



Title	口腔扁平上皮癌におけるβ-カテニンの細胞質内蓄積に関する研究
Author(s)	片桐, 渉
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/43644">https://hdl.handle.net/11094/43644</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	片 桐	歩
博士の専攻分野の名称	博士(歯学)	
学 位 記 番 号	第 16935 号	
学 位 授 与 年 月 日	平成14年3月25日	
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 歯学研究科歯学臨床系専攻	
学 位 論 文 名	口腔扁平上皮癌における $\beta$ -カテニンの細胞質内蓄積に関する研究	
論 文 審 査 委 員	(主査) 教授 由良 義明	
	(副査) 教授 伊集院直邦 講 師 岩本 資己 講 師 大倉 正也	

### 論文内容の要旨

#### 【緒言】

細胞接着に関するE-カドヘリンの裏うちタンパク質として知られる $\beta$ -カテニンは近年、Wntシグナル伝達経路において中心的な役割を果たすことが明らかになり、癌との関連についても研究が進んでいる。ヒト大腸癌や肝細胞癌などではAxin複合体を構成する $\beta$ -カテニン、APC、Axinの変異によりAxin複合体が形成されないため $\beta$ -カテニンのGSK-3 $\beta$ によるリン酸化の抑制が起り、細胞質内へ蓄積した $\beta$ -カテニンがTCF/Lefを介して核内へ移行、cyclinD1、c-mycなどの標的遺伝子の転写を活性化していることが細胞癌化の一因と考えられている。そのような背景より近年では多くの癌で $\beta$ -カテニンの細胞質内蓄積とAxin複合体を構成する遺伝子の変異について研究が進められている。口腔扁平上皮癌においても高頻度な $\beta$ -カテニンの細胞質内への蓄積があることが知られているが、Axin複合体を構成する遺伝子の変異や $\beta$ -カテニンの細胞質内蓄積との関連についてはあまり知られていない。

本研究では口腔扁平上皮癌における $\beta$ -カテニンの細胞質内蓄積の頻度とその原因のひとつと考えられるAxin複合体を構成する各遺伝子の変異について検討するとともに、口腔扁平上皮癌細胞株に変異型 $\beta$ -カテニンを遺伝子導入し、発現させることによって細胞質へ $\beta$ -カテニンを蓄積させ、その細胞がどのような生物学的特性の変化を示すかを検討した。

#### 【材料と方法】

##### ①細胞株と臨床標本

口腔扁平上皮癌細胞株4種(HSC-3、SAS、Ca9-22、KB)を使用した。臨床標本は大阪大学歯学部附属病院第2口腔外科を受診し病理組織学的に扁平上皮癌と診断された症例のうち患者の同意を得て採取した20例の手術摘出物を用いた。

##### ②免疫染色およびウエスタンプロット法

細胞株および臨床標本における $\beta$ -カテニンの細胞内局在は $\beta$ -カテニンに対する抗体を用いて免疫染色あるいはウエスタンプロット法にて確認した。リン酸化 $\beta$ -カテニンの検出には $\beta$ -カテニンのコドン33、45のセリン、コドン41のトレオニンがリン酸化されている $\beta$ -カテニンに対する特異的抗体を用いた。

##### ③PCR-SSCP法およびダイレクトシーケンシング

細胞株および臨床標本サンプルより通法に従いDNAを抽出した。 $\beta$ -カテニン、Axin1、APC遺伝子について各

タンパク結合部位や  $\beta$ -カテニンの GSK-3 $\beta$  によるリン酸化部位を中心に PCR-SSCP 法およびダイレクトシーケンシングを行い変異を同定した。

#### ④トランスフェクション

$\beta$ -カテニンの GSX-3 $\beta$  によるリン酸化部位を含んだ exon3 を欠失させた変異遺伝子の入ったプラスミド pUHD10-3 をリポフェクション法によって Ca9-22細胞にトランスフェクションし、変異タンパク質の存在が確認できた細胞クローン Ca-muCAT5細胞を分離した。

#### ⑤マイグレーションアッセイ

細胞遊走能の検討には上層チャンバーに 8  $\mu$ m の小孔をもつ 2 層構造のチャンバーを用いた。小孔を通過してメンブレンの裏面に移動した細胞数を 200 倍顕微鏡下で 5 視野計測し平均値を求めた。

#### ⑥口腔扁平上皮癌細胞接種によるヌードマウスの腫瘍形成

4 週齢のメス BALB/c ヌードマウス背部皮下に腫瘍細胞を接種し、形成された腫瘍塊より切片を作成した。

### 【結果と考察】

①口腔扁平上皮癌細胞株では 75%、臨床標本では 90% と高頻度な  $\beta$ -カテニンの細胞質内蓄積を認めた。しかしいずれの標本においても核への移行は認められなかった。

②Axin 複合体の構造異常を招きうる遺伝子変異は臨床標本でみられた Axin1 遺伝子のエクソン 1 における変異の 1 例であった。

③ $\beta$ -カテニンの細胞質内蓄積を認めない Ca9-22細胞だけでなく、細胞質内蓄積が認められた他の 3 細胞においてもリン酸化  $\beta$ -カテニンが検出された。

④Ca-muCAT5細胞では  $\beta$ -カテニンの細胞質、核への局在とともに増殖能、遊走能、ヌードマウスにおける造腫瘍性が亢進した。このことから  $\beta$ -カテニンの核での発現が口腔扁平上皮癌細胞の増殖、遊走、造腫瘍性に関与すると考えられた。

### 【結論】

口腔扁平上皮癌において高頻度に  $\beta$ -カテニンの細胞質内蓄積を生じていることが明らかとなった。しかしながら、その原因と考えられた遺伝子変異の頻度は低く、口腔扁平上皮癌においては遺伝子変異とは異なる機構で  $\beta$ -カテニンの細胞質内蓄積が発生している可能性が示唆された。

### 論文審査の結果の要旨

本研究は、口腔扁平上皮癌形成における  $\beta$ -カテニンの働きを明らかにするため、口腔扁平上皮癌における  $\beta$ -カテニンの細胞質内蓄積とそれに関与する  $\beta$ -カテニン (*CTNNB1*)、Axin1、APC 遺伝子の変異の有無につき検討し、さらに口腔扁平上皮癌細胞への変異型  $\beta$ -カテニン遺伝子導入の効果についても検討を加えたものである。

その結果、 $\beta$ -カテニンの細胞質内蓄積が高頻度に認められること、*CTNNB1*、Axin1、APC 遺伝子の変異の頻度は低いことが示唆された。また、変異型  $\beta$ -カテニン遺伝子を口腔扁平上皮癌細胞に導入、 $\beta$ -カテニンを細胞質に発現させることで細胞増殖能、遊走能、造腫瘍性が亢進することが明らかとなった。

以上の結果は、口腔扁平上皮癌形成における  $\beta$ -カテニンの働きを理解する上で極めて重要な知見を与えるものであり、博士（歯学）の学位を与えるに値するものと認める。