

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	信本 忠義
学位授与の条件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目			
口腔扁平上皮癌における Claudin1 の発現機構ならびに機能解析			
論文審査担当者			
主査	教授 兼松 隆	印	
審査委員	教授 杉山 勝		
審査委員	講師 林堂 安貴		
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>研究目的</p> <p>Claudin-1(CLD1)は，タイトジャンクションの主要な構成蛋白で，上皮細胞の細胞間接着を制御していることが知られている。</p> <p>申請者の所属する研究室の先行研究において，p53 のユビキチンリガーゼ(E3)である Human double minute-2（HDM2）が，β-カテニン経路を介して口腔扁平上皮癌（OSCC）細胞の CLD1 等の EMT 関連分子発現を調節している可能性をみいだした。</p> <p>本研究では OSCC 細胞の CLD1 の発現機構を明らかにするために，CLD1 発現における β-カテニン経路の関与を検討するとともに，E3 の1つである Ligand of numb-protein X1（LNX1）と CLD1 発現との関連について検索した。さらに OSCC の浸潤・増殖における CLD1 の役割を明らかにするため，遺伝子導入による CLD1 発現亢進が，口腔扁平上皮癌細胞の浸潤・増殖に与える影響について検討した。さらに広島大学病院顎・口腔外科にて加療した OSCC 組織における CLD1 発現を免疫組織学的に検索し，臨床病理学的因子との関連性について解析した。</p> <p>研究方法</p> <p>実験には，OSCC 細胞株 SCCKN と，SCCKN に遺伝子導入により作成した HDM2 高発現細胞株 KN-HDM2 を用いた。</p> <p>GSK38 阻害剤 LiCl と，β-カテニンと Tcf の結合阻害剤 PNU74654 が OSCC 細胞の CLD1 蛋白発現に与える影響をウエスタンブロット法で検索した。さらにプロテアソーム阻害剤 MG132 とオートファジー阻害剤クロロキシンが，OSCC 細胞の CLD1 及び LNX1 の蛋白発現に与える影響を解析した。</p> <p>LNX1 と，CLD1 または HDM2 との複合体形成を共免疫沈降法にて検討した。さらに LNX1 と，CLD1 または HDM2 との結合を mammalian two-hybrid 法で解析した。すなわち LNX1 遺伝子を Activation Domain Cloning Vector である pVP16 に組込み LNX1-pVP16 を作製した。CLD1 遺伝子または HDM2 遺伝子を GAL4 DNA-Binding Domain Cloning Vector である pM に組み込み，それぞれ CLD1-pM または HDM2-pM を作製した。Reporter Vector である pG5SEAP とともに，CLD1-pM 及び LNX1-pVP16 または HDM2-pM 及び LNX1-pVP16 を A431 に導入し，培養上清中のアルカリフォスファターゼを測定した。</p> <p>SCCKN に，哺乳動物発現ベクター pCI-neo に CLD1 遺伝子を組み込んだ pCI-neo/CLD1 を導入し，CLD1 高発現細胞株 KN-CLD1 を分離した。</p> <p>各細胞の細胞運動能は，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。タンパク分解活性は，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 型コラーゲンゲルを用いた三次元培養法にて各細胞の増殖様式を検討した。</p> <p>広島大学病院顎・口腔外科にて外科的治療を行った OSCC 84 例における CLD1 発現を免疫組織学的に検討し，生存率や臨床病理学的因子との関連性を検討した。なお，生存曲線</p>			

は Kaplan-Meier 法で算出し, CLD1 陽性・陰性群間の有意差検定は log-rank 法で行い, 危険率 5%以下を有意差ありとした。

研究結果

1. LiCl は CLD1 蛋白発現を亢進し, PNU74654 は CLD1 蛋白発現を低下させた。
2. MG132 およびクロロキンは, LNX1 及び CLD1 の蛋白発現を亢進させた。
3. 共免疫沈降法と Two-hybrid 法により, LNX1 は, CLD1 または HDM2 と結合することが明らかになった。
4. KN-CLD1 細胞では, 増殖能, 細胞遊走能, 蛋白分解活性及び浸潤能が亢進していた。
5. OSCC 組織では, CLD1 発現群は, CLD1 非発現群に比べ, 生存率が有意に低下していた。

結語

CLD1 は, β -カテニン経路を介して発現が調節されていた。CLD1 は LNX1 と複合体を形成しユビキチン化され, オートファジーまたはプロテアソームでの分解を受けている可能性が考えられた。さらに LNX1 は HDM2 と結合していることから, HDM2 は LNX1 のユビキチン化やオートファジーまたはプロテアソームでの分解に関与している可能性が示唆された。すなわち, HDM2 発現誘導により LNX1 分解が促進された結果, CLD1 分解が抑制されている可能性が推測された。

CLD1 は OSCC 細胞の増殖能, 運動能と蛋白分解活性を促進し, 浸潤増殖を亢進させていることが明らかになった。CLD1 は OSCC の予後不良因子であることが示され, CLD1 を標的とした OSCC の診断・治療の有用性が示唆された。

以上の結果から, 本論文は, 口腔外科学をはじめ歯科医学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, 本論文が信本 忠義に博士(歯学)の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。

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	信本 忠義
学位授与の条件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目			
口腔扁平上皮癌における Claudin1 の発現機構ならびに機能解析			
最終試験担当者			
主査	教授 兼松 隆	印	
審査委員	教授 杉山 勝		
審査委員	講師 林堂 安貴		
〔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30年12月26日の広島大学研究科発表会（歯学）及び平成31年2月15日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"> 1 今回研究では主に1細胞株を実験に使用しているが、今回の知見は口腔扁平上皮癌全体に普遍化できる知見かどうか 2 Claudin family の正常および癌における機能について 3 Claudin1 の発現変化による tight junction のバリア機能の変化と、今回の知見との関連性について 4 Claudin 1 の構造とその機能について 5 癌細胞での Claudin1 の機能が発生臓器により異なる理由について 6 ユビキチン化を検討する実験方法について 7 HDM2 と LNX1 の相互作用とその意義について <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に必要な学識を有するものと認めた。</p>			