

博士(医学) 大和谷 崇

### 論文題目

Epidermal growth factor receptor status and persistent activation of Akt and p44/42 MAPK pathways correlate with the effect of cetuximab in head and neck and colon cancer cell lines

(頭頸部・大腸癌細胞株において上皮成長因子受容体の状態および Akt、p44/42MAPK シグナル伝達系の恒常的活性はセツキシマブの効果と関連する。)

### 論文の内容の要旨

[はじめに]

上皮成長因子(EGFR)は悪性腫瘍の多くで過剰発現が認められ EGFR の活性化は腫瘍の増殖や浸潤、血管新生、転移を引き起こす。そのため EGFR は分子標的治療の標的分子として注目されている。近年、細胞内チロシンキナーゼ阻害剤や抗 EGFR 抗体などいくつかの EGFR 阻害剤が開発されている。セツキシマブは最も広く用いられているモノクローナル抗体で、大腸癌および頭頸部癌に効果があることが知られている。抗 EGFR 治療は単独あるいは他剤・放射線治療との併用により高い効果を示すものがあるが、効果の得られない症例もあり、その効果を予測する因子がいくつか報告されている。EGFR の過剰発現、遺伝子増幅、k-ras や p53 の変異などが効果予測因子として挙げられているが、相反する報告も多い。

EGFR は細胞内で複雑なシグナル伝達系を介してさまざまな細胞機能に関与しているが、主なシグナル伝達系は 3 種類あり、Ras→Raf→p44/42 MAPK (MAPK) 経路、PI3K→Akt 経路と Jak→STAT3 経路がある。

今回われわれは大腸癌、頭頸部癌より 5 種の異なる細胞株を用いて EGFR の状態、細胞周期、シグナル伝達経路におけるリン酸化について、またセツキシマブ単独あるいは放射線と併用による効果との相関について調べた。

[材料ならびに方法]

EGFR 発現のない細胞株を含む 3 種の大腸癌細胞株と 2 種の頭頸部癌細胞株を使用した。頭頸部癌細胞株 LU-HNSCC4 は口腔底扁平上皮癌症例から、LU-HNSCC7 は頬粘膜の扁平上皮癌再発例より Lund 大学(スウェーデン)にて樹立された。以前の研究により、フローサイトメトリーで両者とも染色体異数性であり、LU-HNSCC4 にはサイクリン D1 遺伝子の増幅がみられ、また、LU-HNSCC4 は p53 に変異があり、LU-HNSCC7 は野生型であることが分かっている。大腸癌細胞株の RKO と WiDr は LGC Promochem から購入した。S1 はヒト大腸癌細胞 LS-180 からのクローン株細胞である。

免疫染色および蛍光インサイチュアハイブリダイゼーション(FISH)を用いて EGFR の細胞膜表面の発現と遺伝子増幅について解析を行った。免疫染色は培養細胞よりセルブロックを作製し、パラフィン包埋したものを使用した。FISH は全 EGFR 遺伝子をカバーする赤色標識 DNA プローブと 7 番染色体のセントロメアを標的とする緑色標識プローブのプローブミックスを使用し、蛍光顕微鏡にて観察した。各々のサンプルから核 70 個ずつカウントし、EGFR/7 番染色体比が  $\geq 1.5$  の細胞を EGFR 遺伝子増幅ありとした。また、両者同率で増加しているものを染色体異数性とした。細胞増殖抑制はそれぞれの細胞を 50nM セツキシマブに 4-6 日(ダブリングタイムの 5 倍)暴露後 50%トリ

クロール酢酸を加えて固定、また放射線併用は24時間暴露後に医療用ライナックを用いて様々な線量を照射し5日間の培養後に前者と同様に固定した。固定後の細胞蛋白をSulforhodamine Bと結合させ、その吸光度をマイクロプレートリーダーで求め評価するSRB法を用いて測定した。細胞周期への影響は細胞を薬剤に48時間暴露後、フローサイトメトリーを用いて解析を行った。EGFR細胞内シグナル伝達のリン酸化活性は細胞を100nMセツキシマブに4時間暴露後、10ng/ml EGFに15分暴露した群、どちらもあるいはどちらか暴露しなかった群で抗リン酸化MAPK、Akt、STAT3そしてJak2抗体を用いてウェスタンブロットにより解析を行った。

#### [結果]

免疫染色法によるEGFRの細胞表面発現はLU-HNSCC-4およびLU-HNSCC-7に最も高く認められ、S1、WiDrに弱い発現が認められた。RKOにはEGFRの発現は認められなかった。FISH法ではRKO、S1は正常、WiDrおよびLU-HNSCC-7にはEGFR染色体異数性が、LU-HNSCC-4ではEGFR遺伝子の増幅が認められた。セツキシマブによる細胞増殖抑制は最大で30%程度とあまり高い効果は見られなかったが、EGFRのタンパク量や遺伝子増幅とは相関がみられた。放射線照射と併用しても相加的な効果しか認められず、細胞固有の放射線感受性による違いは認められなかった。細胞周期への影響もわずかで、LU-HNSCC-7のみG0/G1期細胞の増加に有意差が認められた。ウェスタンブロットによるEGFRシグナル伝達系の解析では、主なシグナル伝達系であるAktやMAPKの恒常的リン酸化活性が全ての細胞株で認められたが、同様の伝達系であるJak2やSTAT3には全くリン酸化が認められなかった。

#### [結論]

セツキシマブの効果予測因子としてFISH法によるEGFR遺伝子の増幅、p53やK-ras遺伝子の変異がこれまで報告されてきたが、今回これらによるセツキシマブの効果との相関ははっきりしなかった。いくつかの腫瘍細胞でEGFRシグナル伝達系に恒常的なリン酸化活性が認められることが今までに報告されている。今回の結果でAktはWiDrを除く全ての細胞株で恒常的な活性が認められ、MAPKではEGFRを発現している細胞株のうち、WiDrのみがセツキシマブによるリン酸化活性の抑制が認められなかった。セツキシマブの効果を予測する手段の一つとしてEGFRシグナル伝達系のリン酸化活性の状態を調べることが有用であることが明確となった。

### 論文審査の結果の要旨

大腸がん、頭頸部がんでは上皮成長因子受容体(EGFR)の活性化が腫瘍の増殖等に関与しており、EGFRは分子標的治療の標的として注目されている。EGFR阻害薬としては抗EGFR抗体のセツキシマブが広く臨床応用され、大腸がん、頭頸部がんに対し有効性が報告されている。

申請者は、3種類の大腸がん細胞株(RKO、WiDr、S1)、2種類の頭頸部がん細胞株(LU-HNSCC4、LU-HNSCC7)の細胞株を用いて、EGFRの発現状態、シグナル伝達経路の活性化およびセツキシマブの抗腫瘍効果を検討した。

LU-HNSCC4、LU-HNSCC7では免疫染色によりEGFRの高発現が認められ、FISH法によりEGFR遺伝子の増幅または染色体異数性が認められた。セツキシマブによる増殖抑制効果は最大30%程度あり、放射線照射の併用により相加効果が認められたが、細胞周期への影響は

LU-HNSCC7 のみに認められた。

EGFR シグナル伝達経路の解析においては、MAPK では全細胞で、Akt では WiDr 以外の細胞で、ベースラインの恒常的リン酸化が認められたが、Jak2, STAT3 のリン酸化は認められなかった。Jak2 と STAT3 は EGF 刺激下においてもリン酸化は認められなかった。EGFR 発現細胞株における MAPK リン酸化は、WiDr 以外の細胞株ではセツキシマブにより抑制された。

本研究では、従来の効果予測因子とされた EGFR 遺伝子の増幅、*p53*, *k-ras* 変異とセツキシマブの効果との間には相関が認められなかった。従来の報告とは異なり、今回用いた細胞株では、上記のような Jak-STAT 経路以外の EGFR 経路の活性化が認められ、セツキシマブの効果が限定的であったと考察している。審査委員会では、本研究は、セツキシマブの臨床応用において、細胞内シグナル伝達経路の活性化状態の測定が効果予測に重要である事を示した点を高く評価した。

以上により、本論文は博士(医学)の学位の授与にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 大西 一功

副査 梶村 春彦 副査 中村 利夫