へしき　わたる

氏　　　　　名　**平識　亘**

学位の種類　博士（医学）

学位記番号　富医薬博甲第185号

学位授与年月日　平成28年3月23日

学位授与の要件　富山大学学位規則第3条第3項該当

教育部名　富山大学大学院医学薬学教育部　博士課程
生命・臨床医学専攻

学位論文題目　Constitutive Activation of Caspase-3 in Non-Apoptotic Oral Squamous Cell Carcinoma Cells
（口腔扁平上皮癌の非アポトーシス細胞における caspase-3 の活性化）

論文審査委員

（主査）	教　授	齋藤　滋
（副査）	教　授	一條　裕之
（副査）	教　授	近藤　隆
（副査）	教　授	奥寺　敬
（指導教員）	教　授	野口　誠

論 文 内 容 の 要 旨

1．要旨

【目的】Caspase-3 は、アポトーシスの最終段階に働く分子で、活性化により細胞をアポトーシスへと導く。しかし、興味深いことに、最近の研究では、caspase-3 は、細胞のアポトーシスの誘導のみならず、癌細胞の浸潤や増殖、化学療法や放射線療法に対する癌細胞の抵抗性獲得機序にとっても重要な役割を果たすことが示唆されている。しかし、その細胞生物学的な機序については、いまだに不明な点が多い。そこで、本研究では、口腔扁平上皮癌の増殖における caspase-3 を介した制御機構を解明することを目的として、口腔扁平上皮癌の臨床材料を用いた免疫組織学的な解析とヒト口腔扁平上皮癌細胞株を用いた細胞生物学的な手法による解析を行い、口腔扁平上皮癌の増殖における caspase-3 の役割について検討を行った。

【材料と方法】病理組織学的に口腔扁平上皮癌と診断された 30 症例について、caspase-3 の活性化型である cleaved caspase-3 の発現様式を免疫組織化学的に解析した。また、ヒト口腔扁平上皮癌細胞株 HSC-3、HSC-4、SAS を用いた in vitro での解析により、蛍光基質を利用した cleaved caspase-3 の細胞内局在、フローサイトメトリーを用いた cleaved caspase-3 の定量的解析を行った。さらに caspase-3 を介した口腔扁平上皮癌細胞の増殖にあたえる影響を評価するため、HSC-4 細胞に対して、caspase-3 に対する特異的阻害剤である z-DEVD を使用し、HSC-4 細胞の増殖の変化、増殖シグナル伝達分子である Akt、ERK、mTOR のリン酸化の変化について細胞生物学的な手法で評価した。また、デスレセプターの一つである CD95（Fas）に対する刺激抗体（抗 Fas 抗体）を用い、HSC-4 細胞の増殖に与える Fas の影響について、細胞生物学的に評価した。

【結果】口腔扁平上皮癌30症例について、免疫組織学的にcleaved caspase-3の発現を解析したところ、観察したすべての症例でcleaved caspase-3が癌細胞の細胞

質に発現していた。これらの発現は、周辺上皮の非腫瘍細胞では認められず、また、アポトーシスの細胞で認められるような高い染色強度に比べ、これら癌細胞でのcleaved caspase-3の発現は、明らかに低い染色強度であった。さらに、口腔扁平上皮癌細胞株HSC-3、HSC-4、SASを用いて、フローサイトメトリーでcleaved caspase-3の発現レベルについて定量的解析を行った結果、いずれの癌細胞でもアポトーシスの誘導なしにcleaved caspase-3の発現が認められ、その発現強度は、アポトーシス細胞におけるcleaved caspase-3の発現強度に比べて有意に低いものであった。また、caspase-3シグナルの口腔扁平上皮癌細胞の増殖に与える影響をcaspase-3の特異的阻害剤を使用し評価したところ、caspase-3の特異的阻害は、HSC-4細胞の増殖を有意に抑制し、加えて、癌細胞の生存シグナル伝達にとって重要な役割を果たす分子群であるAkt、ERK、mTORのリン酸化がcaspase-3の特異的阻害により低下することが観察された。そこで、このcaspase-3の活性化を誘導する因子について、いわゆるデスレセプターの一つであるCD95（Fas）に注目してさらに検討を行った。最近の研究で、Fasを介したシグナル伝達が、癌細胞の増殖にとって重要な役割を果たすことが報告されていることから、HSC-4細胞を抗Fas抗体で刺激したところ、HSC-4細胞の増殖が有意に増強することが観察された。

【考察】本研究では、解析を行った全ての口腔扁平上皮癌の臨床標本において、cleaved caspase-3 が、癌細胞において選択的に発現していることが観察された。また、扁平上皮癌細胞株を用いた in vitro の解析においても、アポトーシスの誘導とは関連せずに、解析を行った全ての細胞株において発現していることが確認された。また、興味深いことに、その発現量は、アポトーシスの誘導で観察される発現量に比べて、明らかに低い発現量であった。もともと、細胞のアポトーシスの実行にとって、重要な役割を果たすことが知られている分子である

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

【目的】

Caspase-3 は、アポトーシスの最終段階に働くプロテアーゼ分子で、活性化により細胞をアポトーシスへと導く。しかし、興味深いことに、最近の研究では、caspase-3 は、細胞のアポトーシスの誘導のみならず、癌細胞の浸潤や増殖、化学療法や放射線療法に対する癌細胞の抵抗性獲得機序にとっても重要な役割を果たすことが示唆されている。しかし、その細胞生物学的な機序については、いまだに不明な点が多い。そこで、本研究では、口腔扁平上皮癌の増殖における caspase-3 を介した制御機構を解明することを目的として、口腔扁平上皮癌の臨床材料を用いた免疫組織学的な解析ならびに、ヒト口腔扁平上皮癌細胞株を用いた細胞生物学的な手法による解析を行い、口腔扁平上皮癌細胞の増殖における caspase-3 の役割について検討を行った。同時にデスレセプターである Fas の刺激と口腔扁平上皮癌細胞の増殖についても検討した。

【材料と方法】

病理組織学的に口腔扁平上皮癌と診断された 30 症例について、caspase-3 の活性化型である cleaved caspase-3 の発現様式を免疫組織化学的に解析した。また、ヒト口腔扁平上皮癌細胞株 HSC-3、HSC-4、SAS を用いた *in vitro* での解析により、蛍光基質を利用した cleaved caspase-3 の細胞内局在、フローサイトメトリーを用いた cleaved caspase-3 の定量的解析を行った。さらに caspase-3 を介した口腔扁平上皮癌細胞の増殖に与える影響を評価するため、HSC-4 細胞に対して、caspase-3 に対する特異的阻害剤である z-DEVD を使用し、HSC-4 細胞の増殖の変化、増殖シグナル伝達分子である Akt、ERK、mTOR のリン酸化の変化について細胞生物学的な手法で評価した。また、デスレセプターの一つである CD95(Fas)に対する刺激抗体(抗 Fas 抗体)を用い、HSC-4 細胞の増殖に与える Fas の影響について、細胞生物学的に評価した。

【結果】

口腔扁平上皮癌 30 症例について、免疫組織学的に cleaved caspase-3 の発現を解析したところ､観察したすべての症例で cleaved caspase-3 が癌細胞の細胞質と核に発現していた。さらに、口腔扁平上皮癌細胞株 HSC-3、HSC-4、SAS を用いて、フローサイトメトリーで cleaved caspase-3 の発現レベルについて定量的解析を行った結果、いずれの癌細胞でもアポトーシスの誘導なしに cleaved caspase-3 の発現が認められ、その発現強度は、ドセタキセルによりアポトーシスを誘導した細胞における cleaved caspase-3 の発現強度に比べて有

意に（P<0.05）低かった。また、caspase-3 シグナルの口腔扁平上皮癌細胞の増殖に与える影響を caspase-3 の特異的阻害剤を使用し評価したところ、caspase-3 の特異的阻害は、HSC-4 細胞の増殖を有意に（P<0.05）抑制し、加えて、癌細胞の生存シグナル伝達にとって重要な役割を果たす分子群である Akt、ERK、mTOR のリン酸化が caspase-3 の特異的阻害により低下することが観察された。そこで、この caspase-3 の活性化を誘導する因子について、いわゆるデスレセプターの一つである CD95(Fas)に注目してさらに検討を行った。HSC-4 細胞を抗 Fas 抗体で刺激したところ、HSC-4 細胞の増殖が有意に（P<0.05）増強することが観察された。

【総括】

本研究では、従来からアポトーシスの実行分子として認識されてきた caspase-3 が、その活性化レベルの調節によって、癌細胞の増殖を促進することを、口腔扁平上皮癌を用いた解析によって明らかとしたことには新規性がある。

今後の課題としては、癌細胞で恒常的に発現している caspase-3 が、どのように口腔扁平上皮癌細胞の増殖を促進しているのか、Fas を介したシグナル伝達系との関連を含め、さらに詳細な機序について解析を行う必要がある。また、本研究で明らかとなったように、cleaved caspase-3 が、癌細胞に選択的に発現していることが免疫組織学的にも明瞭に確認できることから、この cleaved caspase-3 の発現を利用した転移巣や原発巣における口腔扁平上皮癌の新たな診断への応用が期待されることから学術的重要性は高い。さらには、*in vitro* の解析で、caspase-3 の特異的阻害による、癌細胞の増殖抑制効果も示されていることから、この caspase-3 分子を治療上の標的とした新たな治療戦略の開発も期待され、臨床的発展性が期待できる。

以上より本審査会は本論文を博士（医学）の学位に十分値すると判断した。