

氏名 吉本智人

授与した学位 博士

専攻分野の名称 歯学

学位授与の番号 博甲第2982号

学位授与の日付 平成17年3月25日

学位授与の要件 医歯学総合研究科機能再生・再建科学専攻(学位規則第4条第1項該当)

学位論文題名 Different Expression Patterns of beta-Defensins in Human Squamous Cell

Carcinomas.

(口腔扁平上皮癌におけるHBDの発現様式の検討)

論文審査委員 教授 佐々木 朗 教授 永井 教之 教授 菅原 利夫

学位論文内容の要旨

<緒言>

Ganzらにより、好中球アズール顆粒中に1985年始めて発見されたヒト α -DefensinとHarderらにより見いだされたヒト β -Defensinは、非免疫的で最も緊急な生体防御ペプチドであるため、感染予防のカギを握っている物質の一つと見なされている。抗菌ペプチドであるDefensinは、非免疫的な生体防御に関係すると報告され、抗菌、抗ウイルス、抗真菌など、幅広い作用が報告されている。上皮で発現する β -defensin(HBD)の中で恒常的に発現し、他の外的因子の影響を受けにくいHBD-1の他に、発現様式が類似しサイトカイン等により発現が上昇することが報告されているHBD-2およびHBD-3が存在する。中でもHBD-2の抗菌作用は、他のサブタイプより強く、特に注目されている。しかし、これまでの多くのDefensinに関する研究は生体防御機能ばかりが注目され、Defensinの発現が宿主側の細胞に及ぼす影響については、ほとんど注目されてこなかった。

われわれはヒト由来ケラチノサイト(NHEK)とヒト扁平上皮癌細胞(HSC-4)とを共存培養することでHBD-2が上昇することを*in vitro*にて明らかにした。また、高濃度なHBD-2(0.01mM)の存在下ではヒト由来ケラチノサイト(NHEK)のDNA合成は影響を受けないが、分裂活性が低下することが明らかになった。これはセルサイクルにおいてS期には影響しないがM期に移行することを阻害する事で分裂活性の低下を引き起こすことを示してきた。*in vitro*において腫瘍細胞の産生する高濃度のHBD-2は正常細胞の増殖を低下させる可能性が示唆された(参考論文)。

このことから*in vivo*において口腔扁平上皮癌とその周囲組織におけるHBD-2遺伝子の発現様式を、サブタイプのHBD-3と比較して検討し、HBD-2の特異性を明らかにしようと試みた。

<材料及び方法>

1. 供切組織：手術及び生検材料により口腔内組織を患者の同意のもと供試した。口腔扁平上皮癌と診断された41~87歳(男性11例, 女性9例)の手術切除物を患者の同意のもと得た。組織は4%パラホルムアルデヒド溶液後に行いパラプラスチックに包埋に試料を供した。

2. hBD-2, -3 プローブ (insitu hybridization 用) : In situ Hybridization 用の遺伝子については UCLA prof. T Ganz 及び北海道医療大学助教授, 安彦善裕より提供のあった Human cDNA を鋳型とした defensin 遺伝子のクローニングをおこない Dig RNA labeling Kit を用いてプローブを作成した。
3. In situ hybridization 法による hBD-2, -3 遺伝子の同定 : 7 μ m の試料を製作し, Meyer 等(1997) のに準じて hBD の RNA プローブを labeling Kit と共に用いて反応させ anti-digoxigenin-AP を作用させた後に nitroblue tetrazolium chloride および 5-bromo-4-chloro-3-indolyphosphate を用いて発色を行った。カウンターステインはメチルグリーンにて染色した。

<結果および考察>

腫瘍組織に近い周囲組織の口腔粘膜上皮において, hBD-2, -3 の発現は錯角化層から有棘細胞層の上方に発現した。周囲正常口腔粘膜部位では hBD-2, -3 とともに腫瘍組織に近い程, 有棘細胞層での発現領域幅は広く, 離れる程に有棘細胞層の一部を含むから, 錯角化層のみと発現領域は減少し, 最終的に発現は消えていくことが確認された。

vitro における正常上皮細胞株においてサイトカイン等に影響された hBD-2, -3 が類似した発現上昇様式をとることは, 今までの他の研究により報告されていて, vivo で行った当研究結果も一致する結果になった。

一方, 口腔扁平上皮癌 20 例中に 15 例の腫瘍細胞に hBD-2 の発現を認め, hBD-3 の発現は口腔扁平上皮癌 20 例中 4 例であった。腫瘍組織における hBD-2 の発現は 20 例中 15 例と, hBD-3 の 4 例に比べて明らかに高い発現率を示しただけでなく, 腫瘍細胞における hBD-2 の発現は, 隣接する正常上皮細胞に比べて明らかに強かったが, hBD-3 においては発現が見られた 4 例についても, 隣接する周囲正常上皮の発現と大きな差異は認めなかった。

これまでに vivo において口腔扁平上皮癌に hBD-2 が発現するという報告は, 数例報告されていたが hBD-3 についての報告は無く, 同じ腫瘍組織を用いた, hBD-2 と hBD-3 の発現の比較はなされていなかった為, 当研究により新たな知見を得ることができた。

また, 以前にわれわれの行った vitro における研究から腫瘍細胞の産生する高濃度の hBD-2 は, 正常上皮細胞の増殖を抑制するが腫瘍細胞の増殖には, ほとんど影響しないことが明らかにされている。今回の vivo において腫瘍細胞における hBD-2 の発現の上昇は局所における hBD-2 濃度の上昇を引き起こし, 正常上皮細胞の増殖に影響を与えていることで間接的に, 腫瘍細胞の増殖を補助している可能性が示唆された。

論文審査結果の要旨

Defensinは、抗菌、抗ウイルス、抗真菌など、幅広い作用が報告されていて、感染予防のカギを握っている物質の一つと見なされている。Defensinの中でもHuman β -Defensin(HBD)-2、-3の抗菌作用は、他のサブタイプより強い点が特に注目されている。これまでのHBD-2、-3に関する多くの研究は生体防御機能ばかりが注目されており、サブタイプ間での発現パターンの差異やDefensinの発現が宿主側の細胞へ及ぼす影響については、ほとんど注目されてこなかった。

本研究では、*in vivo*において口腔扁平上皮癌とその周囲組織におけるhBD-2、-3遺伝子の発現様式を比較検討し、HBD-2、-3の特異性を明らかにしようと調べたものである。

その結果正常口腔粘膜ではHBD-2、-3共に類似した遺伝子発現様式を示した事は他の研究者の行ってきた*in vitro*における研究結果の裏付けとなる。また、腫瘍組織周囲口腔粘膜上皮でのhBD-2、-3遺伝子の発現は、腫瘍組織に近いほど発現領域は広く強く、離れるほど発現領域は減少し弱くなり、最終的に発現は消えていくなどの新たな知見を得ることができた。

一方、腫瘍細胞そのものにおける遺伝子発現を検討すると、口腔扁平上皮癌細胞におけるhBD-2の発現は75%と、hBD-3の20%に比べて明らかに高い発現率を示しただけでなく、腫瘍細胞におけるhBD-2遺伝子の発現は、隣接する正常上皮細胞に比べて明らかに強い事を明らかにした。これまでに*in vivo*で口腔扁平上皮癌にhBD-2が発現することは報告されていたが、hBD-3の発現についての報告はなされていなかった。加えて、同じ腫瘍組織を用いた、hBD-2とhBD-3遺伝子発現の比較は行われていなかった。以上の点から本研究によりDefensinに関する新たな知見を得ることができたと思われる。

よって、本論文は博士(歯学)の学位論文に値するものと認められた。