

学 位 論 文 要 旨

氏 名 徳善 紀彦

論 文 名 cell division cycle associated 5 を標的とする口腔扁平上皮癌治療の有用性

学位論文要旨

【目的】

近年、種々の標的分子に対する治療薬の開発が進み、臨床応用されているが、口腔扁平上皮癌に使用できる分子標的薬は上皮成長因子受容体 (EGFR) を標的としたセツキシマブのみである。そこで、われわれはこれまでマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を用いて口腔扁平上皮癌の治療に有用となる標的分子候補を探索してきた。その結果、ヒト口腔扁平上皮癌細胞株に共通して発現亢進する遺伝子の一つとして Cell Division Cycle Associated 5 (CDCA5) を同定した。CDCA5 は姉妹染色体の接着に関わる分子として同定され、肺癌においては癌の増殖に重要な役割を担っていることが明らかとなっている。しかし、口腔扁平上皮癌に対する報告は未だない。そこで、本研究では口腔扁平上皮癌における CDCA5 の発現および機能について明らかにし、治療標的としての有用性について検討を行った。

【方法】

ヒト口腔扁平上皮癌細胞株 (GFP-SAS、Ca9-22、HSC2、HSC3) およびヒト不死化角化上皮細胞株 (HaCaT) から total RNA、蛋白質を抽出し、リアルタイム定量化 RT-PCR (qRT-PCR) 法、ウェスタンブロット法にて、CDCA5 mRNA および蛋白質の発現量を比較検討した。次に、CDCA5 発現抑制に伴うヒト口腔扁平上皮癌への影響を検討するために、CDCA5 を標的とした合成 small interfering RNA (siCDCA5) を 10 nM の濃度で導入し、48 時間後に蛋白質を抽出し、ウェスタンブロット法にて CDCA5 発現抑制効果を検討した。つづいて、口腔扁平上皮癌細胞を 96 ウェルプレートに播種し、siCDCA5 を導入し、72 時間後の生細胞数を WST-8 ass

ayにて評価した。また、口腔扁平上皮癌細胞に siCDCA5 を導入し、48 時間後にフローサイトメトリーを行い、CDCA5 抑制による細胞周期への影響について検討した。次に、*In vivo* における siCDCA5 の腫瘍抑制効果について検討を行った。GFP-SAS 細胞 (2×10^6 個) をヌードマウスの背部皮下に移植し、1 週間後に siRNA とアテロコラーゲンを混和し、腫瘍周囲への局所投与を行い、腫瘍抑制効果を評価した。その後、ヌードマウスを犠牲死させた後に、形成された腫瘍を取り出し、蛋白質を抽出し、ウエスタンブロット法にて CDCA5 の発現抑制効果について検討した。次に、当科で樹立した口腔扁平上皮癌由来初代培養細胞における、siCDCA5 の発現および siCDCA5 の細胞増殖抑制効果についてウエスタンブロット法および WST-8 assay にて検討を行った。口腔扁平上皮癌組織における CDCA5 の発現を検討するために、同一患者由来の口腔扁平上皮癌組織および隣接正常粘膜から total RNA を抽出し、CDCA5 mRNA の発現量を qRT-PCR 法にて比較検討し、また CDCA5 蛋白質の局在と発現を免疫組織化学染色法にて確認した。さらに、口腔扁平上皮癌症例を CDCA5 高発現群と低発現群に分類し、臨床病理組織学的因子および Kaplan-Meier 生存曲線にて予後との関連について検討した。

【結果】

全てのヒト口腔扁平上皮癌細胞株は HaCaT と比較し、CDCA5 mRNA および蛋白質の発現亢進を認めた。口腔扁平上皮癌細胞株に siCDCA5 を導入することで、CDCA5 蛋白質の著明な発現抑制を認め、WST-8 assay の結果、70~81%の細胞増殖抑制効果を認めた。フローサイトメトリーでは CDCA5 の発現抑制により G1 期の細胞数が減少し、G2 期の細胞数が増加する G2 arrest を認めた。*In vivo* においても siCDCA5 投与群はコントロール群と比較し、有意な腫瘍抑制効果を認めた。さらに、siCDCA5 で処理した腫瘍では CDCA5 蛋白質の発現低下を認めた。口腔扁平上皮癌患者由来の初代培養細胞では CDCA5 の発現亢進を認め、siCDCA5 を導入することで 69-139% の細胞増殖抑制効果を認めた。口腔扁平上皮癌組織では正常口腔粘膜と比較し、CDCA5 mRNA および蛋白質の発現亢進を認めた。免疫組織染色にて、CDCA5 の発現と臨床病理学的検討を行ったところ、CDCA5 高発現群では低分化な症例が有意に多く認められ、さらに、CDCA5 高発現症例では全生存率が有意に不良であり、CDCA5 の発現と予後との相関を認めた。

【考察】

CDCA5 は口腔扁平上皮癌において有意に発現亢進しており、CDCA5 の発現阻害は著明に口腔扁平上皮癌細胞の増殖を抑制することより、CDCA5 が口腔扁平上皮癌の新たな治療標的分子となる可能性が示唆された。

キーワード (3~5)	口腔扁平上皮癌 CDCA5 Cell Cycle 分子標的薬
-------------	---