

指導教授氏名	指導役割
(自署)	研究指導
(自署)	
(自署)	

学位論文要旨

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

教育研究分野	口腔顎顔面外科	大学院生	氏名	小川 辰雄
論文題名	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			
論文内容の要旨				
<p>【目的】</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>【方法】</p> <p>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。</p>				

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、上乘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。