

細胞間結合を定量する方法として Trans-epithelial resistance 法を用いたが、膜結合型 HB-EGF と EGFR の結合および、EGFR リン酸化により細胞間接着が強固となることが予測された Mem 細胞では測定早期から抵抗値の有意な上昇を認め、WT や ΔMem 細胞の抵抗値と有意な差を認めたことから、細胞間接着およびそれを維持するには、膜結合型 HB-EGF の存在とそれらが EGFR と結合し、EGFR リン酸化を促す活性、すなわち juxtacrine 活性が関与していることが示唆された。

【考察】今回の実験系では、特に細胞-細胞間における juxtacrine 機能を検討する目的で変異型である膜結合型 HB-EGF を作成し、細胞の接着および、その後の接着複合体形成における膜結合型 HB-EGF が、最終的に接着関連蛋白のリン酸化、Src 依存性 EGFR リン酸化を促進させ、野生株と比較し、ダイナミックな細胞形態変化に関連している結果を得た。細胞のアポトーシス抑制や細胞生命維持に関与する HB-EGF、特に膜結合型 HB-EGF の生物学的意義を解明することは生体の正常状態の維持という点を考慮した場合に非常に重要なプロセスであると考えられ、非分泌性膜結合型 HB-EGF を用いた本研究が、今だ不明な点が多い juxtacrine 活性の生物学的意義をさらに解明するうえで非常に重要な役割をもつものとして考えられる。

氏 名	吉 田 健 史
学位の種類	博 士 (医学)
学位記番号	医 第 1 0 0 0 号
学位授与の日付	平 成 2 1 年 3 月 2 1 日
学位授与の要件	学位規程第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	Matuzumab and cetuximab activate the epidermal growth factor receptor but fail to trigger downstream signaling by Akt or Erk (EGFR 抗体療法による EGFR 活性化と下流シグナル阻害)
論文審査委員 (主 査)	教 授 中 川 和 彦
(副主査)	教 授 植 村 天 受
(副主査)	教 授 奥 野 清 隆

【目的】

近年、ヒト上皮成長因子受容体 (Epidermal Growth Factor Receptor : EGFR) を標的としたモノクローナル抗体の開発および臨床への導入が進められているが、これらの抗体が抗腫瘍効果を発揮するための分子機構については未だ不明な点が多い。我々は3種の非小細胞肺癌の細胞株を用いて、2種の抗 EGFR モノクローナル抗体 (matuzumab, cetuximab) の細胞内シグナル伝達および細胞生存率への効果を検討した。

【方法】

非小細胞肺癌細胞株へ matuzumab, cetuximab を曝露させることによる EGFR 及び下流シグナルの活性化の変化について Western blotting 法で、EGFR の二量体化についてはクロスリンカーを用いて検討した。また、これらの抗体が EGFR の細胞内への内在化へ与える影響に関して免疫染色とフローサイトメトリーを用いて、さらに、これらの抗体の細胞生存率へ与える効果については clonogenic assay を行い検討した。

【結果】

我々は matuzumab, cetuximab が、リガンドである EGF による EGFR 刺激時と同様に EGFR の二量体化を引き起こし、受容体チロシンキナーゼを介して EGFR を活性化させる事を見出した。しかしながら、これらの抗体による EGFR 活性化は、EGF 刺激時とは異なり細胞生存に関わる下流シグナルである Akt や Erk を活性化できない事が示された。これは抗体が、下流シグナルの活性化に必要な正常な EGFR のターンオーバーを阻害する事に起因している事が示唆された。次に我々は、野生型の EGFR を発現し EGFR 遺伝子のコピー数の増加を認める H292 細胞において、これらの抗体が EGF 刺激下においても強力に EGFR 下流のシグナル伝達を阻害する事を確認した。また clonogenic assay においても、これらの抗体は H292 細胞において著明な細胞生存率の低下を示した。

【考察】

野生型の EGFR を発現し EGFR 遺伝子のコピー数の増加を認めない H460 細胞および、EGFR 遺伝子変異 (exon19 deletion) と遺伝子増幅を認める PC9 細胞においては、これらの抗体は EGF 刺激下における下流シグナルを阻害できず、clonogenic assay においても有意な細胞生存率の低下を示せなかった事からは、これらの抗体に対する感受性が EGFR のステータスによって異なる可能性が示唆された。

【結論】

我々は抗 EGFR 抗体が、EGFR ターンオーバーの阻害により EGFR 下流のシグナル伝達をブロックする事で、抗腫瘍効果を発揮する事を示した。抗 EGFR 抗体の臨床応用が進む中、今後は臨床検体における抗体感受性と EGFR のステータス、あるいは下流シグナルのリン酸化との相関を検討していく事が重要である。

博士論文の印刷公表	公 表 年 月 日	出版物の種類及び名称
	2008年4月1日 公 表	出版物名 International Journal of Cancer Vol. 122 No. 7 p. 1530 ~ 1538
	公 表 内 容	2008年4月1日 発 行
	全 文	

近年、EGFR (ErbB1, Her 1、上皮成長因子受容体) を標的とした分子標的治療薬の開発および臨床導入が進められている。EGFR を標的とする治療には二通りの戦略があり、一つはゲフィチニブ (イレッサ) やエルロチニブ (タルセバ) のような小分子 EGFR-TKI (チロシンキナーゼ阻害薬)、もう一つは抗 EGFR モノクローナル抗体である。抗 EGFR 抗体としては複数の薬剤が開発中であり、日本においてもヒト・マウスキメラ化抗体であるセツキシマブ (IMC-C225、アービタックス) の、転移性結腸直腸癌に対する塩酸イリノテカンとの併用での第二相試験が終了し、海外の試験同様にその有効性が示されたため、2008年7月に抗 EGFR 抗体として国内で初めて製造販売の承認がなされた。米国では、完全ヒト化抗体であるパニツムマブ (ABX-EGF、ベクチビックス) も転移性結腸直腸癌患者に対して既に承認されている。また、ヒト化抗体であるマツズマブ (EMD72000) やニモツズマブ (h-R3) などの治験が各国で現在進行中である。EGFR-TKI に関しては、既に進行非小細胞肺癌患者に対して広く臨床導入されており、これらの患者においてその感受性と EGFR 遺伝子変異の存在が相関することが明らかとなっている。また最近では EGFR-TKI に対する耐性獲得の機序に注目が集まっている。これに対して抗 EGFR 抗体療法については、その作用機序や EGFR シグナル伝達へ及ぼす影響などいまだ不明確な部分が多い。本研究ではヒト非小細胞肺癌株を用いて、これらの抗体の EGFR シグナル伝達へ与える影響、シグナルを制御する EGFR ターンオーバーへ与える影響を検討するとともに、clonogenic assay を行い抗腫瘍効果を確認した。

結果と考察

抗 EGFR 抗体が EGFR のリン酸化および 2 量体化に与える影響

非小細胞肺癌細胞株へマツズマブ、セツキシマブを 15 分間曝露させると、EGFR リガンドである EGF 刺激時と同様に、EGFR の 2 量体化および EGFR の主要な 3 つのリン酸化サイトである Y845、Y1068、Y1173 のリン酸化が引き起こされる事が示された。またマツズマブ、セツキシマブによる EGFR リン酸化は、EGFR-TKI であるゲフィチニブにより完全に抑制され、この EGFR リン酸化が EGFR チロシンキナーゼを介した自己リン酸化である事が示された。

抗 EGFR 抗体が EGFR の下流シグナルに与える影響

これらの抗体が増殖因子である EGF と同様に EGFR をリン酸化させるにもかかわらず、なぜ抗腫瘍効果を持ちうるのかを検討するため、本研究ではこれらの抗体が EGFR 下流シグナルへ与える影響について検討した。非小細胞肺癌細胞株へマツズマブ、セツキシマブを 15 分間曝露させると、EGF 刺激時と同様に EGFR のリン酸化が引き起こされるにもかかわらず、主要な下流シグナルである Akt および Erk に関しては、EGF 刺激時と異なり活性化を認めなかった。

抗 EGFR 抗体が EGFR のターンオーバーに与える影響

非小細胞肺癌細胞株へ EGF、マツズマブ、セツキシマブをタイムコースで曝露させると、EGF 刺激時には速やかな EGFR の脱リン酸化とダウンレギュレーション、および EGFR 下流の Akt、Erk の持続的な活性化を認めた。一方で、マツズマブ、セツキシマブ曝露時には長時間にわたり EGFR の活性化が持続し、Akt、Erk の活性化は時間経過を通して認めなかった。また、非小細胞肺癌株へ EGF、マツズマブを 4 時間曝露させた後、免疫染色とフローサイトメトリーを行い EGFR の局在を確認すると、EGF 刺激時には速やかな膜表面の EGFR の蛍光減弱

を認めたが、マツズマブ曝露時には膜表面に EGFR の蛍光が残存している事が示された。これらの結果からは、抗 EGFR 抗体は EGFR 下流シグナルの活性化に必要な EGFR のターンオーバーを阻害する事で、Akt、Erk の活性化を防ぎ、抗腫瘍効果を発揮している事が示唆された。これらの抗体が膜表面に長期間とどまることは、最近注目されている抗体による抗腫瘍効果を発揮する一つの機序である ADCC にも有利に働く可能性があると考えられた。

非小細胞肺癌細胞株における抗 EGFR 抗体による抗腫瘍効果の検討

非小細胞肺癌細胞株へマツズマブ、セツキシマブを 15 分間曝露させた後、EGF による刺激を 15 分間加えた条件下においても、野生型の EGFR を発現し EGFR 遺伝子のコピー数の増加を認める H292 細胞においては、これらの抗体が強力に EGFR 下流のシグナル伝達を阻害する事が確認された。一方で野生型の EGFR を発現し EGFR 遺伝子のコピー数の増加を認めない H460 細胞および、EGFR 遺伝子変異(exon19 deletion)と遺伝子増幅を認める Ma-1 細胞においては、これらの抗体は EGF 刺激下における EGFR 下流シグナルを阻害できなかった。

clonogenic assay においてこれらの抗体は、EGF 刺激下における EGFR 下流シグナルを抑制可能であった H292 細胞において著明な細胞生存率の低下を示した。一方で EGF 刺激下における EGFR 下流シグナルを抑制できなかった H460 細胞、Ma-1 細胞においては細胞生存率の低下を示さなかったことから、これらの抗体に対する感受性が EGFR のステータスによって異なる可能性が示唆された。

総括

本研究は抗 EGFR 抗体の臨床応用が進む中、臨床検体における抗体感受性と EGFR のステータス、あるいは下流シグナルのリン酸化との相関を検討していく事が重要である事を示唆し、学位論文として価値のあるものと判断した。