

学位論文審査結果の要旨

氏名	徳善 紀彦
審査委員	主査 羽藤 直人 副査 今村 健志 副査 矢野 元 副査 江口 真理子 副査 高井 昭洋

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

審査結果の要旨

【目的】近年、種々の標的分子に対する治療薬の開発が進んでいるが、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、申請者ら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、肺癌や尿路上皮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) を用いて、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) を導入し、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に siCDCA5 を導入し、生細胞数を WST-8 assay にて評価した。また、口腔扁平上皮癌細胞に siCDCA5 を導入し、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。続いて、*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、ウエスタンブロット法にて CDCA5 蛋白質の発現抑制効果について検討した。また、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、qRT-PCR 法および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。

【結果と考察】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、著明な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 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。

以上の結果から、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。

本論文の公開審査会は、平成 28 年 1 月 7 日に開催され、申請者は、研究内容を英語で明確に発表し、以下の内容を含む多くの質問に対し日本語で的確に応答した。

1) マイクロアレイ解析による標的分子候補から CDCA5 を選択した理由、2) 他の癌や正常組織での CDCA5 の発現、3) 口腔扁平上皮癌での CDCA5 高発現の分子メカニズム、4) CDCA5 がゲノム不安定性を誘導するか、5) 実験方法や結果の詳細、6) mRNA と蛋白質での CDCA5 発現乖離の理由、7) 他領域の扁平上皮癌での CDCA5 高発現の可能性、8) CDCA5 を用いたテーラーメイド治療の将来展望、9) 臨床応用へ向けた siCDCA5 の治療効果の限界と可能性など。審査委員は、申請者が本論文関連領域に対して学位授与に値する十分な見識と能力を有することを全員一致で確認し、本論文が学位授与に値すると判定した。