

## 学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 佐藤 宏紀

### 学位論文題名

## High-Expression of AMAP1 and EPB41L5 Proteins Correlates with Lymph Node Metastasis and Survival Rate after Surgical Therapy of HNSCC.

(AMAP1、EPB41L5蛋白の高発現は頭頸部癌におけるリンパ節転移および術後の生存率と関連する)

### 【背景と目的】

現在、頭頸部癌への治療として手術療法、放射線療法、薬物療法を組み合わせた集学的治療が行われている。それぞれ技術的には進歩は見られるが、この20~30年間、頭頸部癌患者の予後には著しい改善はみられていない。治療後の局所再発や周辺臓器への浸潤、遠隔転移に対する制御が、予後改善に重要である。新しい検査法、治療法、予後の予測のため、分子生物学的手法が重要である事は論を待たない。頭頸部癌の90%以上に上皮成長因子受容体(EGFR)が過剰発現していることはよく知られており分子標的としてEGFRおよびその周辺蛋白が注目されている。2004年にSabeの研究グループは、浸潤性の強い乳癌細胞において、低分子量G蛋白質Arf6の発現が亢進しており、そのような癌細胞の浸潤活性の殆どを担っている事、一方、浸潤性が弱いもしくは殆ど示さない乳癌細胞には、Arf6の発現亢進は見られないことを報告した。Arf6はEGFR-GEP100-Arf6-AMAP1シグナル経路因子群の一つとして知られる分子である。乳癌患者標本の解析からはこれらのシグナル経路因子群の発現が、乳癌の悪性度と統計的に有意に関連する事も示されている。

癌は組織特異的疾患であり、また、細胞内シグナル経路は、組織や細胞種において多様性を示す。EGFRを過剰発現する頭頸部癌細胞では、EGFRシグナル経路が増殖、浸潤・転移に深く関与していることは報告されているが、その詳細な分子機構は不明である。一方、Hofmanらは、病理組織検体におけるcortactinの過剰発現と頭頸部癌の浸潤性との関連性を指摘しており、またCordesらは頭頸部癌の放射線感受性と $\beta$ 1インテグリン/cortactinシグナル経路が関連していることを示している。これらのことから頭頸部癌と乳癌で示されたSabeらのスキームの関与が示唆された。本研究は、頭頸部癌細胞において、RTKs-GEP100-Arf6-AMAP1シグナル経路が、その浸潤・転移に関与しているか否かを検討し、頭頸部癌細胞の悪性度進展の分子的詳細の一端を明らかにする事、そのことにより、今後の頭頸部癌の研究と治療において、より有効な治療法の開発や予後予測バイオマーカーの提示を目指すものである。

### 【材料と方法】

頭頸部扁平上皮癌細胞株としてHSC-2、HSC-3、HSC-4、SCC-9、SCC-25の5種類を用いて予備実験を行った。蛋白の発現をウェスタンブロット法を用いて解析した。細胞の浸潤能をインベージョンアッセイを用いて解析した。AMAP1とCortactinの結合阻害剤であるP4TATを用いて頭頸部癌細胞株の浸潤能の変化をインベージョンアッセイにて評価した。免疫組織染色を行う頭頸部扁平上皮癌組織は、1996年から2012年に北海道大学耳鼻咽喉科頭頸部外科にて外科的に切除され、インフォームドコンセントを得た患者標本を用いた。また、この研究に対し北海道大学医学部医の倫理委員会の承諾を得た。

図1に本研究に用いた症例の臨床情報を示す。ホルマリン固定パラフィン包埋組織は、3

μm の連続切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色および EGFR, GEP100, AMAP1, Cortactin, EPB41L5 の免疫組織染色を行った。免疫組織染色を評価するために、染色強度と陽性細胞率を記録した。染色強度は 0 から 2 までの 3 段階評価 (negative=0, weak=1, strong =2) とした。陽性細胞率は 0 から 1.0 までの 11 段階評価 (0%=0, 10-90%=0.1-0.9, 100%=1.0) とし、H score を染色強度と陽性細胞率の積として計算した。検体を蛋白高発現群と低発現群に分ける際には計測した H score のメジアンをカットオフラインとして用いた。染色の判定は病理医を含む 2 名の医師行った。統計解析は、エクセルアドインソフト Statcel® (OMS Ltd., Tokyo, Japan) を用いた。病理組織における H score と臨床データとの相関は、Student's-t test により解析した。また、無病生存率と粗生存率は Kaplan-Meier 法を用いて解析し生存率の差についてはログランク検定を用い、P 値 0.05 以下を有意差ありとみなした。

### 【結果】

頭頸部扁平上皮癌細胞株における EGFR, GEP100, Arf6, AMAP1, cortactin, EPB41LE の蛋白発現量は細胞によってばらつきはあったが、全細胞で発現していた (予備実験)。GEP100, Arf6, AMAP1, EPB41L5 の蛋白発現量を siRNA を用いて抑制しインベージョンアッセイにて浸潤の程度を測定した予備実験では 4 種それぞれの蛋白発現抑制により頭頸部癌細胞株の浸潤能が低下した。AMAP1 と Cortactin の結合阻害剤である P4-TAT を SCC-9 細胞に作用させてインベージョンアッセイにて浸潤能を評価したところ浸潤能は低下した (予備実験)。免疫組織染色による実験において頸部リンパ節転移陽性群では陰性群と比較して有意に AMAP1 蛋白、EPB41L5 の発現が高かった。頭頸部扁平上皮癌病理組織検体における AMAP1 高発現群と EPB41L5 高発現群において各低発現群と比較して 5 年無病生存率は統計学的有意に低かった。EGFR 高発現群、AMAP1 高発現群と EPB41L5 高発現群において各低発現群と比較して 5 年粗病生存率は統計学的有意に低かった。EGFR/AMAP1 がともに高発現の群は EGFR/AMAP1 がともに低発現の群に比べて有意に 5 年粗生存率が低下していた。EGFR/EPB41L5 の共発現群においても同様の結果であった。

### 【考察】

頭頸部癌患者の予後はこの 20~30 年間大きな変化がない。予後改善のためには局所再発や周辺臓器への浸潤、遠隔転移を制御する必要がある。近年癌の治療法として分子標的薬が注目されており、頭頸部癌においては上皮成長因子受容体 (EGFR) に関わる多くの研究がなされている。2004 年より Sabe らが報告した RTKs-GEP100-Arf6-AMAP1 シグナル伝達経路は悪性度の高い乳癌において浸潤・転移の重要な役割をになっていることが知られている。今回の研究において頭頸部扁平上皮癌においてもそれらの蛋白が発現し、浸潤に関わりがあることが予想された。病理組織標本を用いた研究では AMAP1, EPB41L5 蛋白がリンパ節転移、生存率のマーカーになりうることが示唆された。しかし GEP100, Cortactin など関与が予想された蛋白において有意な結果が示されなかったことから今後の研究ではそれらのメカニズムを探求する必要があると考えられた。

### 【結論】

頭頸部扁平上皮癌の手術後病理標本を用いた免疫組織染色実験では AMAP1, EPB41L5 の高発現症例において頸部リンパ節転移に有意差が認められ、無病生存率、粗生存率が有意に低下した。この研究は頭頸部扁平上皮癌において RTKs-GEP100-Arf6-AMAP1 シグナル伝達経路が働いていることを初めて報告したものである。AMAP1, EPB41L5 が将来の頭頸部扁平上皮癌の有用なバイオマーカーとなる可能性がある。