

## 論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士 ( 医学 )	氏名	難波 将史
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1・2 項該当		
論文題目 Anti-KL-6/MUC1 monoclonal antibody reverses resistance to trastuzumab-mediated antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity by capping MUC1 (KL-6/MUC1 抗体は MUC1 の capping を誘導し、トラスツズマブの抗体依存性細胞傷害に対する感受性を改善させる)			
論文審査担当者			
主 査	教授	杉山 一彦	印
審査委員	教授	有廣 光司	
審査委員	准教授	大上 直秀	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>MUC1 は、豊富な糖鎖を有する細胞膜貫通型の高分子糖蛋白であり、生理的には乳腺、卵巣、肺などの腺管上皮細胞に主に発現している。MUC1 は正常組織においては腺管上皮細胞の細胞表面、特に頂端部に局在して発現している。しかし、乳癌や肺癌などの一部の腺癌細胞では MUC1 が過剰発現し極性を失うことで、細胞表面全体に分布する。</p> <p>MUC1 が過剰発現することは様々な癌腫において予後不良因子となる。この一因として、MUC1 が癌細胞の免疫逃避に関わっている可能性がある。著者らは以前 MUC1 が過剰発現した乳癌細胞株においてリンホカイン活性化キラー細胞 (LAK 細胞) 活性が減弱することを示した。また、MUC1 のシアル化糖鎖抗原である Krebs von den Lugen-6 (KL-6) に対する抗体を加えることで、細胞表面上の MUC1 が局在化 (capping) し、LAK 細胞活性が増強することも示した。</p> <p>trastuzumab は、HER2 受容体に対するヒト化モノクローナル抗体であり、HER2 陽性の乳癌患者に使用される。trastuzumab は、HER2 受容体に結合して直接細胞内シグナルを調整することで増殖抑制作用を示し、加えて抗体依存性細胞傷害 (Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC) を介することで殺細胞効果を発揮するが、投与しているうちに効果が減弱することが知られている。この HER2 陽性乳癌の trastuzumab 耐性に MUC1 が関与している可能性はいくつか報告されているが、trastuzumab 介在性の ADCC 活性の減弱と MUC1 がどのように関わっているかは明らかにされていない。</p> <p>以上の背景から著者らは、MUC1 が免疫逃避に関わることで、trastuzumab の ADCC 活性にも影響を与えていると仮説を立て、複数の乳癌細胞株において MUC1 の発現量と ADCC 活性との相関関係を比較した。また、siRNA を用いて MUC1 をノックダウンすることが ADCC 活性へどのように影響するかを調べた。さらに、KL-6 抗体が引き起こす MUC1 の capping が ADCC に影響を与えるかどうかを調べた。</p> <p>まず、著者らはウエスタンブロット法を用いて、6 種の乳癌細胞株 (YMB-S、YMB-A、MDA-MB-175、OCUB-F、SK-BR-3、MDA-MB-361) の MUC1 発現量、HER2 発現量を定量化した。YMB-S、YMB-A、MDA-MB-175、OCUB-F の 4 種で MUC1 が過剰発現しており、SK-BR-3、MDA-MB-361 では MUC1 は発現していなかった。6 種すべてで HER2 の発現が観察された。蛍光抗体を用いて、細胞表面上の MUC1 の分布を観察したところ、MUC1 過剰発現株のうち YMB-S と MDA-MB-175 では細胞表面上に均一に分布していたのに対して、YMB-A と OCUB-F ではパッチ状に局在化していた。さらに、<sup>51</sup>Cr リ</p>			

リースアッセイを用いて、trastuzumab の ADCC 活性を評価したところ、MUC1 が細胞表面上に均一に分布していた YMB-S と MDA-MB-175 では ADCC 活性が低く、MUC1 がパッチ状に局在化していた細胞株は ADCC 活性が高かった。

次に MUC1 発現量と trastuzumab の ADCC 活性との関連を検証するため、MUC1 過剰発現株のうち trastuzumab の ADCC 活性が低かった YMB-S と MDA-MB-175 に対して、siRNA を用いて MUC1 をノックダウンしたところ、両者ともに ADCC 活性の増強がみられた。つまり MUC1 の発現量は trastuzumab の ADCC 活性に強く影響を与えていることが示唆された。

続いて、KL-6 抗体が trastuzumab の ADCC 活性に影響を与えるかどうかを調べた。KL-6 抗体は trastuzumab の ADCC 活性が低く、加えて MUC1 が細胞表面上に均一に分布していた YMB-S と MDA-MB-175 における trastuzumab の ADCC 活性を増強させた一方で、MUC1 がパッチ状に局在化していた細胞株には影響を与えなかった。YMB-S と MDA-MB-175 において KL-6 抗体が MUC1 にどのような影響を与えているかを調べるために、蛍光抗体を用いて細胞表面上の MUC1 の分布を観察した。KL-6 抗体を投与すると細胞表面上に均一に分布していた MUC1 は局在化 (capping) し、その形態は YMB-A や OCUB-F で観察された MUC1 のパッチ状に局在化した形態に類似していた。この capping した細胞は KL-6 抗体の濃度依存性に増加した。同様に KL-6 抗体の濃度依存性に trastuzumab の ADCC 活性の増強もみられた。この現象は YMB-S、MDA-MB-175 の両者で観察され、別の MUC1 抗体を用いても同様の結果が得られた。最後に MUC1 の capping が trastuzumab の ADCC による細胞死と関係があるかどうかを調べるために、タイムラプスで MUC1 分布の変化と細胞死の様子を観察した。MUC1 が均一に分布している細胞では、細胞死が誘導されず、MUC1 が capping している細胞では細胞死が誘導されていた。以上の結果から、KL-6/MUC1 抗体は MUC1 を capping し、trastuzumab の ADCC 活性を増強させていることが示唆された。

本研究から、MUC1 が過剰発現かつ細胞表面上に均一に分布している乳癌細胞株は、trastuzumab の ADCC 活性が減弱することが示唆された。MUC1 の発現量を減らす、あるいは KL-6/MUC1 抗体による MUC1 の局在化 (capping) を起こすことによって、この ADCC 活性は増強した。すなわち、細胞表面上の MUC1 の発現量だけではなく、分布形態もまた癌細胞の免疫逃避に影響を与えていることを明らかにした。

以上の結果から、本論文は、trastuzumab 介在性の ADCC において MUC1 の過剰発現だけではなく、その分布形態が癌細胞の免疫逃避に強く影響を与えていることを明らかにしており、免疫逃避のメカニズムの一つを提唱した点で高く評価される。

よって審査委員会委員全員は、本論文が難波 将史に博士 (医学) の学位を授与することに十分な価値があるものと認めた。

最終試験の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（医学）	氏名	難波 将史
学位授与の条件	学位規則第4条第1・2項該当		
論文題目 Anti-KL-6/MUC1 monoclonal antibody reverses resistance to trastuzumab-mediated antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity by capping MUC1 (KL-6/MUC1抗体はMUC1のcappingを誘導し、トラスツズマブの抗体依存性細胞傷害に対する感受性を改善させる)			
最終試験担当者			
主査 教授	杉山 一彦	印	
審査委員 教授	有廣 光司		
審査委員 准教授	大上 直秀		
〔最終試験の結果の要旨〕			
判 定 合 格			
<p>上記3名の審査委員会委員全員が出席のうえ、平成31年1月7日の第77回広島大学研究科発表会（医学）及び平成31年1月4日本委員会において最終試験を行い、主として次の試問を行った。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1 MUC1の生理活性について</li> <li>2 MUC1の分布形態の評価法について</li> <li>3 接着細胞や組織中における癌細胞のMUC1の分布について</li> <li>4 ADCC活性の測定方法について</li> <li>5 ADCCに関わる末梢血の分画（CTLやNK細胞）について</li> <li>6 トラスツズマブやKL-6抗体介在性ADCCの発生状況について</li> <li>7 MUC1以外の機序がADCCに寄与する可能性について</li> <li>8 他の抗体のADCCへの応用について</li> </ol> <p>これらに対して極めて適切な解答をなし、本委員会が本人の学位申請論文の内容及び関連事項に関する本人の学識について試験した結果、全員一致していずれも学位を授与するに必要な学識を有するものと認めた。</p>			