

# 口腔扁平上皮癌におけるkallikrein-related peptidase 6の発現と機能に関する研究：上皮-間葉 転換における $\Delta$ Np63との関わりについて

金子, 直樹

<https://hdl.handle.net/2324/1806949>

---

出版情報：九州大学, 2016, 博士（歯学）, 課程博士  
バージョン：  
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）

氏 名	金子 直樹			
論 文 名	口腔扁平上皮癌における kallikrein-related peptidase 6 の発現と機能に関する研究 ～上皮-間葉転換における $\Delta$ Np63 との関わりについて～			
論文調査委員	主 査	九州大学	教授	森 悦秀
	副 査	九州大学	教授	西村 英紀
	副 査	九州大学	教授	前田 英史

### 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

近年、癌の浸潤・転移における上皮-間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition: EMT) の関与が報告されている。これまでに発表者らは、癌抑制遺伝子 p53 のホモログである  $\Delta$ Np63 の発現減弱が、EMT を誘導することを示してきたが、その詳細な機序は不明であった。そこで本研究では、 $\Delta$ Np63 の発現を認めない口腔扁平上皮癌 (oral squamous cell carcinoma: OSCC) 細胞株 (SQUU-B) に  $\Delta$ Np63 の splicing variant の 1 つである  $\Delta$ Np63 $\beta$  を過剰発現させた細胞株を用い、DNA マイクロアレイ法にて  $\Delta$ Np63 の下流で EMT に関与する遺伝子の特定を試みた。さらに、OSCC における候補遺伝子とその関連分子の発現と機能について検討を行い、EMT による浸潤・転移の分子機構を明らかにした。

まず、DNA マイクロアレイ解析を行ったところ、 $\Delta$ Np63 $\beta$  過剰発現 OSCC 細胞株で最も発現量が上昇したのは、膜貫通型受容体 protease activated receptor (PAR) を活性化するプロテアーゼである kallikrein related peptidase 6 (KLK6) であった。そこで、KLK6、PAR1、PAR2 の発現と機能についてさらに検討を進めた。OSCC 細胞株における  $\Delta$ Np63、KLK6、PAR1 および PAR2 の発現を RT-PCR 法により検索した。多くの細胞株において  $\Delta$ Np63、KLK6、PAR2 の発現を認めたが、EMT 形質を有する SQUU-B 細胞ではそれらの発現が認められず、PAR1 のみ発現していた。他の細胞では、PAR1 の発現は認められなかった。次に、 $\Delta$ Np63 $\beta$  の発現がこれらの遺伝子の発現に与える影響について検討したところ、 $\Delta$ Np63 $\beta$  過剰発現細胞では、コントロールと比較して KLK6 と PAR2 の発現量が大きく、PAR1 の発現量は低かった。また、siRNA を用いて、 $\Delta$ Np63 をノックダウンすると、KLK6 と PAR2 の発現は減少し、逆に PAR1 の発現は増加した。さらに、KLK6 の機能を調べるために、OSCC 細胞に KLK6 shRNA を遺伝子導入し、KLK6 をノックダウンしたところ、多角形であった細胞形態が紡錘形へと変化し、上皮系マーカーの発現量減少、間葉系マーカーおよび EMT 関連遺伝子の発現量増加を認めた。また、細胞遊走能と浸潤能は亢進していたが、細胞増殖は抑制されていた。加えて、OSCC 生検標本 111 例における  $\Delta$ Np63、KLK6、PAR1 および PAR2 の発現を免疫組織化学的に検索した。 $\Delta$ Np63、KLK6、PAR2 は隣接口腔粘膜上皮ではその発現をほとんど認めなかったが、上皮性異形成、OSCC ではこれらの発現が亢進しており、特に OSCC の腫瘍中心部で強い発現を認めた。一方、PAR1 は、隣接口腔粘膜で有棘層と顆粒層に発現を認めたが、上皮性異形成と腫瘍中心部では発現を認めなかった。しかし、浸潤先端部では、腫瘍中心部と比較し  $\Delta$ Np63、KLK6、PAR2 の発現は減弱していたが、PAR1 の発現は亢進していた。さらに、腫瘍中心部と浸潤先端部における KLK6 の発現強度を測定し、臨床病理組織学的所見との

関連について検討したところ、浸潤先端部で **KLK6** の発現強度の減弱を有する群（44 例）では局所再発、頸部リンパ節転移および遠隔転移の発生頻度が有意に高く、その疾患特異的累積 5 年生存率も低かった。

本研究結果から、 $\Delta$ Np63 の発現減弱は、**KLK6** と **PAR2** の発現低下と **PAR1** の発現亢進を介して **EMT** を誘導し、**OSCC** の浸潤・転移に関与することが示唆された。これらの結果は **OSCC** の **EMT** に関する新知見であり、博士（歯学）の学位授与に値すると判断された。