

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 中嶋 俊雄

学位論文題名

口腔扁平上皮癌細胞におけるシグナル伝達アダプター分子 Crk の役割

【背景と目的】

近年、わが国の口腔癌患者は増加傾向にあり、治療成績が向上しているにもかかわらず、口腔癌死亡数は1950年の699人(男432人)から2000年の約5066人(男3610人、8.4倍)と過去50年間に約7.2倍の増加が記録されている。同様の傾向は世界的にも見られるようで、Macfarlaneらの調査によると24カ国中19カ国で口腔癌の増加傾向があり、特に中央や西ヨーロッパ諸国における男性患者は過去30年間に3倍以上に増加していることが報告されている。口腔癌のほとんどは、口腔粘膜に発生する扁平上皮癌であり臨床病理学的特徴は、男性に多く、好発部位は舌縁部で、病理組織学的には高分化型とされていたが、近年では必ずしもこのように固定したものではないことが報告されている。

西洋での罹患率は、禁煙とアルコール非摂取の普及に伴ってわずかに低下しているが、口腔内の舌や特に中咽頭でHPV感染によるものが、より多く罹患しているとされている。

また、治療後の局所に存在しているHPVや二次原発性により大きな死亡数をしめしていると報告されている。口腔は、大別すると口腔底、歯肉、口唇、口蓋、臼後部からなる器官である。舌には、嚥下機能、構音機能、味覚認識機能があり、日常背活において重要な器官である。わが国の高齢化社会への急速な移行において、特に舌は日常生活において重要な器官であり舌癌の正確な診断と治療を持って克服すべき疾患である。そのため、様々な腫瘍に関与しているとされるアダプター分子 Crk I と CrkII の役割の相違、およびHPVとの関連性を舌の扁平上皮癌で解析し、病理組織学的な相関性の有無を検討した。

【材料と方法】

舌の扁平上皮癌細胞の切片、HNSCCの細胞株そして、HSC-3は、北海道大学歯学部病態病理学分野の進藤 正信教授からの好意により分与を得た。

免疫組織化学的染色の評価をするため、抗 Crk I /Crk II モノクローナル抗体を一次抗体として使用し、peroxidase-labeled 二次抗体と、diaminobenzidin(DAB)を基質として使用しポジティブに染色された染色強度と腫瘍細胞の比率を記録した。

Crk II、Crk I /Crk II ノックダウンの HNSCC 細胞株を樹立するため、BLOCK-iT™

Lentiviral Pol II miRNAi Expression System を使用し作成した。

pcDNATM6.2-GW/EmGFPmiR-neg control は、ネガティブコントロールとして使用した。また、Lentiviral particles を感染させるため、pLenti6.4/R4R2/V5-DEST ベクターは ViraPower Packaging plasmid mixture:pLP1,pLP2 そして pLP/VSV-G を入れた 293FT 細胞を使用して lipofectamine 2000 とともにトランスフェクションした。miRNA で、HNSCC 細胞株、HSC-3 そして HSC-4 へのトランスフェクションをした。

細胞増殖能は 1×10^5 の細胞を、直径 60 mm の dish にまき 1%FBS を含む DMEM にて培養し 1 日、3 日、5 日後に細胞数を hemocytometer (Fisher Scientific, Japan)を用いて計測した。細胞運動能の解析は wound healing assay を行った。細胞を直径 100 mm の dish にまき 10%FBS を含む DMEM で培養した。Wound line は、細胞が一層でコンフルエントになった状態でルーチップにより 1 mm 幅で作成された。3 時間、6 時間、9 時間、12 時間において細胞の移動したフロントラインの長さを計測した。

【結果】

- * 32 症例のヒトの舌扁平上皮癌検体を使用し in-situ hybridization を行った。その結果、HPV-16 と HPV-18 感染は検出できなかった。
- * ヒト頭頸部扁平上皮癌細胞 (HNSCC) の腫瘍の 66% ケースにおいて免疫組織化学的解析で、Crk I / II の大きな発現を確認できた。
- * Crk I の発現強化により細胞増殖能と運動能が大きく回復した。Crk II は、細胞増殖能や運動能が低いため過剰発現を認めなかった。

【考察】

頭頸部扁平上皮癌細胞 (HNSCC) の主因なリスクである喫煙や飲酒そして、ヒトパピロマウイルス (HPV) は、現在 HNSCC の病理学で認知されている。全 HNSCC の約 25% は HPV に関係するとされている。特に、口腔咽頭癌の約 60% は、舌側や口蓋扁桃に HPV 関連していると報告もされている。この研究において、我々は腫瘍形成に関与している HPV の主要なサブタイプの HPV-16 型と HPV-18 型を同定するため 32 症例のヒトの舌扁平上皮癌検体を用いて in-situ hybridization を行った。その結果、HPV-16 と HPV-18 感染は検出できなかった。しかし、免疫組織化学にて解析したヒトの舌扁平上皮癌検体のほとんどの症例で、高いレベルの CRK I / Crk II の発現を確認した。また、腫瘍の 66% の症例において Crk I / II の過剰発現を確認できた。この結果から、ヒト HNSCC において HPV 感染よりも CRK I / II の分子的作用が重要であることが示唆された。同時に、この研究で Crk I が Crk II よりも運動能や増殖能で突出していることが明らかになった。この結果、Crk I が、腫瘍形成において重要な細胞機能を持つことが示唆された。

【結論】

我々は、CRK I は CRK II と比較して HNSC 細胞の運動能や増殖能の役割においてより重要であると確認した。このことは、HNSCC の診断や新しい治療ターゲットとして潜在的な分子的標的となることを示唆している。