

氏 名	綾 仁 悠 介
(ふりがな)	(あやに ゆうすけ)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲 第 号
学位審査年月日	平成30年7月11日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題名	TRKB tyrosine kinase receptor is a potential therapeutic target for poorly differentiated oral squamous cell carcinoma (受容体型チロシンキナーゼ TRKB は低分化口腔扁平上皮癌の治療標的候補である)
論文審査委員	(主) 教授 高 井 真 司 教授 廣 瀬 善 信 教授 萩 森 伸 一

### 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

#### 《背景》

口腔扁平上皮癌 (OSCC) は、全悪性腫瘍の 1~3%を占める予後の悪い頭頸部悪性腫瘍の 1 つである。OSCC は、頸部リンパ節転移による再発率が高く、これが生存率を低下させている。近年の治療法の進歩にもかかわらず、ここ 10 年間、OSCC 患者の再発率と生存率は改善しておらず、癌の転移を抑える新たな治療標的の発見や治療方法の開発が急務となっている。

近年、多くの癌腫において異常な発現上昇を示す受容体型チロシンキナーゼ TRKB が、癌の予後不良因子として注目されている。TRKB は、そのリガンドである脳由来栄養因子 BDNF の刺激依存的に、腫瘍細胞の増殖に働くだけでなく、細胞運動や上皮間葉転換 (EMT) の促進に働き、薬剤への耐性獲得にも働くことが in vitro の解析から報告され

ており、癌のあらゆる進展過程に寄与していると考えられている。しかしながら、OSCC における TRKB の病態形成機能および臨床的意義については十分に分かっていない。

#### 《目的》

OSCC の新たな治療法の確立を目指して、TRKB の発現と OSCC の分化度をはじめとした臨床病理学的特徴との関連性を解析し、さらに TRKB を標的とした OSCC 治療の可能性を検証する。

#### 《方法》

TRKB および BDNF の発現と OSCC の臨床病理学的特徴や予後との関連性を明らかにするために、44 例の術前化学療法非処置 OSCC について、H&E 染色法および免疫組織化学染色法を用いて病理組織学的解析を行った。次に、TRKB を標的とした OSCC 治療の可能性を検証するために、高分化型 (HSC-4) と低分化型 (HSC-3) の 2 種類のヒト OSCC 細胞株を用いて、細胞培養系実験および癌細胞同所移植マウスモデル実験を行い、さらに、両実験系を用いて TRKB 特異的阻害剤 ANA-12 の OSCC 治療への有効性を検証した。

#### 《結果》

ヒト臨床 OSCC の病理組織学的解析の結果、低分化型 OSCC 細胞および高分化型 OSCC 浸潤先端細胞において TRKB および BDNF の発現が高く、また、両分子の発現が高い OSCC 患者群および低分化型 OSCC 患者群では 2 年無再発生存率が有意に低かった。これらの解析結果から、TRKB および BDNF の過剰発現が OSCC の予後不良因子であることが示唆された。

そこで、高分化型 (HSC-4) と低分化型 (HSC-3) の 2 種類のヒト OSCC 細胞株を比較解析することで、低分化型 OSCC における TRKB の機能を調べた。まずはじめに、これら細胞株における分化マーカー、TRKB および BDNF の発現を Western blot および

細胞免疫染色により解析した結果、HSC-4 細胞は、上皮マーカー E-cadherin の発現が有意に高く、一方、HSC-3 細胞は、間葉系マーカー VIMENTIN および EMT を誘導する転写因子の 1 つ SLUG、そして、TRKB と BDNF の発現が有意に高く、これらの細胞株が確かにそれぞれ高分化型と低分化型の形質を持つことが確認された。

次に、これら細胞株をヌードマウスの舌に同所移植して腫瘍形成能を解析した結果、HSC-4 と比較して、低分化型 HSC-3 由来の腫瘍は、TRKB および BDNF の高発現を示し、有意に広範囲に浸潤し潰瘍を形成した。また、高分化型 HSC-4 由来腫瘍の浸潤先端細胞も、TRKB と BDNF の高い発現を示した。以上から、これら同所移植 OSCC が、ヒト臨床 OSCC に似た形質を持つことが示唆された。

そこで、この OSCC 細胞同所移植マウスモデルを用いて、TRKB 特異的阻害剤 ANA-12 の OSCC への治療効果を検討した。腫瘍細胞株の同所移植 24 時間後から、ANA-12 を 12 時間毎に 14 日間腹腔内投与した結果、HSC-3 由来腫瘍の造腫瘍能および潰瘍形成は明らかに抑制され、コントロール群で認められる HSC-3 細胞移植マウスの体重減少も有意に抑制された。一方、HSC-4 由来腫瘍への ANA-12 の修飾効果は観察されなかった。また、細胞培養実験により、HSC-4 細胞は BDNF 刺激への反応に乏しい一方、HSC-3 細胞では、BDNF 刺激依存的に TRKB のリン酸化が上昇して、それが ANA-12 処置により完全に抑制された。以上から、ANA-12 が確かに TRKB の機能を阻害していることが確認された。

腫瘍の成長は、腫瘍細胞の増殖能と運動能に依存することから、OSCC 細胞の増殖能と運動能への ANA-12 の効果を細胞培養実験により解析した。Wound healing assay および Trans-well を用いた invasion assay の結果、BDNF 刺激依存的に HSC-3 細胞の細胞遊走と浸潤が有意に亢進し、ANA-12 はその亢進を完全に抑制した。また、細胞増殖実験の結果、ANA-12 は濃度依存的に HSC-3 の細胞増殖を抑制した。一方、HSC-4 細胞において、BDNF および ANA-12 は何ら効果を示さなかった。さらに、ANA-12 が与える細胞形態への効果を解析した結果、ANA-12 は、HSC-3 の細胞形態を、stress fiber が発達した紡錘形態から cortical actin が発達した上皮様形態へと変化させた。このとき、

ANA-12 は、EMT 誘導転写因子である SLUG の発現を顕著に減少させる一方、上皮マーカー E-cadherin の発現を上昇させ、間葉上皮転換 (MET) 様効果を示した。

#### 《結論・考察》

以上から、BDNF/TRKB 系は、一般的に浸潤能や転移能が高いとされる低分化型 OSCC 細胞において有意に発現が上昇し、OSCC の予後不良因子の 1 つとなっている可能性が示された。また、TRKB 特異的阻害剤は、細胞増殖能および遊走・浸潤能を阻害することで、BDNF/TRKB を高発現する低分化型 OSCC 細胞の腫瘍形成を抑制することが示唆された。これらは、BDNF/TRKB の異常な発現上昇が OSCC の新しい予後診断マーカーとなり得ること、また、BDNF/TRKB システムが低分化型 OSCC の新しい治療標的となり得ることを示している。

## 論文審査結果の要旨

口腔扁平上皮癌 (OSCC) は、主要な頭頸部癌の 1 つであり、世界では新たに年間約 30 万人が罹患して約 15 万人が死亡する予後の悪い癌である。近年、新しい薬物が加わったものの治療成績に大きな進展がなく再発率は 20-30% に昇るため、その主な原因となっている転移を抑える新たな治療が強く望まれている。

受容体型チロシンキナーゼである TRKB は、種々の癌細胞において発現が上昇し、細胞増殖だけでなく細胞運動や上皮間葉転換をも促進すると報告されている。しかしながら、OSCC における TRKB の臨床的意義については十分に分かっていない。申請者は、TRKB およびそのリガンド BDNF の発現と OSCC の臨床パラメータとの関連性をヒト臨床病理組織解析によって明らかにし、さらに TRKB を標的とした OSCC 治療の可能性を、ヒト舌癌細胞株を用いた細胞培養系実験および同所移植マウスモデル実験を用いて検証した。

その結果、ヒト病理組織の低分化型 OSCC 細胞および高分化型 OSCC の浸潤先端細胞において、TRKB と BDNF の発現が有意に高いことを示し、これら BDNF/TRKB 高発現癌患者群および低分化型癌患者群では、癌のリンパ管浸潤が多く、主に転移の有無を表す 2 年再発生存率も有意に低いことを示した。また、ヒト舌癌細胞株を用いた同所移植マウスモデルにおいて、TRKB 特異的阻害剤が、BDNF/TRKB を高発現する低分化型ヒト舌癌細胞による腫瘍形成を抑制することを示した。さらに、その抑制が、BDNF 刺激依存的な癌細胞の増殖、遊走および浸潤の阻害効果によることを細胞培養系解析により示唆した。これらは、BDNF/TRKB の異常な発現上昇が OSCC の新しい予後診断マーカーとなり得ること、BDNF/TRKB が浸潤能や転移能が高いとされる低分化型 OSCC の治療標的候補となること、また TRKB 特異的阻害剤が、BDNF/TRKB 高発現の低分化型 OSCC の新しい治療法となる可能性を示すものである。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条第 1 項に定めるところの博士 (医学) の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Oncotarget 9(38): 25225-25243, 2018 <オンライン掲載>