響を検証した。次に、一方の薬剤を一定濃度で固定し、片方の薬剤を濃度を変え併用投与し、48時間後に各癌細胞への影響を検証した。さらに、C-mabがこれら細胞にADCC活性を引き起こすか、PTXがそのADCCを増強し得るかを検証した。統計処理として一元配置分散分析法を行った後に、post hoc testとしてTurkeyの検定またはスチューデントのt検定を行い、 $p < 0.05$ を有意とした。上記と並行して、各細胞の全遺伝子発現プロフィールをマイクロアレイ解析し、口腔癌のドライバー遺伝子（p53、Notch1、PIK3CA、KRAS、HRAS、BRAF、Akt、EGFR、PTEN、CDKN2A、FBXW7）に対してたんぱく質をコードしている領域(open reading frame)の全エキソンを次世代シーケンサーにて解析した。また、PTX処理による各細胞のEGFR発現変化も解析した。

#### 【結 果】

PTXを単独投与したところA431で3.0nM、HSC4で3,000nM、OSC19で30nM以上の濃度で有意に細胞増殖を抑制した。また、C-mabを単独投与したところA431で1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、HSC4で10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、OSC19で1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の濃度で有意に細胞増殖を抑制した。C-mabを1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に固定し濃度別にPTXを併用投与したところ、すべての細胞に対して0.3nM以上の濃度で相乗的に細胞増殖を抑制した。PTXを3.0nMに固定し濃度別にC-mabを併用投与したところ、すべての細胞に対して0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の濃度で相乗的に細胞増殖を抑制した。次いで、C-mab 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上ですべての細胞にADCC活性が誘導された。C-mabを1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に固定してPTXを0.3から30nMの濃度で併用投与し、ADCC活性を計測したところ、A431でPTXが3.0nM、HSC4でPTXが0.3nMと3.0nM、OSC19で0.3nMと30nMで有意に増強が認められた。PTX処理によりすべての細胞でEGFR発現変化は認められなかった。さらに、EGFRシグナル、細胞周期、アポトーシスに関与した分子の発現プロフィール、各細胞の口腔癌ドライバー遺伝子の変異（p53 [HSC4 : R248Q、OSC19 : K164\*、A431 : R273H]、Notch1 [A431 : P1377S]、PIK3CA [HSC4 : E545K]）とPTX、C-mabへの反応に一貫した関連は見いだせなかった。

#### 【考 察】

口腔癌におけるEGFRは大腸癌や膀胱癌などと比較して過剰発現しているが、EGFRの細胞内ドメインが欠失していることがありEGFRはシグナル伝達機構としてだけでなく、いわゆる腫瘍マーカーとしても機能する。また、EGFなどの外部からの刺激によって必ずしも増殖に傾くとは限らず、時に増殖抑制に傾く。したがって、EGFRシグナルを遮断するだけで抗腫瘍効果を期待できるとは考えにくい。IgG2であるパニツマブは大腸癌には効果はあるが、口腔癌には無効であったとの報告がある。一方で、C-mabはIgG1であり、強力にADCC活性を発揮する。これらより、C-mabの抗腫瘍効果の本質はEGFRシグナルの遮断というよりADCCといった免疫学的側面が強い可能性がある。また、

一部の口腔癌にはEGFRvIIIという細胞外ドメインが欠失しリガンドとは独立的に情報伝達している分子が知られている。C-mabはこのEGFRvIIIにも結合することが知られており、シグナル遮断はできないがADCCの誘導は可能である。本研究において、C-mabとPTXはすべての細胞において濃度依存的に細胞増殖を阻害し、それぞれの薬剤は比較的高濃度でお互いに相乗的に働いていることが明らかとなったが、その程度は限定的であり、従来の殺細胞性抗癌剤と比較すると軽微であった。C-mabはEGFRを発現する口腔癌細胞にADCCを誘導し、殺細胞効果が見られた。さらに、PTXはすべての細胞に対して比較的低濃度でC-mabのADCC活性を増強した。その増強の程度は細胞間で弱化的の差異が認められたが、ドライバー遺伝子の変異の状態や、EGFRシグナルに関わる分子、細胞周期に関わる分子、アポトーシス誘導に関わる分子の発現状態の違いで、この反応の違いは説明できなかった。PTXによる有糸分裂の阻害で染色体過多が誘導され、分裂期の細胞死が起こることにより、免疫学的な反応が増強されるのかもしれない。今後、それらの詳細なメカニズムを明らかにしていきたい。

#### 【結 論】

C-mabの抗腫瘍効果の本質はADCCの誘導であり、PTXの微小管重合阻害による細胞障害作用がそれを増強している。

### 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

#### 【論文概要】

わが国において2012年12月に局所進行扁平上皮頭頸部癌と再発/転移性扁平上皮頭頸部癌に対するCetuximab (C-mab) が保険収載され、他の抗癌剤との併用による有効性が認められている。日常臨床においても、C-mabに加え、殺細胞性抗癌剤であるPaclitaxel (PTX) を併用投与することが多く、忍容性の高い効果的な治療法と認識されている。しかし、これら二剤による抗腫瘍メカニズムは明らかにされていない。本研究では「C-mabの抗腫瘍効果の本質はantibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC) の誘導であり、PTXの微小管重合阻害による細胞障害作用がそれを増強している」との仮説を立て、in vitroでその検証を行った。その結果として、1) C-mabあるいはPTXを単独投与したところ、高濃度ではすべての細胞で有意に細胞増殖を抑制したが、その効果は限定的であった、2) C-mabとPTXを併用投与したところ、高濃度では相乗的に細胞増殖を抑制したが、その効果は限定的であった、3) C-mab 1.0 $\mu$ g/ml以上ですべての細胞にADCCが誘導された、4) C-mabを1.0 $\mu$ g/mlに固定してPTXを0.3から30nMの濃度で併用投与するとすべての細胞で有意にADCC活性が増強された、5) PTXはすべての細胞のEGFR発現に影響を与えなかった、6) EGFRシグナル、細胞周期、アポトーシスに関与した分子の発現プロファイル、各細胞の口腔癌ドライバー遺伝子の変異とPTX、C-mabへの反応に一貫した関連は見い出せなかった事が示されている。以上より、口腔癌細胞に対して、C-mabとPTXのin vitroでの単独あるいは併用での細胞障害作用は限定的であり、C-mabの抗腫瘍効果の本質はADCCの誘導と考えられ、さらに、PTXはC-mabのADCC活性を増強したと結論づけている。

### 【研究方法の妥当性】

ヒト口腔SCC細胞（HSC4、OSC19）およびEGFRを過剰発現しているヒト外陰部扁平上皮癌細胞（A431）を用いて、単剤・併用投与による細胞への影響、in vitro ADCC活性の定量測定、細胞障害の測定、TaqMan PCRによるEGFR mRNA発現に及ぼすPTXの影響、マイクロアレイによるEGFRシグナリング・細胞周期に係わる分子の発現解析、In house panelを用いたNGSによる口腔癌ドライバー遺伝子の変異検索を行ったが、いずれも上記仮説を裏付ける手段として妥当な評価方法である。

### 【研究結果の新奇性・独創性】

口腔扁平上皮癌細胞に対して、C-mabとPTXのin vitroでの単独あるいは併用での細胞障害は限定的であり、C-mabの抗腫瘍効果の本質はADCCの誘導であることを示した。C-mabの作用をin vitroにおいてADCC活性を定量的に示した初めての報告である。さらに、PTXがC-mabのADCC活性を増強したという報告はなされておらず、世界初の試みである点に関して新奇性・独創性に優れた研究と評価できる。

### 【結論の妥当性】

すでに確立された実験手技を用いて、C-mabとPTXのin vitroでの単独あるいは併用での細胞障害作用は限定的であり、C-mabの抗腫瘍効果の本質はADCCの誘導であることを示し、さらに、PTXはC-mabのADCC活性を増強したことを明らかにした。実験によって得られた結果を適切に解釈しており、それにより導かれる結論は論理的に矛盾するものでなく、過去に明らかにされた知見・報告をふまえて結論づけられている。

### 【当該分野における位置付け】

再発/転移頭頸部癌を対象にC-mabとPTXの併用療法を行ったHittらによる第Ⅱ相試験をはじめとして臨床研究に関する報告は数多くあるが、C-mabとPTXのin vitroにおける分子学的な作用メカニズムにまで言及した研究論文は存在しない。この点に着目した研究は世界初の試みである。本研究により口腔癌細胞に対するC-mabの本質的な作用機序をin vitroで証明し、PTXの増強効果の分子メカニズムが明らかになれば、これら療法の有効症例を選択するコンパニオン診断の開発にも寄与するばかりか、他の免疫チェックポイント阻害剤との併用における有効性の証明の足掛かりになるなど非常に応用性のある研究と評価できる。

### 【申請者の研究能力】

申請者は、C-mabとPTXに関する過去の文献を参考に知識を得たうえで、「C-mabの抗腫瘍効果にはADCC活性が関与しており、PTXの殺細胞効果（微小管重合阻害作用）がこれを増強する」という作業仮説を立て、的確な研究計画を立案した後、適切に本研究を遂行し、貴重な知見を得ている。この研究結果は、国際誌（International Journal of Molecular Sciences）へ掲載されており、申請者の研究能力は高いと評価できる。さらに申請者は今後の研究計画も立案しており、継続性という点でも評価できる。

### 【学位授与の可否】

本論文は独創的で質の高い研究内容を有しており、当該分野における貢献度も高い。よって博士

(医学) の学位授与に相応しいと判定した。

**(主論文公表誌)**

International Journal of Molecular Sciences

(21 : 6292, 2020)