

氏 名	乾 琢真
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	博士 甲第692号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成26年 3月10日
学位論文題目	Association of p62/SQSTM1 Excess and Oral Carcinogenesis (p62/SQSTM1 の過剰発現と口腔癌化の関係について)
審査委員	主査 教授 扇田 久和 副査 教授 醍醐 弥太郎 副査 教授 杉原 洋行

論文内容要旨

*整理番号	698	(ふりがな) 氏名	(いぬい たくま) 乾 琢真
学位論文題目	Association of p62/SQSTM1 Excess and Oral Carcinogenesis (p62/SQSTM1 の過剰発現と口腔癌化の関係について)		
<p>[目的] p62/SQSTM1(p62) は細胞内に存在し、様々なタンパク質と相互作用する多機能タンパク質であり、近年はオートファジーにおいて選択的に分解される基質として注目されている。一方で、p62 は肝癌をはじめとする様々な癌で異常蓄積が報告されており、癌との関係も注目されてきているが、いまだ口腔扁平上皮癌での報告はない。また、口腔扁平上皮癌を含む頭頸部癌はその解剖学的な位置から多くの Reactive Oxygen Species (ROS) に曝露されていることが報告されており、その防御機構が研究されてきている。p62 は ROS に対する抗酸化タンパク質群の発現誘導にユビキチンリガーゼアダプタータンパク質 Keap1 とストレス応答性転写因子 Nrf2 の抗酸化タンパク質発現経路を介して強く関わっていることがすでに報告されている。本研究ではヒト口腔癌細胞株での p62 の発現、機能解析を行い、また臨床的に p62 の発現を評価し、予後との関係を解析することとした。</p> <p>[方法] 当院歯科口腔外科を受診した 54 例の口腔扁平上皮癌と 14 例の上皮異形成、29 例の正常上皮組織について p62、Nrf2 の抗体を用いた免疫組織化学的評価と Duolink® を用いた in situ PLA (Proximity Ligation Assay) 評価を行った。また in vitro においてヒト口腔癌細胞株 SAS、CAL27 を使用し、Western blot、WST-8 assay、GSH/GSSG assay、ROS assay、DNA assay などを行い、p62 の発現や機能の解析を行った。</p> <p>[結果] 免疫組織染色において口腔扁平上皮癌は、他の組織と比較して p62 が高発現であった。in situ PLA においても p62 の発現は有意に高発現であることが確認できた。また in vitro において、Western blot 法を用いてヒト口腔癌細胞株 SAS、CAL27 における p62 発現量を測定したところ、正常繊維芽細胞に比べ高発現であることが確認できた。</p>			

- 備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

高発現であった p62 を sh-RNA を用いて knock down した口腔癌細胞株を使用し、Western blot 法を用いて通常条件下と放射線照射下でタンパク発現を確認したが、予想に反して p62 と関連する Keap1 や Nrf2 の発現、抗酸化タンパク質などの発現に大きな変化は認めなかった。しかし、細胞増殖を確認するために行った WST-8 assay では、放射線照射下において control 細胞は十分に増殖するのに対し、p62 knock down 細胞は有意な増殖の鈍化を認めた。次に重要な抗酸化タンパク質の 1 つであるグルタチオンについて測定を行った。放射線照射下の p62 knock down 細胞では有意に GSH が減少しており、グルタチオンの発現は抑制されていることが示唆された。また同じ条件下において ROS の測定を行った。ROS は p62 knock down 細胞では明らかに高値を示し、細胞が多くの酸化ストレスに曝露されていることが示された。また FACS (fluorescence activated cell sorting) を用いて DNA assay を行うと、p62 knock down 細胞ではその多くで G2/M 期の割合の増加を認めた。DNA 損傷によって細胞周期において G2/M 期チェックポイントが働き、細胞分裂を抑制していることが示唆された。これらの結果をふまえて、免疫組織染色を用いた p62 の発現評価と臨床経過の解析が可能であった口腔扁平上皮癌 49 症例について、高発現群とそれ以外の群とで予後について Kaplan-Meier 解析を行なった結果、明らかな有意差を認めた (Chi-Square value = 4.640, p = 0.0312)。

[考察]

口腔扁平上皮癌は多くの ROS に曝露されていることがすでに報告されていることから、それに抵抗する機能を備え生存していることは予想できた。しかし、今回の結果から、口腔扁平上皮癌において、抗酸化タンパク質の発現機能は既知である Nrf2-Keap1 pathway だけでなく、p62 の異常蓄積からなるグルタチオンの発現も大きく影響していると考えられた。その結果、p62 が異常蓄積した口腔扁平上皮癌では、ROS に対する細胞死抵抗性が向上し、薬物療法や放射線治療などへの抵抗性を示すとともに、生命予後の悪化に関係していることが示唆された。

[結論]

p62 は口腔扁平上皮癌において、ROS 環境下での細胞生存における重要なタンパク質であることを示唆する結果であった。また、臨床において口腔扁平上皮癌の p62 高発現は、癌化の指標となり、病理組織診断における判断材料の 1 つになるだけでなく、血液検査の腫瘍マーカー、分子標的薬としての臨床応用が期待される。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	698	氏名	乾 琢真
論文審査委員			
<p>(学位論文審査の結果の要旨) (明朝体 11ポイント、600字以内で作成のこと。)</p> <p>肝細胞がん患者から最初に単離された p62/SQSTM1 は、様々ながんでその発現が亢進していることが見出されている。また、p62 は多くのタンパク質と相互作用し、活性酸素に対する抗酸化タンパク質の発現調節など多面的な機能を発揮することが報告されている。しかし、口腔扁平上皮がんにおける p62 の発現状態や機能については、これまで全く検討されていない。本研究ではこの点について検討を行い、以下の結果を得た。</p> <ol style="list-style-type: none"> (1) 口腔扁平上皮がん組織およびヒト口腔がん細胞株での p62 発現量は、正常組織および細胞に比べ増加していた。 (2) p62 をノックダウンした口腔がん細胞では、放射線照射後の細胞の増殖はコントロール細胞と比較して有意に鈍化した。活性酸素産生はコントロール細胞と比較して増加した。一方、抗酸化作用を有するグルタチオンの発現はコントロール細胞と比較して有意に減少した。 (3) 口腔扁平上皮がん患者 49 名に関して、p62 高発現群とそれ以外の群で臨床予後を検討したところ、p62 高発現群で 2 年生存率が有意に低下した。 <p>以上より、本論文は口腔扁平上皮がんにおいて p62 の発現が増加することと、その発現ががん細胞に及ぼす影響と臨床的な意義についての新しい知見を示したものである。さらに、最終試験として論文内容に関連した試問を受け合格したので、博士 (医学) の学位論文に値するものと認められた。</p> <p style="text-align: right;">(総字数 584 字)</p> <p style="text-align: right;">(平成 26 年 1 月 27 日)</p>			