

## 博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏 名 横山 侑輔  
学 位 博士 (医学)  
学 位 記 番 号 新大院博 (医) 第 1093 号  
学位授与の日付 令和4年9月20日  
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当  
博 士 論 文 名 Crumbs3 is expressed in oral squamous cell carcinomas and promotes cell migration and proliferation by affecting RhoA activity.  
(Crumbs3 は口腔扁平上皮癌において、RhoA 活性化を制御し、細胞の活動性および増殖性を亢進させる)  
  
論文審査委員 主査 教授 竹林 浩秀  
副査 教授 松本 雅記  
副査 准教授 高橋 邦行

### 博士論文の要旨

#### 【背景】

頭頸部癌は世界で7番目に多く、病理組織学的に扁平上皮癌が9割以上を占め、発生母地として口腔内粘膜上皮が約4割と最も多い。口腔扁平上皮癌 (OSCC) の5年生存率は約50%と未だに予後不良な疾患である。主な原因の一つに腫瘍浸潤に伴う遠隔転移が挙げられ、浸潤・転移を制御する新たな分子の同定が喫緊の課題である。

哺乳類におけるCrumbs3 (Crb3) は、ショウジョウバエのCrb相同タンパク質の一つで、1回膜貫通型の糖タンパク質であり、正常な上皮組織の頂部膜における細胞極性の確立に寄与している。これまでに申請者らの研究グループからCrb3がヒト大腸腺癌で高発現し、腫瘍細胞の転移性を高めることを報告しているが、ヒトOSCCにおける発現と機能については不明であった。申請者は本研究でヒトOSCC細胞におけるCrb3の発現および機能とその作用機序を明らかにすることを目的とした。

#### 【方法・結果】

##### 1. 口腔を含むヒト頭頸部扁平上皮癌 (HNSCC) 組織におけるCrb3の発現

まず、ヒトHNSCC組織切片において抗Crb3抗体を用い、免疫組織化学を行なったところ、口腔内を含む広範なHNSCC組織にCrb3は内在性に発現していた。腫瘍に隣接する正常口腔粘膜上皮細胞にもCrb3は発現していたが、腫瘍と比較して非常に弱い発現であった。

##### 2. ヒトOSCC細胞株におけるCrb3の発現

次に、ヒトOSCC細胞株であるCa9-22, HSC-2, HSC-3において、抗Crb3抗体を用いてイムノブロットおよび免疫蛍光染色を行なったところ、ヒトOSCC細胞株においてもCrb3は内在性に発現していることが判明した。

##### 3. ヒトOSCC細胞株におけるCrb3の機能解析

Crb3特異的siRNAを用いて、ヒトOSCC細胞株 (Ca9-22, HSC-2) におけるCrb3をノックダウン (KD) し、

細胞の増殖性を MTT アッセイで、移動性を Transwell アッセイで検証した。コントロールと比較して Crb3 を KD した細胞の増殖性に変化は認めなかったが、細胞の移動性は著明に低下した。また CRISPR-Cas9 システムを用いて、ヒト OSCC 細胞株 (Ca9-22, HSC-2) の Crb3 ノックアウト (KO) 株を樹立し、MTT アッセイ、Transwell アッセイを行なったところ、親株と比較して Crb3-KO 株で細胞の増殖性と移動性がどちらも低下することが判明した。Crb3 による細胞の移動性の制御機構として、上皮間葉転換 (EMT : Epithelial-Mesenchymal Transition) との関連を検討したが、親株と比較して Crb3-KO 株において EMT マーカーの発現に一貫した変化は認めなかった。

#### 4. In vivo における Crb3 の転移促進作用

免疫不全マウスを用いてヒト OSCC 細胞株肺転移モデルを作成し、HSC-2 の親株と Crb3-KO 株で比較したところ、親株では全て (n=3) で肺転移を認めたが、Crb3-KO 株では全て (n=3) で明らかな肺転移を認めなかった。

#### 5. ヒト OSCC 細胞株における Crb3 の機能と RhoA 活性化との関連

Crb3 がヒト OSCC 細胞における移動性および増殖性を制御する機序として、RhoA 活性化に注目した。RhoA は低分子量 GTP 結合タンパク質 (G タンパク質) Rho ファミリーの一つで、細胞の接着や移動性および増殖性を制御する代表的な因子である。低分子量 G タンパク質はグアニンヌクレオチドとの結合によって活性状態が切り替わり、活性体である GTP 結合型 RhoA は下流のエフェクタータンパク質を介してシグナルを伝達する。まず、RhoA 活性化がヒト OSCC 細胞に及ぼす影響を検証するため、OSCC 細胞株に RhoA 活性化阻害剤 (Y16、Rhosin) を作用させ、MTT アッセイと Transwell アッセイを行なったところ、Crb3 発現抑制時と同様に、OSCC 細胞の移動性および増殖性は低下した。さらに Crb3 と RhoA 活性化との関連を検証したところ、親株と比較し、Crb3-KO 株において RhoA の活性化が著明に低下していた。

#### 【考察・結論】

申請者らは本研究において、Crb3 がヒト OSCC に内在性に発現しており、腫瘍細胞の移動性、増殖性、転移性を亢進させ、その機序として RhoA 活性化を制御していることを初めて明らかにした。これらの知見は、ヒト OSCC における Crb3 を標的とした新たな浸潤・転移抑制治療の可能性を示唆していると考えられた。

#### 審査結果の要旨

Crumbs3 (Crb3) は、ヒト大腸腺癌で高発現し転移性を高めることが報告されている糖タンパク質である。本研究では、ヒト口腔扁平上皮癌 (OSCC) における Crb3 発現と機能について調べた。

免疫組織染色を行ったところ、Crb3 は広範な頭頸部扁平上皮癌組織に発現していた。次に、ヒト OSCC 細胞株 (Ca9-22, HSC-2) において siRNA により Crb3 をノックダウン (KD) したところ、細胞増殖性に変化はせず、移動性は著明に低下した。ゲノム編集法で Crb3 ノックアウト (KO) 株を作製すると、細胞の増殖性と移動性が低下することが判明した。免疫不全マウスを用いてヒト OSCC 細胞株の肺転移モデルを作製すると、親株 (HSC-2) では肺転移を認めたが、Crb3-KO 株では明らかな肺転移を認めなかった。移動性および増殖性を制御する機序として、低分子量 G タンパク質 RhoA に注目し、Crb3-KO 株において RhoA の活性化が著明に低下していることを見出した。OSCC 細胞株に RhoA 活性化阻害剤 (Y16、Rhosin) を作用させると、OSCC 細胞の移動性および増殖性は低下した。

本研究において、Crb3 がヒト OSCC に内在性に発現すること、Crb3 の発現は腫瘍細胞の移動性、増殖性、転移性に関与すること、その機序として RhoA 活性化が考えられることを初めて明らかにした点に学位論文としての価値を認める。