

学 位 論 文 要 旨

博士課程 甲・号	第79号	氏名	山本 晃士
[論文題名]			
Hepatocyte growth factor activator inhibitor type-2 (HAI-2/ <i>SPINT2</i>)は口腔扁平上皮癌細胞の浸潤性増殖に寄与する。			
Hepatocyte growth factor activator inhibitor type-2 (HAI-2/ <i>SPINT2</i>) contributes to invasive growth of oral squamous cell carcinoma cells.			
<i>Oncotarget</i> , 9 (14) : 11691-11706, 2018			
DOI : https://doi.org/10.18632/oncotarget.24450			
[要 旨]			
<p>がん細胞周囲微小環境におけるプロテアーゼ活性制御の破綻は発がんやがん進展に寄与することが知られている。このプロテアーゼ活性制御機構として、細胞膜結合型セリンプロテアーゼインヒビターである hepatocyte growth factor activator inhibitor (HAI) の役割に着目し研究を行ってきた。HAI は血中の肝細胞増殖因子活性化酵素を抑制するタンパク質として見出され、HAI-1 と HAI-2 が同定されており、共に上皮細胞に広く発現している。上記標的酵素以外に組織 kallikrein や trypsin などの分泌型セリンプロテアーゼと、matrilysin、hepsin、prostasin などの細胞膜結合型セリンプロテアーゼが知られている。当研究室では、HAI-1 が上皮組織の恒常性維持に働き、その機能破綻が発癌や癌細胞の浸潤・転移に寄与することを報告してきた。口腔扁平上皮癌 (OSCC) においては、強い間質浸潤を示す浸潤先端部のがん細胞では細胞膜上の HAI-1 が著明に減少し、その程度がリンパ節転移と相関した。さらに HAI-1 減少による matrilysin 活性亢進は線維芽細胞遊走を惹起し、がん随伴線維芽細胞のリクルートにも寄与していた。一方 HAI-2 については、肝細胞癌、腎癌、神経膠芽腫においてその発現が遺伝子メチル化により強く抑制され、がん抑制タンパクとして機能している可能性を報告したが、逆に発現亢進を示すがんも報告されており、その本来の生体内機能やがん進展における意義についてはほとんど分かっていない。</p> <p>本研究は OSCC における HAI-2 の機能を解析することを目的とし、培養細胞、切除 OSCC 病理組織標本、および公開されているがんゲノムデータベースを用いて検証した。</p> <p>まず、ヒト OSCC 細胞株 (SAS および HSC3) と不死化表皮細胞 (HaCaT) を用いた <i>in vitro</i> による検討を行った。これらの細胞株における HAI-2 mRNA 発現レベルを</p>			

確認したところ、有意差は見られなかったものの HaCaT と比較して OSCC 細胞株でより強く発現している傾向が見られた。HAI-2 の機能を解析するため、CRISPR/Cas9 システムを用いて HAI-2 遺伝子 (*SPINT2*) の欠損株を作製した。HAI-2 欠損 OSCC 細胞はコントロール細胞と比較して増殖能とマトリゲル浸潤能が有意に低下し、これらは HAI-2 を強制発現させることで回復した。一方で HaCaT ではこのような現象はみられなかった。一般的に、がん組織の浸潤先端では低酸素環境になることから、同様の検討を低酸素状況下でも行ったが、正常酸素濃度状態と同様の結果を得た。また足場非依存性増殖能や細胞遊走能についても、HAI-2 欠損 OSCC 細胞株は有意に低下していた。同様に HAI-1 欠損 OSCC 株も作成したが、HAI-1 欠損では有意に浸潤能が亢進した。これらのことより、HAI-2 は OSCC において HAI-1 のように抑制因子としては機能しておらず、むしろ OSCC の進行に寄与している可能性がある。

次に、HAI-2 欠損による悪性形質減弱化のメカニズムを解明することとした。E-cadherin や vimentin などの上皮間葉転換関連分子の発現や matrix metalloproteinase 活性には、HAI-2 欠損による影響は見られなかった。そこで、HAI-2 の標的と考えられているプロテアーゼ群の発現を確認すると、近年になって様々ながんにおいてがん抑制蛋白としての機能が報告されている prostaticin の発現亢進が HAI-2 欠損株に共通して見られた。これらのことから、HAI-2 欠損によって生じた悪性形質減弱が prostaticin 発現亢進を介して生じているのではないかとの仮説を立て、siRNA を用いた prostaticin 発現抑制を試みたところ、HAI-2 欠損により低下した遊走・浸潤能が回復した。一方、増殖能低下に対してはこのような効果は認められなかった。以上のことは、HAI-2 は OSCC 細胞ではむしろ高発現しがんの進展に関与し、その機能の一部は prostaticin の制御を介している可能性を示している。

最後に、ヒト OSCC 組織での HAI-2 発現とその意義を検討した。25 例の切除 OSCC 組織を用いて免疫組織学的に評価したところ、正常重層扁平上皮での強陽性率が 9/25 症例(36%)であったのに対し、前がん病変では 23/25 例(92%)、浸潤がんでは 24/25 例(96%)で強陽性を示し、正常上皮と比較して有意に発現が上昇していた ($p<0.0001$)。また、病変部において HAI-2 陽性像と prostaticin 陽性像が逆相関する傾向も確認できた。さらに、TCGA がんゲノムデータベースを用いて OSCC 切除組織の HAI-2 mRNA レベルと患者予後との相関を検証したところ、統計学的な有意差は見られなかったもの ($p=0.068$)、HAI-2 mRNA 高値群が予後不良である傾向が認められた。

これらの結果は、OSCC においては、HAI-2 は発がんとがん進展に伴い発現が亢進し、口腔扁平上皮癌の悪性形質獲得に関与していることを示している。

備考 論文要旨は、和文にあっては 2,000 字程度、英文にあっては 1,200 語程度とする。