

論文内容要旨

口腔扁平上皮癌の浸潤・増殖における Human Double
Minute2 (HDM2) の機能解析

主指導教員：岡本 哲治 教授

(医歯薬保健学研究科 分子口腔医学・顎顔面外科学)

副指導教員：兼松 隆 教授

(医歯薬保健学研究科 細胞分子薬理学)

副指導教員：栗原 英見 教授

(医歯薬保健学研究科 歯周病態学)

津島 康司

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

論文内容要旨

論文題目：口腔扁平上皮癌の浸潤・増殖における Human Double Minute 2 (HDM2) の機能解析

学位申請者：津島 康司

目的

Human double minute-2 (HDM2)は、癌抑制遺伝子である p53 のユビキチンリガーゼ (E3) として p53 のプロテアソームでの分解に関与するタンパク質であることが知られている。申請者の所属する研究室では、口腔扁平上皮癌 (OSCC) 細胞の浸潤・増殖に関与するインテグリン $\beta 8$ のユビキチン・プロテアソーム系での分解に HDM2 が関与していることを報告してきた。

そこで本研究では、OSCC の浸潤・増殖における HDM2 の機能を明らかにするため、HDM2 発現亢進が OSCC 細胞の増殖能、運動能及び蛋白分解活性に与える影響について検討するとともに、OSCC 組織における HDM2 の発現を免疫組織学的に検討し、種々の臨床病態因子との関連性について統計的に解析した。

方法

OSCC 細胞株として舌癌由来細胞株 SCCKN を用いた。SCCKN の total RNA を template に Revers transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法で HDM2 の open reading frame を含む領域を増幅し、哺乳動物発現ベクター pCI-neo に HDM2 cDNA を組み込み、pCI-neo/HDM2 を作成した。続いて、対照ベクター-pCI-neo あるいは pCI-neo/HDM2 をリポフェクション法にて SCCKN に導入し、それぞれ KNmock, 及び HDM2 高発現細胞株 KN-HDM2 を分離した。

各細胞の細胞増殖能及び細胞運動能は、それぞれ 5% 仔ウシ血清を含む RD 培地 (1:1 mixture of RPMI 1640 and Dulbecco's Modified Eagle's Medium) での 6 日間培養後の細胞数及びケモタキセルを用いた Boyden チャンバー変法により検討した。また、各細胞の蛋白分解活性は、カゼインを基質とするザイモグラフィにて解析した。さらに、I 型コラーゲンゲル内三次元培養法にて各細胞の三次元での浸潤・増殖動態を検討した。各細胞における上皮間葉転換 (epithelial mesenchymal transition: EMT) 関連分子の mRNA 及び蛋白発現を、それぞれ Droplet Digital PCR 法及びウエスタンブロット (WB) 法で解析した。さらに、EMT 関連分子の各細胞画分における局在を明らかにするため、各細胞から細胞質、膜、核、クロマチン及び細胞骨格画分を分離抽出し、各画分における EMT 関連蛋白の発現

を WB 法で検討した。HDM2 と E-cadherin の複合体形成については、抗 E-cadherin 抗体または抗 Hdm2 抗体を用いた共免疫沈降法で検討した。

広島大学病院顎・口腔外科において外科的治療を中心に加療した OSCC 86 例における HDM2 の発現を免疫組織学的に検討し、弱～強染色された症例を陽性群、全く染色されなかった症例を陰性群とし、腫瘍の大きさ、頸部リンパ節転移、及び 5 年生存率などの臨床病態因子と HDM2 発現との関連性を統計学的に解析した。なお、生存曲線の算出は Kaplan-Meier 法で、HDM2 陽性・陰性群間の統計学的有意差検定は logrank 法で行い、危険率 5%以下を有意差ありとした。すべての統計解析には、R 及び R コマンダーの機能を拡張した統計ソフトウェア EZR を用いた。

結果

1. KN-HDM2 細胞は、KNmock 細胞と比較して 細胞増殖能が低下していたが、細胞遊走能及び蛋白分解活性の亢進を認めた。
2. KN-HDM2 細胞では、N-cadherin, claudin-1 及び vimentin の mRNA 及び蛋白の発現亢進を認めた。一方、E-cadherin の蛋白発現は低下していたが、mRNA 発現は SCCKN 細胞及び KNmock 細胞と差はみられなかった。
3. 共免疫沈降法にて E-cadherin と HDM2 は細胞内で複合体を形成していることが明らかとなった。
4. KN-HDM2 細胞では β -catenin の核内移行が認められた。
5. OSCC 組織での HDM2 発現は、腫瘍の大きさ (T) や頸部リンパ節転移 (N) とは関連しなかったが、HDM2 発現群における 5 年生存率は、非発現群に比べて有意に低下していた。

結語

HDM2 は OSCC 細胞の運動能と蛋白分解活性を促進し、浸潤能を亢進させていることが示された。HDM2 発現亢進に伴い、E-cadherin の mRNA 発現には変化がなかったが、蛋白発現は低下していた。また E-cadherin は HDM2 と複合体を形成し、ユビキチン化されプロテアソームで分解されていることが示唆された。一方、HDM2 発現亢進に伴い β -catenin の核内移行の亢進、N-cadherin 及び vimentin の mRNA 及び蛋白の発現亢進が認められたことから、HDM2 と Wnt/ β -catenin 系及び N-cadherin や vimentin などの EMT 関連分子との関連性が示唆された。さらに、HDM2 は OSCC の予後不良因子であることが示唆されたことから、HDM2 を標的とした OSCC の診断・治療の有用性が示唆された。