

## 鶴見大学大学院歯学研究科博士学位論文

### 内容の要旨および審査の結果の要旨

氏名(本籍) 長岡朋子(神奈川県)  
博士の専攻分野 博士(歯学)  
学位記番号 甲第444号  
学位授与年月日 平成27年3月13日  
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当  
研究科専攻 鶴見大学大学院歯学研究科  
(博士課程) 歯学専攻  
学位論文題目 Down-regulation of EGFR Family and their Ligands in the Mutant  
K-ras Group in Japanese Colorectal Cancer Patients  
(日本人の大腸癌患者における K-ras 変異群での EGFR ファミリーとリガンドのダウンレギュレーション)  
Molecular Medicine Reports 第13巻 4号 3514頁～3520頁掲載 平成28年4月13日発行  
論文審査委員 主査 教授 大井田新一郎  
副査 教授 里村一人 副査 教授 濱田良樹

### 内容の要旨

#### 【背景と目的】

大腸癌は、世界的にも死亡率が上位であり、すべての悪性腫瘍の約9.4%を占めると報告されている。とくに欧米諸国で頻度の高い癌であるが、日本においても生活習慣の欧米化により増加傾向の著しい癌である。最も有効な治療法は外科的切除であるが、約60%の割合で局所再発または遠隔転移を起こすとも報告されており、生存率の改善には至っておらず、新たな治療法の確立が求められている。

上皮成長因子受容体 (Epidermal Growth Factor Receptor: EGFR) は、4つのサブファミリー (HER1/ErbB1, HER2/ErbB2, HER3/ErbB3, HER4/ErbB4) から構成されており、ファミリー間においてヘテロダイマーもしくはホモダイマーによる二量体を形成することで細胞内シグナル伝達を行う。更に、それぞれの受容体に結合する8種類のリガンド (Epidermal Growth Factor: EGF, Transforming Growth Factor- $\alpha$ : TGF- $\alpha$ , Betacellulin: BTC, Amphiregulin: AREG, Eprex: EREG, Heparin-Binding-EGF-like growth factor: HB-EGF, Neuregulin 1: NRG1, Neuregulin 2: NRG2) が存在する。このEGFR遺伝子は、扁平上皮癌を始め多種多様なヒトの癌組織において高発現しており、発癌や癌細胞の増殖・転移にも関与すると報告されている。近年、大腸癌においては、EGFRを標的とした抗ErbB1抗体が分子標的薬として認可され、臨床応用されている。抗ErbB1抗体による治験が進んでいる大腸癌においては、臨床成績に関するデータのみならず、抗ErbB1抗体の抗腫瘍効果発現のメカニズムに関する報告が相次いでいる。なかでも、細胞膜内のEGFRシグナル伝達経路を担うK-ras遺伝子の変異は、治療成績を著しく低下させることも報告されている。また、抗ErbB1抗体の適応であるK-ras遺伝子の変異がない大腸癌症例においても、治療成績が思わしくない患者が存在する。その理由の1つとして、EGFRは4種の受容体から構成されているが、大腸癌治療の標的となっている受容体は、現状ではErbB1のみであることが挙げられる。そのため、治療成績を改善するためには、まず、他の受容体が標的となり得るか否かについて検討する必要がある。

そこで本研究では、日本人の大腸癌患者の腫瘍原発組織ならびに隣接する正常組織を用いて、EGFRファミリーとリガンドの発現解析、K-ras遺伝子の変異とEGF関連遺伝子の関連性について検討することを目的とした。

#### 【研究方法】

対象患者および検体

同意を得た大腸癌患者 122 例より採取された大腸の腫瘍原発組織 (Colorectal Cancer : CRC) を研究対象とした。対照には、それぞれの癌患者より採取された原発組織周囲の非腫瘍組織 (Adjacent Normal Mucosa : ANM) を用いた。

#### 定量 PCR 法

各組織より total RNA を抽出し cDNA 合成をした後、各種プライマーを用いて、CRC 群ならびに ANM 群における EGFR ファミリー (ErbB1, ErbB2, ErbB3, ErbB4) とリガンド (EGF, TGF- $\alpha$ , BTC, AREG, EREG, HB-EGF, NRG1, NRG2) の発現量を定量 RT-PCR 法により測定し、両群間で比較した。適正な内部標準遺伝子 (Housekeeping gene : HKG) を選定するために、3 項目の HKG (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [GAPDH], Hypoxanthine phosphoribosyltransferase [HPRT],  $\beta$ -actin [ACTB]) の発現量を比較解析した。

#### ゲノム DNA 抽出と K-ras 遺伝子変異の検出

K-ras 遺伝子の変異の有無については、ゲノム DNA 抽出キットおよび Luminex 法を用いて解析した。

#### 統計処理

CRC 群および ANM 群における EGFR ファミリーとリガンドの発現量の比較については、Wilcoxon signed-rank test を用いた。また、CRC 群における K-ras 変異の有無による EGFR ファミリーとリガンドの発現量の比較については Mann-Whitney U-test を用いた。統計解析ソフトには Prism5 for Windows (Graph Pad Software, Inc, CA, USA) を用い、 $P < 0.05$  を有意差ありと判定した。

#### 【結 果】

##### 1. 適正な HKG の選定

適正な HKG を選定するために GAPDH, HPRT, ACTB の 3 項目について、122 例の CRC 群と ANM 群における発現量を比較検討した。ACTB の発現量は CRC 群および ANM 群において同等であったが、GAPDH および HPRT においては CRC 群において ANM 群よりも有意に高発現していた。

##### 2. ANM 群および CRC 群における EGFR ファミリーとリガンドの発現量比較

EGFR ファミリー遺伝子発現は、CRC 群および ANM 群において、ErbB2 が共通して最も多く、ErbB4 はごくわずかであった。CRC 群において、ErbB3 は ANM 群よりも有意に高発現しており、逆に ErbB1 は ANM 群よりも有意に低発現であった。

リガンドの発現量は、CRC 群において、EGF, BTC, AREG, EREG, HB-EGF は ANM 群よりも有意に高発現しており、逆に、NRG1, NRG2 は ANM 群よりも有意に低発現であった。

##### 3. CRC 群における K-ras 変異の有無の割合および臨床データとの比較

K-ras 遺伝子に変異を認めた CRC 群は 122 検体中 45 検体 (36.4%) であった。臨床データとの比較を行った結果、性別では女性 (62 検体中 27 検体 [43.5%]) に多く、部位別では上行結腸 (30 検体中 14 検体 [46.7%]) と盲腸 (9 検体中 4 検体 [44.4%]) に多く、T stage では pT1/T2 (18 検体中 8 検体 [44.4%]) に、N stage では N1-3 (71 検体中 31 検体 [43.7%]) に、clinical stage では stage III (52 検体中 25 検体 [48.1%]) に K-ras 変異が多く、全体平均の 36.4% をはるかに超えていた。

##### 4. CRC 群における K-ras 変異の有無および EGFR ファミリーとリガンドの発現量比較

K-ras 変異群においては、非変異群と比べて ErbB1, ErbB2, ErbB3, BTC, AREG, EREG, NRG1, NRG2 の発現量が有意に低かった。EGF, TGF- $\alpha$ , HB-EGF などの他の分子においても同様の傾向が認められたが、有意差は認められなかった。

#### 【考 察】

GAPDH, HPRT, ACTB について、CRC 群および ANM 群のサンプル間で発現量の比較を行った結果、ACTB が両群間で同等の発現量をもたらしたため、ACTB を内部標準遺伝子に選定した。

これまで、免疫組織化学的解析に大腸癌組織における EGFR ファミリーの発現量に関する検討はなされてきたが、定量的に各分子の発現量を同一患者の隣接正常組織を対照として明確に示した報告はない。本研究において、CRC 群における EGFR ファミリーの発現量を定量 RT-PCR 法を用いて解析した結果、CRC 群において、ErbB3 の発現量が ANM 群よりも有意に高発現していた。一方、ErbB3 と結合する NRG1 と NRG2 の CRC 群における発現量は、ANM 群よりも有意に低発現していた。ErbB3 と結合して強いシグナル伝達能力を発揮する ErbB2 の発現量を考えると、今後、ErbB3 を標的とした特異的分子標的薬の開発を目指す意義は大きいと考えられた。

本研究における対象患者の 36.4% に K-ras 遺伝子の変異が認められたが、これは日本人および欧米人の大腸癌患者におけるこれまでの報告と同様の結果であった。また本研究においては、K-ras 遺伝子の変異を伴う CRC 群では、非変異群に比べて ErbB1, ErbB2, ErbB3, BTC, AREG, EREG, NRG1 および NRG2 の発現量が有意に低く、K-ras 遺伝子に変異が

あると、EGFR ファミリーのシグナル伝達にリガンドとの結合を必要とせずに、独立した下流シグナルの作用によって癌化が進行する可能性が示唆された。これは、K-ras 遺伝子に変異を伴う大腸癌患者は、抗 ErbB1 抗体療法の適応外となっている理由とも整合する。

ErbB2 は結合するリガンドが存在しないにも関わらず、CRC 群における K-ras 変異の有無で発現量を比較すると、ErbB1、ErbB3 と連動して発現量が異なった。これらの結果から、ErbB2 がホモダイマーではなくヘテロダイマーとして機能している可能性が示唆された。

現在、乳癌に対して抗 ErbB2 抗体が使用されているものの、大腸癌に対する ErbB1 以外の分子を標的にした治療薬は、臨床的な根拠不足により治験の段階で留まっている。本研究より、日本人の大腸癌患者における癌化には ErbB1 だけでなく、ErbB2 および ErbB3 も関与している可能性が示唆された。

#### 【結 論】

日本人の大腸癌患者 122 例を用いて、ANM 群および CRC 群における EGFR ファミリーとリガンドの発現解析、K-ras 遺伝子の変異と EGF 関連遺伝子の関連性について検討した。CRC 群における ErbB3 の高発現、K-ras 遺伝子の変異を伴う CRC 群における ErbB1、ErbB2、ErbB3、BTC、AREG、EREG、NRG1、NRG2 の低発現より、日本人の大腸癌患者における癌化には ErbB1 のみならず、ErbB2 および ErbB3 も関与している可能性が示唆された。これらの結果は、新たな治療体系の構築に寄与するものと考えられる。

#### 審査の結果の要旨

本研究は日本人の大腸癌組織において、その増殖・転移に関与している可能性のある 4 種類の上皮成長因子受容体とそれらに対する 8 種類のリガンドについて遺伝子発現量を調べ、高発現しているものに着目し、それらの作用を抑制することで癌治療への臨床応用の可能性を検討したものである。

大腸癌患者 122 例より腫瘍原発組織とその周囲の非腫瘍組織を採取し、遺伝子発現量を定量 PCR 法により比較した。さらに腫瘍原発組織は K-ras 遺伝子の変異の有無で 2 群にわけ遺伝子発現量を比較した。

その結果、腫瘍原発組織では受容体としては ErbB3 遺伝子が、リガンドでは AREG、EREG、BTC、EGF および HB-EGF 遺伝子が非腫瘍組織にくらべ有意に高発現していた。また K-ras 非変異群では受容体として ErbB1、ErbB2、ErbB3、リガンドとしては AREG、EREG、BTC、NRG1、NRG2 が K-ras 変異群にくらべ有意に高発現していた。

以上の結果から、大腸癌組織においてこれらの高発現している遺伝子が癌の増殖・転移に関与している可能性が示唆された。近年 K-ras 非変異大腸癌では抗 ErbB1 抗体を用いた治療が注目されているが、効果のない症例もあり、これらにたいしては抗 ErbB2 抗体および抗 ErbB3 抗体についても検討する必要があると考察している。

本研究は、大腸癌の増殖・転移に関与している可能性のある上皮成長因子受容体とそのリガンドの遺伝子発現量について新しい知見を提供し、治療法の発展に寄与するものである。また将来口腔癌の研究、臨床治療にもつながる重要な研究結果でもあると思われる。よって、本論文は博士（歯学）の学位申請に値するものと判定した。