

氏名（本籍）	井上 敬介（岐阜県）
学位の種類	博士（医学）
学位授与番号	甲第 1118 号
学位授与日付	令和 2 年 3 月 25 日
学位授与要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	Pathobiological role of cleft palate transmembrane protein 1 family proteins in oral squamous cell carcinoma.
審査委員	（主査）教授 中島 茂 （副査）教授 清島 真理子 教授 森重 健一郎

## 論文内容の要旨

### 【緒言】

口腔扁平上皮癌（OSCC）は、顎口腔領域において最も頻度の高い悪性腫瘍である。早期発見が比較的容易で、早期癌での予後は良いにも関わらず、進行例での予後は不良である。その発生頻度は増加傾向にあり、分子標的薬を含む OSCC の新たな治療法の開発が望まれている。

Clptm1 (cleft palate transmembrane protein 1) family protein は 1998 年に唇顎口蓋裂家系から単離クローニングされた膜貫通タンパク質であり、近年、様々な悪性腫瘍において発現が亢進し、腫瘍増殖や臨床予後に関与することが示唆されている。そこで、本研究では Clptm1 およびその family である CRR9 (Cisplatin resistance-related protein 9 ; Clptm1L) の OSCC における病理生物学的な役割を検討した。

### 【対象と方法】

1 : 岐阜大学医学部附属病院・歯科口腔外科で手術を行った 98 例の OSCC 病理標本を用いて、Clptm1 抗体および CRR9 抗体を用いて免疫組織化学染色を行い、臨床病理学的な因子と染色性との関連性を評価した。また、CRR9 の高発現は、アポトーシス耐性との関連性が報告されているため、抗アポトーシス分子である Bcl-xL 抗体を用いて二重免疫組織化学染色を行った。次いで、Kaplan-Meier 生存曲線における log-rank 検定を行い、Clptm1 および CRR9 の染色性と臨床予後との相関を解析した。

2 : OSCC の代表的な細胞株である SAS, Ca9-22 から培養した腫瘍細胞を用いて CRR9 の発現を蛍光免疫染色および cell analyzer にて評価した。

3 : SAS, Ca9-22 細胞株より培養した腫瘍細胞において、siRNA を用いて CRR9 を down-regulate し、コントロール群との腫瘍増殖能の比較、Matrigel invasion assay による浸潤能の比較、Annexin V と Propidium iodide を用いた Anoikis assay による足場依存性のアポトーシスに対する耐性能の比較を行った。

### 【結果】

1 : Clptm1 および CRR9 いずれも、OSCC の腫瘍浸潤部において有意な染色性を示した。Clptm1 では染色態度 (immuno-reactivity) と病理学的因子および臨床予後に関連性は認めなかったが、CRR9 では陽性群で有意な臨床予後の悪化を認めた ( $P = 0.0426$ )。また、CRR9 の染色態度は腫瘍の浸潤深達度と関連性を認め、CRR9 の発現が予後および浸潤能に影響を与える可能性が示唆された。さらに、

CRR9 陽性の早期 OSCC 群において、CRR9 と Bcl-xL の染色態度は相関関係を示した。

2 : SAS および Ca9-22 細胞株から培養したいずれの腫瘍細胞においても、細胞膜表面で CRR9 の高発現が確認された。

3 : siRNA (s37500, s37501) を用いて CRR9 の発現を抑制し、定量 PCR およびイムノブロットにより発現抑制を確認した。CRR9 発現抑制による、腫瘍細胞の細胞増殖能に有意差は認めなかったが、浸潤能は有意に抑制された。また、Zymography においては MMP-2 発現抑制の可能性が示された。細胞接着を阻害し足場依存性の細胞死を検出する Anoikis assay では、CRR9 の発現抑制がアポトーシスを有意に増加させることが明らかとなった。

### 【考察】

Clptm1 および CRR9 のいずれも OSCC 細胞において過剰発現がみられ、特に CRR9 ではその発現性と臨床予後に関連性を認めた。早期 OSCC 群において、CRR9 発現と抗アポトーシス分子 Bcl-xL の発現には相関関係を認め、早期癌において CRR9 の過剰発現がアポトーシス抑制に働く可能性が示唆された。また、*in vitro* でも CRR9 の発現がアノイクス耐性の獲得に関与していることが明らかとなり、CRR9 の過剰発現が、アポトーシス耐性を獲得し腫瘍増殖を促すと考えられた。さらに、CRR9 の発現が、腫瘍浸潤能を促進することが明らかとなったが、これは MMP-2 経路を介した腫瘍増殖促進と推測される。

### 【結論】

OSCC における Clptm1 family proteins の臨床病理学的な役割を検討し、特に CRR9 において、その過剰発現が腫瘍浸潤能やアポトーシス耐性を獲得することにより腫瘍増殖を促進し、臨床予後に影響を与える可能性を明らかにした。本研究により、CRR9 は OSCC 進行に対する標的分子になり得ると考えられた。今後、さらなる研究により、早期診断ツールや新たな分子標的治療の開発につながることを期待できる。

## 論文審査の結果の要旨

申請者 井上敬介は、口腔扁平上皮癌 (OSCC) における膜貫通タンパク質 Clptm1 family の臨床病理学的な役割を検討した。OSCC の手術材料では、Clptm1 family のひとつ CRR9 の発現が、腫瘍の浸潤進達度や臨床予後と相関することを明らかにした。さらに、培養 OSCC 細胞を用いて CRR9 が MMP-2 の発現やアノイクス耐性の獲得に関与し、増殖能や浸潤能を促進している可能性を示した。本研究結果は、口腔扁平上皮癌の分子メカニズムの一端を明らかにしたものであり、今後の口腔腫瘍学の発展に少なからず寄与するものと認める。

---

[主論文公表誌]

Keisuke Inoue, Kiichi Hatano, Yuki Hanamatsu, Chiemi Saigo, Yusuke Kito, Katsuaki Bunai, Toshiyuki Shibata, Tamotsu Takeuchi : Pathobiological role of cleft palate transmembrane protein 1 family proteins in oral squamous cell carcinoma.

Journal of Cancer Research and Clinical Oncology : 145: 851-859 (2019).

Doi : 10.1007/s00432-019-02843-0 (2019).