

氏名	桑島 大介
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5312号
学位授与の日付	平成28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	ニコチンが口腔癌の上皮成長因子受容体発現に与える影響の検討
論文審査委員	小崎 健一 教授 森田 学 教授 佐々木 朗 教授

学位論文内容の要旨

【緒言】

上皮成長因子 (Epidermal Growth Factor : EGF) は、細胞表面の受容体 (Epidermal growth factor receptor : 以下 EGFR) に結合すると、EGFR の細胞内領域でのチロシンキナーゼの活性化と自己リン酸化が引き起こされ、シグナル伝達因子が活性化する。シグナル伝達因子は核内移行し、細胞の生存や増殖に関与する。EGFR は、頭頸部癌、乳癌、肺癌、大腸癌、胃癌、腎癌、前立腺癌、卵巣癌で過剰発現が認められ、その過剰発現は予後不良因子である。また EGFR の核内移行は頭頸部癌、乳癌の予後不良因子と報告されている。

ニコチン性アセチルコリン受容体 (nicotinic acetylcholine receptor : 以下 nAChR) の発現は中枢神経系を中心に、気管支上皮、皮膚細胞、血管内皮細胞などの非神経細胞や、肺癌、乳癌、頭頸部癌などの腫瘍細胞にも存在を認める。ニコチンは nAChR を介して肺癌および乳癌で腫瘍増殖、転移を促進する。またニコチンは乳癌細胞において EGFR 発現や細胞内での局在を制御している。ニコチンで乳癌細胞を刺激すると EGFR 発現は低下するが、細胞内に取り込まれ EGFR はリン酸化され腫瘍増殖が促進される。さらにニコチンは肺癌において EGFR 阻害薬の耐性に関与している。

頭頸部癌細胞においても nAChR が発現しており、ニコチンが EGFR 発現を調整し、腫瘍増殖および EGFR 阻害薬の耐性などに関与している可能性がある。そのため本研究では、口腔癌細胞を用いてニコチンが EGFR 発現に与える影響について検討したので報告する。

【材料および方法】

1) ニコチンが口腔癌細胞に与える影響

In vitro ではヒト口腔扁平上皮癌細胞の HSC-2, HSC-3, HSC-4, OSC-19, OSC-20 細胞の培養液中にメカミラミン塩酸塩, α -ブンガロトキシン, セツキシマブを添加した後に、ニコチンを添加し、増殖能を検討した。また OSC-19 細胞, HSC-3 に、メカミラミン塩酸塩, α -ブンガロトキシン, セツキシマブを添加した後に、ニコチンを添加し wound healing assay で運動能, migration assay で遊走能, invasion assay で浸潤能を評価した。

2) ニコチンが口腔癌細胞の細胞内シグナル伝達に与える影響

OSC-19細胞, HSC-3の細胞内シグナル伝達経路についてメカミラミン塩酸塩, α -ブンガロトキシン, セツキシマブ, AKTinhibitor, テムシロリムスを用い, ウェスタンブロット法で検討した。

3) ヒト口腔扁平上皮癌細胞におけるリン酸化EGFRの核内移行の検討

OSC-19細胞とHSC-3細胞を用いてヒト口腔扁平上皮癌細胞におけるリン酸化EGFRの核内移行に与える影響について蛍光免疫染色とウェスタンブロット法を用いて検討した。

【結果】

1) HSC-2, HSC-3, HSC-4, OSC-19, OSC-20細胞はニコチン添加群で対照群と比較して増殖能を促進していたが, メカミラミン, α -ブンガロトキシンはその効果を抑制した。セツキシマブは口腔癌細胞の増殖能を抑制したが, ニコチンはその効果を解消した。またOSC-19細胞, HSC-3細胞で運動能, 遊走能, 浸潤能を検討したところ, ニコチン添加群が対照群と比べて有意に運動能, 遊走能, 浸潤能を促進していたが, メカミラミン, α -ブンガロトキシンはその効果を抑制した。セツキシマブは運動能, 遊走能, 浸潤能を抑制したが, ニコチンはその効果を解消した。

2) ニコチン添加によりEGFR, Akt, mTor, Src, ERK1/2のリン酸化の発現が上昇し, メカミラミン塩酸塩, α -ブンガロトキシンの共存下では, EGFR, Akt, mTor, Srcのリン酸化の発現上昇は抑制したが, ERK1/2には変化がなかった。また, ニコチンとセツキシマブの添加群はセツキシマブ添加群と比較して, EGFR, Akt, mTor, Srcのリン酸化の発現は上昇したが, ERK1/2には変化を認めなかった。ニコチンとAKT阻害剤の共存下ではAkt, mTorのリン酸化の発現は抑制したが, EGFRに変化はなかった。ニコチンとmTor阻害剤のテムシロリムスの共存下ではmTorのリン酸化の発現は抑制したが, EGFR, Aktのリン酸化の発現に変化を認めなかった。

3) OSC-19細胞, HSC-3細胞の蛍光免疫染色ではEGFRは, 細胞質が染色されたが, 核内の染色は認めなかった。それに対して, pEGFRは核内も染色していた。また, 細胞質と核内に分画しウェスタンを行ったところ, EGFRの発現は, 細胞質では高いが核内では低い。pEGFRの発現は細胞質, 核内で高かった。

【考察】

本研究において用いた4種類の口腔癌細胞株のいずれにおいても, ニコチン添加群は対照群と比較して有意に増殖能, 運動能, 遊走能, 浸潤能が促進されていた。さらにその効果は, nAChR阻害剤のメカミラミン塩酸塩や α -ブンガロトキシン添加で阻害された。 α -ブンガロトキシンは $\alpha 7$ 選択的阻害剤であり, メカミラミン塩酸塩はnAChRの非選択的阻害剤である。ニコチンによる口腔癌細胞の増殖能, 運動能, 遊走能, 浸潤能の亢進はnAChRを介していることが明らかとなった。

抗ヒトEGFRキメラ化モノクローナル抗体セツキシマブは, 頭頸部癌初の分子標的治療薬として世界的に注目を浴びている。本研究では, ニコチンがEGFR発現を低下させることが明らかとなった。リン酸化されたEGFRの一部は細胞表面から核内に移行していることが明らかとなった。

セツキシマブによって抑制されていた口腔癌細胞の増殖能, 運動能, 遊走能, 浸潤能は, ニコチンによって上昇していた。しかし, セツキシマブおよびニコチンを投与した群は, 対照群と比較するといず

れの細胞株においても増殖能，運動能，遊走能，浸潤能が低く，セツキシマブ耐性にはニコチンによる機構以外の関与が考えられた。

ニコチン添加により，Aktおよびその下流のmTORのリン酸化を認めた。メカミラミン塩酸塩および α -ブングアロトキシンを添加したところAktのリン酸化の抑制を認めた。ニコチンがnAChRを介しAkt経路を活性化していると考えられた。AKT阻害剤とmTOR阻害剤テムシロリムスを添加して，EGFR発現およびEGFRのリン酸化を検討したところ，変化を認めなかった。ニコチンによるAktの活性化は，EGFR下流に存在すると考えられた。

つまりニコチンはnAChR およびその下流の Src を活性化することで，EGFR 発現を低下させていた。一部のリン酸化EGFR は細胞表面から核内へ移行し AKT およびその下流の mTOR を活性化し，口腔癌細胞の増殖能，運動能，遊走能，浸潤能を促進していた。さらに同機構はセツキシマブの耐性にも一部関与していると考えられた。

論文審査結果の要旨

上皮成長因子 (Epidermal Growth Factor : EGF) は、細胞表面の受容体 (EGF receptor : EGFR) に結合し同シグナルを活性化させ、また EGFR 自体も核内移行して、癌細胞の生存や増殖を促進することが知られている。さらに癌細胞における EGFR の過剰発現や核内移行は、様々な癌で予後不良因子とされている。一方、ニコチンは、ニコチン性アセチルコリン受容体 (nicotinic acetylcholine receptor : nAChR) を介して、肺癌および乳癌における腫瘍増殖を促進する。ニコチンは、乳癌細胞において EGFR 発現や細胞内局在を制御すること、肺癌の EGFR 阻害薬耐性に関与することが報告されている。また近年、頭頸部癌細胞での nAChR 発現が示されたことから、口腔癌細胞での EGFR 発現調整と腫瘍増殖、EGFR 阻害薬耐性などへのニコチンの関与が考えられる。上記の背景を踏まえ、本研究では口腔癌細胞の EGFR 発現におけるニコチンの影響について検討した。

ヒト口腔扁平上皮癌細胞株 OSC-19 と HSC-3 に、*in vitro* 培養下にてニコチンを単独で、あるいは nAChR 阻害薬や EGFR 阻害薬などを組み合わせて作用させ、各癌細胞株における増殖能、運動能、遊走能、浸潤能について検討し評価した。細胞内シグナル伝達経路はウエスタンブロット法、EGFR の細胞内局在についてはリン酸化 EGFR も含めウエスタンブロット法と蛍光免疫染色を用いて解析した。

ニコチン添加により癌細胞の増殖能、運動能、遊走能、浸潤能、ならびに EGFR, AKT, mTOR, Src のリン酸化は促進された。また nAChR 阻害薬は、ニコチンによる効果を著しく抑制した。さらにセツキシマブ単独添加は癌細胞の増殖能、運動能、遊走能、浸潤能を抑制したが、これらの抑制効果はニコチンにより優位に阻害され、EGFR, AKT, mTOR, Src におけるリン酸化の回復と核内リン酸化 EGFR の増加を認めた。

ニコチンは口腔癌細胞の nAChR とその下流の Src を活性化し、EGFR 発現を低下させる。またリン酸化 EGFR の一部を細胞表面から核内へ移行させ、AKT や mTOR を活性化し、増殖能、運動能、遊走能、浸潤能を促進する。本研究によって、これらの分子機構は口腔癌細胞のセツキシマブ耐性獲得へ深く関与することが示唆された。

本研究成果は、ニコチンによる口腔癌細胞の増殖促進機構が nAChR を介する EGFR 発現調整機序ならびに EGFR 阻害薬耐性獲得機序などと深く関連することを明らかにし、口腔癌における新たな予防法や治療法の確立へ寄与する重要な知見を含んでいる。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。