

## 論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 ( 歯 学 )	氏名	SITI NUR ZAWANI BINTI ROSLI
学位授与の要件	学位規則第 4 条第①・2 項該当		
論 文 題 目			
HBp17/FGFBP-1 Expression is Down-regulated by $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ through NF- $\kappa$ B pathway in Oral Squamous Cell Carcinoma Cell Lines. (口腔扁平上皮癌細胞における HBp17/FGFBP-1 の発現は $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ によって NF- $\kappa$ B 経路を介して抑制される。)			
論文審査担当者			
主 査	兼松 隆	印	
審査委員	吉子 裕二		
審査委員	林堂 安貴		
〔論文審査の要旨〕			
<p>Heparin-binding protein 17/FGF-Binding Protein-1 (HBp17/FGFBP-1) は、外陰部扁平上皮癌細胞株 A431 の培養上清より FGF-2 とともに分離・精製された、17kDa のヘパリン親和性分泌蛋白である。HBp17/FGFBP-1 は、FGF-1, -2 と可逆的に結合することから、標的細胞での FGFs の遊離・活性化に深く関与していると考えられている。これまでに、著者の所属する研究室の先行研究では、HBp17/FGFBP-1 遺伝子の上皮細胞への導入による、ヌードマウス背部皮下での造腫瘍性の獲得や、口腔扁平上皮癌組織において、HBp17/FGFBP-1 が血管新生を介した腫瘍増殖に関与していることを報告してきた。</p> <p>活性型ビタミン D3 (<math>1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3</math>) は骨代謝において重要な働きをしており、近年、癌や心臓病さらには若年での死亡リスクを低減させる効果があること、さらにビタミン D の癌予防効果が報告されてきている。また、<math>1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3</math> が転写因子 NF-<math>\kappa</math>B シグナル伝達経路を抑制することにより、上皮細胞の増殖を制御していることが知られている。一方、口腔扁平上皮癌細胞 (OSCC) における <math>1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3</math> の作用については報告がない。そこで、<math>1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3</math> が OSCC の HBp17/FGFBP-1 の発現に及ぼす影響を検討し、さらにそのメカニズムを解明するために以下の研究を行った。</p> <p>無血清培養系で、OSCC 細胞株 UE, NA 細胞および A431 細胞に <math>1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3</math> (40nM) を添加し、12 時間後に RNA および細胞蛋白を抽出し、HBp17/FGFBP-1, FGF-2, ビタミン D3 レセプター (VDR) および NF-<math>\kappa</math>B 関連分子群 (I<math>\kappa</math>B<math>\alpha</math>, p65 および p50) の遺伝子および</p>			

蛋白の発現を、定量 PCR 法およびウエスタンブロット法にて検討した。さらに、HBp17/FGFBP-1 遺伝子プロモーター配列をルシフェラーゼ遺伝子の upstream に組み込み、UE 細胞に遺伝子導入後、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$  によるレポーター活性について検討を行った。また、ELISA 法を用いて、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$  が UE 細胞培養上清中の HBp17/FGFBP-1 と FGF-2 の蛋白量に及ぼす影響を検討した。UE 細胞に VDRi を遺伝子導入することで VDR 発現を抑制した UE 細胞に、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$  を添加し、HBp17/FGFBP-1 発現への影響を検討した。対照として scramble siRNA を用いた。さらに、HBp17/FGFBP-1 抗体を用いて免疫蛍光染色を行い、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$  の細胞内 HBp17/FGFBP-1 の局在に及ぼす影響を検討した。

$1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (40nM) により、UE, NA および A431 細胞における HBp17/FGFBP-1 の遺伝子発現とタンパク発現は低下していた。また、FGF-2, VDR, p65 および p50 の発現は、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$  群で変化は認められなかったが、 $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  の発現は有意に増加していた。レポーターアッセイにおいて、HBp17/FGFBP-1 遺伝子プロモーター配列を遺伝子導入した UE 細胞では  $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$  によりレポーター活性が約 30%低下した。 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$  により、siVDR 細胞では対照群と比べ、HBp17/FGFBP-1 の遺伝子発現は約 20%抑制されたが、対照 siRNA 導入細胞では、約 70%の発現抑制を認めた。siVDR 細胞では、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$  により  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  発現の上昇は認められなかったが、対照 siRNA 導入細胞では、約 70%の発現増加を認めた。さらに、免疫蛍光染色の結果、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$  群では HBp17/FGFBP-1 蛋白の核への局在が増加していた。培養上清中の FGF-2 と HBp17/FGFBP-1 の発現量を、ELISA 法を用いて定量した結果、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$  群では対照群に比べ減少していた。

以上の結果から、OSCC 細胞株において  $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$  は、NF- $\kappa$ B 活性阻害を介して FGFBP/HBp17-1 発現を抑制している可能性が強く示唆された。また、FGFBP/HBp17-1 発現の低下に伴い、培養上清中における FGF-2 濃度も減少することが明らかとなった。これらの結果は、口腔癌に対して  $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$  が FGFBP/HBp17-1 および NF- $\kappa$ B を標的とした新たな治療薬となりうることを示している。

本論文は、口腔癌の新たな病因および病態を明らかにしたものであり、口腔癌の新たな治療法の開発の可能性を示唆するものである。よって、審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士（歯学）の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。