

## 博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 木口 哲郎  
学位 博士 (歯学)  
学位記番号 新大院博 (歯) 第419号  
学位授与の日付 平成31年3月25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 R2TP complex contributes to cancer development in oral squamous cell carcinoma (OSCC)  
R2TP complex は、口腔扁平上皮癌進展に寄与する

論文審査委員 主査 教授 佐伯 万騎男  
副査 教授 高木 律男  
副査 教授 田沼 順一

### 博士論文の要旨

#### 【背景および目的】

口腔癌は癌全体の1%程度であるが、患者数は年々増加傾向にある。口腔癌の治療は、手術に加え、化学療法、放射線療法などを組み合わせて集学的に行われ、口腔癌進展の作用機序の解明は、新たな手術法や抗癌剤の開発に貢献できると考える。分子シャペロン複合体 R2TP complex は、Pontin、Reptin、RPAP3、PIH1D1 の4種類のタンパク質より構成され、ヒートショックプロテイン90 (Hsp90) と相互作用する因子として単離された。R2TP は、リボソーム生合成の他、細胞周期調節やアポトーシス、TELO2 タンパク質を介した PIKK ファミリーへのシグナル伝達などに関与する。一般的に癌細胞は、リボソーム生合成が活性化した結果、核小体が肥大化し、口腔扁平上皮癌 (Oral squamous cell carcinoma, OSCC) 細胞においても細胞異型として同様の所見を認めることから、リボソーム合成の活性化が明らかである。我々は、リボソーム合成を調節する R2TP が OSCC 進展に関与しているのではないかと仮説をたてた。本研究では、OSCC 細胞や組織における R2TP の局在や他のタンパク質 (TELO2、p53) との相互作用について分子生物学的に解析した。

#### 【試料および方法】

OSCC 由来培養細胞 (HSC-2、HSC-3、HSC-4、Ca9-22、SAS) および HeLa 細胞の増殖能について、MTT アッセイで検討した。ウェスタンブロット解析を行い、OSCC 細胞における R2TP の発現について、正常歯肉上皮細胞と比較、検討した。また、R2TP 各因子 (Pontin、Reptin、RPAP3、PIH1D1) の結合や p53、TELO2 タンパク質との相互作用について免疫沈降とウェスタンブロット法を併用し、検討した。OSCC 細胞における R2TP、TELO2、p53 の局在を蛍光免疫染色にて観察した。また、OSCC 組織および正常上皮組織における R2TP の局在を免疫組織化学染色にて観察した。R2TP と OSCC 進展の関連について検討するため、siRNA を用いて R2TP 各因子をノックダウンした HSC-4 細胞を使用し、ウェスタンブロット解析を行い、MTT アッセイおよびスクラッチアッセイで増殖能と遊走能について評価した。OSCC 細胞に対して放射線照射を行い、p53 や DNA 二重鎖切断のマーカー (ATM、Histone H2AX) の発現をウェスタンブロット解析で評価した。

#### 【結果】

今回使用した5種類のOSCC細胞はいずれもHeLa細胞より増殖能が高く、特にHSC-4細胞が最も高い増殖能を示した。また、HSC-4細胞は正常歯肉上皮細胞と比較し、R2TP、TELO2、Hsp90の発現が上昇していた。免疫沈降法ではOSCC細胞におけるR2TP各因子の結合およびTELO2との相互作用を示した。免疫染色にてPIH1D1のみ細胞質への局在が強い傾向であったが、R2TPとTELO2はOSCC細胞の核および核小体へ局在していた。さらに、PontinやReptinをノックダウンしたOSCC細胞では、低濃度のアクチノマイシンD (2.5nM) 処理と同様に核小体キャップ

の形成を認め、そこに Pontin と Reptin が局在していた。一方、免疫組織化学染色では、RPAP3 と PIH1D1 が正常上皮組織では細胞質に局在していたのに対し、OSCC 組織では核に局在していた。R2TP と変異型 p53<sup>R248Q</sup> の相互作用と局在について HSC-4 細胞を用いて検討したところ、免疫沈降では Pontin と p53<sup>R248Q</sup> との結合を認め、免疫染色では Pontin と p53 が核に共局在していた。さらに、R2TP 各因子のノックダウンにより p53 のセリン 15 のリン酸化レベルが低下し、OSCC 細胞の増殖や遊走を有意に抑制した。p53 のセリン 15 は、ATM や Chk-2 によってリン酸化され、これらのタンパクのリン酸化レベルは放射線照射により上昇していたが、p53 セリン 46 のリン酸化レベルは変化しなかった。

#### 【考察】

本研究で我々は、OSCC 細胞における R2TP complex の形成と TELO2 との相互作用を確認した。HSC-4 細胞は増殖活性が高く、正常歯肉上皮細胞と比較し、R2TP 各因子や TELO2、Hsp90 の発現が上昇していたことから、これらの発現レベルと細胞増殖の関連が示唆された。そこで、R2TP 各因子や TELO2 をノックダウンしたところ、OSCC 細胞の増殖や遊走が有意に抑制される結果が得られた。p53 の変異は約半数のがんで認められ、点突然変異の p53 は腫瘍形成促進などの機能を新たに獲得し、これを Gain of function (GOF) と定義する。肺癌細胞では Pontin が GOF の p53<sup>R248Q</sup> と結合し、腫瘍形成を促進すると報告されている。興味深いことに、HSC-4 細胞は内因性に GOF の p53<sup>R248Q</sup> を発現しており、Pontin と p53 の結合を認めたため、肺癌細胞同様に GOF への関与が示唆された。また、R2TP 各因子のノックダウンにより、HSC-4 細胞の増殖や遊走の抑制とともに p53<sup>R248Q</sup> のリン酸化 (セリン 15) レベルが低下していた。変異型 p53 のリン酸化 (セリン 15) は GOF に必要との報告があることから、R2TP は変異型 p53 のリン酸化レベルを調節することで OSCC 細胞の増殖や遊走を制御していると考えられる。R2TP は癌化や癌進展に関与する PIKK ファミリータンパク質の安定化や活性化に必須であり、また PIKK (ATM、DNA-PKcs など) は、p53 のリン酸化レベルの調節を行っている。したがって、R2TP ノックダウンにより PIKK が不安定化し、p53 のリン酸化レベルの低下が生じたことで、癌進展が抑制されたと推察される。免疫組織化学染色で RPAP3 と PIH1D1 の局在が正常上皮では細胞質、OSCC では核に局在していたことから、これらの核移行が癌化や癌進展に関与する可能性が示唆された。

#### 審査結果の要旨

口腔癌は、がん全体の約 1% であるが、患者数は年々増加傾向にあり、新たな手術法や抗癌剤などの開発は口腔癌治療に貢献できると考える。分子シャペロン R2TP complex とがんの関連について大腸がんや乳がんが報告されてきたが、口腔癌との関連については詳しく解明されていない。本研究は、R2TP complex と口腔癌の関連を解明することを目的とし、分子生物学的解析を行った。

乳がんや大腸がん同様、口腔扁平上皮癌細胞においても正常歯肉上皮細胞と比較して R2TP 各タンパク質の発現が上昇し、特に HSC-4 細胞において発現上昇が顕著で、高い増殖活性を示した。そこで、R2TP の発現と口腔扁平上皮癌細胞の増殖の相関があると仮説し、siRNA で R2TP 各タンパク質や TELO2 をノックダウンしたところ、増殖と遊走が有意に抑制された。これらの結果は、R2TP complex が口腔扁平上皮癌細胞の増殖や遊走を制御し、必要不可欠であることを示している。

免疫沈降で口腔扁平上皮癌細胞における R2TP complex の形成が示され、R2TP 各因子の局在について免疫染色で検討した。RPAP3 や PIH1D1 は、正常組織や細胞では主に細胞質へ局在していたのに対し、口腔扁平上皮癌細胞では核への局在も認められた。Pontin、Reptin は正常・がんに関わらず細胞の核に局在していたことから、口腔扁平上皮癌細胞では R2TP 構成タンパク質全てが核内に局在することになる。これらの結果は、RPAP3 と PIH1D1 が細胞質から核内に移行し、核内で R2TP complex を形成することが、がん化において重要であることを示唆している。

R2TP complex は、snoRNP を安定化しリボソーム生合成を促進させる結果、がん細胞の増殖を促進させる。がん細胞における R2TP ノックダウンや snoRNP 合成阻害は p53 を活性化し、細胞増殖を抑制する。本研究において、R2TP をノックダウンした HSC-4 細胞では p53 の全発現量は変化しなかったが、増殖抑制とともにリン酸化レベル (セリン 15) の低下を認めた。HSC-4 細胞が発現している p53 は、変異型 p53<sup>R248Q</sup> であり、野生型 p53 の腫瘍抑制遺伝子としての機能を喪失し、増殖促進作用を有する。変異型 p53<sup>R248Q</sup> のリン酸化 (セリン 15) 抑制は、野生型 p53 の機能を回復させるとの報告もあり、R2TP complex が変異型 p53 のセリン 15 のリン酸化レベルを調節し、がん細胞の

増殖や遊走に関与していると推察された。また、肺癌細胞H1299同様、HSC-4細胞においてもPontinが変異型p53と相互作用し、腫瘍形成に寄与する可能性が示唆された。

本研究で、R2TP complexが口腔扁平上皮癌進展に関与することが明らかになった。R2TP complexのコ・シャペロンであるヒートショックプロテイン (HSP) 90 阻害薬やPontin/Reptin 阻害薬が抗癌剤として開発がすすめられており、将来的にR2TP complexが口腔扁平上皮癌の抗癌剤ターゲットとして臨床応用が期待でき、学位論文として価値あるものと認める。

学位論文に関して、主査副査による以下の質疑応答を行った。

1. R2TP complex は、がんのどの過程に関与するか。
2. タイトルの cancer development は具体的に何を指すか。
3. R2TP の構造変化 (Hsp90 など他のタンパク質との相互作用) はどのようなものか。
4. p53 と R2TP complex の関連について説明しなさい。
5. 核小体キャップ (Nucleolar cap) とは何か。R2TP complex とのどう関与するか。
6. p53 の変異について具体的に説明しなさい。
7. 実験で主に使用した細胞として、なぜHSC-4細胞を選択したのか。
8. 正常・口腔扁平上皮癌の組織や細胞におけるR2TPの局在は何を意味するか。
9. 本論文で抗癌剤としてアクチノマイシンDを使用した理由は何か。
10. p53 のリン酸化について説明しなさい。
11. 本研究における将来的な展望について。