

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（歯学）	氏名	津島 康司
学位授与の条件	学位規則第4条第1・2項該当		
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			
論文審査担当者			
主査教授 藤井 万紀子		印	
審査委員 教授 柿本 直也			
審査委員 准教授 虎谷 成昭			
<p>〔論文審査の結果の要旨〕</p> <p>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β8 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おり、口腔扁平上皮癌での HDM2 発現や、増殖，浸潤および予後における HDM2 の役割について明らかにすることは、口腔扁平上皮癌の新しい診断・治療法の開発において重要である。</p> <p>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。</p> <p>OSCC細胞株として舌癌由来細胞株SCCKNを用いた。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ーにて解析した。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，β-catenin蛋白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，各画分における蛋白の発現</p>			

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、及び疾患特異的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 log-rank 検定で行い、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。その結果、以下のことが明らかとなった。

1. HDM2 は扁平上皮癌細胞の運動能と蛋白分解活性を促進し、I型コラーゲンゲルへの浸潤を亢進させた。
2. HDM2 発現亢進に伴い、E-cadherin 蛋白の発現は低下したが、mRNA 発現には変化を認めなかった。N-cadherin と vimentin 蛋白の発現および mRNA 発現は上昇した。
3. E-cadherin はプロテアソームでの分解を受け、HDM2 と複合体を形成していた。
4. HDM2 発現亢進に伴い、E-catenin の核移行が亢進していた。
5. 口腔扁平上皮癌組織での HDM2 発現は、TNM 分類やステージ分類との関連性は認められなかったが、HDM2 陽性群の生存率は、陰性群のそれと比較して有意に低下していた。

以上の結果から、HDM2 は扁平上皮癌細胞の運動能と蛋白分解活性を促進し、浸潤を亢進させていることが示された。また、HDM2 の発現亢進に伴い β -catenin の核移行の亢進を示唆する所見が認められたことから、HDM2 は Wnt/ β -catenin シグナル系ともクロストークすることで、EMT 関連分子の発現を調節し、扁平上皮癌細胞の運動・浸潤に深く関与していることが考えられた。また、口腔扁平上皮癌組織での HDM2 発現は、口腔癌患者の生存率と大きく関わっていることが明らかとなったことから、口腔扁平上皮癌の予後予測因子、さらには新たな診断・治療の分子標的としての有用性が考えられた。

本論文は口腔癌研究の発展に寄与するところが大きいものと評価される。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（歯学）	氏名	津島 康司
学位授与の条件	学位規則第4条第1・2項該当		
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			
最終試験担当者			
主査教授	藤井 万紀子	印	
審査委員 教授	柿本 直也		
審査委員 准教授	虎谷 成昭		
〔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29年6月7日の広島大学研究科発表会（歯学）及び平成29年8月10日に開催した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"> 1. HDM2の遺伝子・蛋白の構造とその機能及び今回作成したHDM2発現ベクターの構造とその特徴について 2. I型コラーゲンゲル内でのHDM2高発現細胞の増殖機構とEMT関連蛋白発現との関係について 3. プロテアソーム阻害剤を用いた培養細胞研究の手法について 4. 口腔癌のYK分類（浸潤様式分類）とHDM2発現及びp53発現の関連性について 5. 細胞内分子を標的とした治療薬のデザイン法について 6. HDM2の発現を指標とした口腔癌診断への応用の可能性について <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係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のに必要な学識を有するものと認めた。</p>			