

Title	Spleen tyrosine kinase as a novel candidate tumor suppressor gene for human oral squamous cell carcinoma
Author(s)	大金, 覚
Journal	歯科学報, 109(6): 632-633
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10130/1876">http://hdl.handle.net/10130/1876</a>
Right	

氏名(本籍)	おおがね さとる 大金 覚 (茨城県)
学位の種類	博士(歯学)
学位記番号	第1776号(甲第1051号)
学位授与の日付	平成20年3月31日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Spleen tyrosine kinase as a novel candidate tumor suppressor gene for human oral squamous cell carcinoma
掲載雑誌名	International journal of cancer 第124巻 2651~2657頁 2009年
論文審査委員	(主査) 柴原 孝彦教授 (副査) 山根 源之教授 井上 孝教授 水口 清教授

### 論文内容の要旨

#### 1. 研究目的

癌転移メカニズムの分子生物学的解析は、新規転移診断法の確立、新規予後の判定法の確立、新規治療法選択基準の設定、新規転移抑制剤の開発等、転移を予防し、抑制する為の強力な手掛かりとなり得る。

Spleen tyrosine kinase(Syk)は乳癌においては高頻度な発現低下が報告され、腫瘍の浸潤・転移への関与が示唆される癌抑制遺伝子である。近年、いくつかの口腔扁平上皮癌の浸潤・転移関連遺伝子群候補について解析が行われ報告されてきたが、口腔扁平上皮癌における Syk 遺伝子発現状況に関する報告は未だない。

本研究では口腔扁平上皮癌における Syk 遺伝子発現状況を解析した。さらに遺伝子導入法を用いて Syk 遺伝子の機能を解析し、臨床検体を用いた検証実験も行った。

#### 2. 研究方法

口腔扁平上皮癌由来細胞株7種、正常口腔粘膜由来表皮角化細胞2種を使用した。タンパク質発現状況は免疫蛍光染色法により解析した。mRNA の発現状況は定量的 Real-time PCR 法により解析した。さらに PCR-SSCP 法による DNA 構造解析、methylation, demethylation assay による DNA のエピジェネティックな変化について解析を行った。また、完全長 cDNA を pME18SFL3 発現ベクターに組み込み、FuGENE-6 transfection reagent を用いて発現低下している口腔扁平上皮癌由来細胞株に強発現させた。遺伝子導入法の効果は免疫蛍光染色法及び定量的 Real-time PCR 法により確認した。Wound healing assayにより機能解析を行った。また、臨床検体(53例)を用いて免疫組織化学染色法により Syk の発現状況を解析し、臨床指標と比較した。

#### 3. 研究成績および結論

免疫蛍光染色法により正常細胞と比較して口腔扁平上皮癌由来細胞株すべてにおいて Syk タンパク質の発現低下が認められた(7株中7株:100%)。定量的 Real-time PCR 法による mRNA の定量においてもタンパク質の発現状況と一致して口腔扁平上皮癌由来細胞株において Syk の発現低下が認められた。PCR-SSCP 法による DNA 構造解析では、変異は検出されなかったが、Syk 遺伝子5'側 CpG island 領域に高頻度なメチル化が検出された(7株中5株:71%)。さらに脱メチル化剤による demethylation assay においても、これらの細胞株で Syk mRNA の発現が回復した。Wound healing assay では Syk を導入した癌細胞は、ベクターのみを導入した癌細胞と比較して細胞の浸潤能・運動能ともに抑制された。臨床検体を用いた免疫組織化学染色法

では、正常組織と比較して、53例中33例62%で Syk の発現低下が認められた。また、リンパ節転移症例において統計学的に有意に Syk の発現低下が認められた ( $P=0.0042$ )。これらの結果は Syk 発現低下が口腔扁平上皮癌で高頻度な事象であること、またその発現の低下がエピジェネティックな制御による可能性が示唆された。さらに Syk の発現低下と口腔扁平上皮癌の浸潤・転移能との関連が示唆された。

### 論文審査の要旨

癌転移メカニズムの分子生物学的解析は、新規転移診断法の確立、新規予後の判定法の確立、新規治療法選択基準の設定、新規転移抑制剤の開発等、転移を予防し、抑制する為の強力な手掛かりとなり得る。

本論文では、乳癌において高頻度な発現低下が報告され、腫瘍の浸潤・転移への関与が示唆されている癌抑制遺伝子である Spleen tyrosine kinase (Syk) に着目し、口腔扁平上皮癌における Syk 遺伝子発現状況を解析し、さらに遺伝子導入法を用いて Syk 遺伝子の機能解析を行い口腔扁平上皮癌における Syk 遺伝子との関係の解明を試みたものである。

その結果、mRNA、蛋白質レベルにおいて Syk の発現低下が認められ、また DNA レベルにおいてメチル化解析の結果から、口腔扁平上皮癌における Syk の発現低下が、メチル化などのエピジェネティックな制御による可能性が示唆された。また遺伝子導入法を用いた機能解析の結果から Syk は、口腔扁平上皮癌において細胞の運動性、増殖性に対し抑制的に働きかけることが示唆された。

また臨床検体を用いた免疫組織化学染色法の結果、口腔扁平上皮癌において、高頻度の Syk の発現低下が認められ、臨床指標との比較ではリンパ節転移の有無において統計学的に有意な差が認められた。この結果は、Syk が転移能にも関係している可能性が示唆された。

本審査委員会では、1) 口腔扁平上皮癌細胞における Syk の機能、2) Syk 遺伝子の発現解析、機能解析における結果、3) 今後の臨床応用などについて討議ならびに質疑がなされ、概ね妥当な回答が得られた。論文の構成について、一部改善を要するとの指摘があり、修正がなされた。

本研究で得られた結果は、今後の歯学(口腔外科学)の進歩、発展に寄与するところ大であり、学位授与に値するものと判定した。