

| | |
|---------|---|
| 氏 名 | 濱田 渉 |
| (ふりがな) | (はまだ わたる) |
| 学位の種類 | 博士(医学) |
| 学位授与番号 | 甲 第83号 |
| 学位審査年月日 | 令和6年1月24日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当 |
| 学位論文題名 | Tetraspanin CD81 is expressed in human parotid cancer tissue and mediates cell proliferation (ヒト耳下腺癌組織におけるテトラスパニン CD81の発現と細胞増殖に対する影響の評価) |
| 論文審査委員 | (主) 教授 萩森 伸一 教授 矢野 貴人 教授 喜田 照代 |

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

《目 的》

唾液腺悪性腫瘍において耳下腺癌はその約80%を占める。2017年唾液腺腫瘍WHO分類では耳下腺癌は23の組織型に分類され、さらに様々な組織亜型や悪性度が報告されており、個々に合わせた治療を行うことは容易ではない。その結果、進行癌や高悪性癌の5年生存率は30~40%と、予後は不良である。加えて外科的切除が耳下腺癌治療の第一選択であり、他に確立された治療法はないのが現状である。近年、耳下腺癌において、ヒト上皮成長因子受容体2(HER2)やプログラム細胞死リガンド1(PD-L1)などのバイオマーカーの発現が報告され、切除不能症例における薬剤選択時の有用な指標となっている。また、耳下腺癌における新たな分子標的の解明が進むことで、予後改善が期待される標準的レジメンの確立につながると考えられる。

近年、膜貫通型タンパク質のひとつ、テトラスパニンの発現は腫瘍の病期や患者の予後と関連することが多数報告され、腫瘍治療のターゲットとしての可能性が示唆されている。

CD81 はテトラスパニンファミリーのメンバーであり、悪性腫瘍において増殖、浸潤、転移に重要な役割を果たすことが示されている。しかし、耳下腺癌における CD81 の発現およびその機能については未だ報告がない。

ゆえに、耳下腺癌組織における CD81 の発現と細胞増殖への関与について検討することを本研究の目的とした。

《方 法》

大阪医科薬科大学病院で耳下腺癌の手術を受けた患者 36 症例の手術時摘出組織を用いた。（大阪医科薬科大学研究倫理委員会承認 試験番号 2020-211）。

病理組織学的診断は、唾液腺導管癌（Salivary duct carcinoma：以下 SDC）10 例、粘表皮癌（Mucoepidermoid carcinoma：以下 MEC）16 例（低・中悪性度 7 例、高悪性度 9 例）、腺様嚢胞癌（Adenoid cystic carcinoma：以下 ACC）5 例、多形腺腫由来癌（Carcinoma ex Pleomorphic adenoma：以下 Ca ex PA）5 例であった。

耳下腺癌組織における CD81 タンパク質の発現を検証するためウエスタンブロッティング法および免疫組織化学染色を行った。次いで採取した耳下腺癌組織から耳下腺癌由来細胞の初代培養を行った。これらのうち、SDC 由来細胞および MEC 由来細胞における CD81 の発現を検証するため、ウエスタンブロッティング法および定量リアルタイム RT-PCR 法を行った。コントロールには CD81 の発現を認めている前立腺癌細胞の Lncap を用いた。CD81 特異的 siRNA による *CD81* 遺伝子のノックダウンが SDC 由来細胞の細胞増殖におよぼす影響を細胞増殖測定試薬で経時的吸光度測定にて評価した。さらに抗 CD81 抗体が SDC 由来細胞の細胞増殖におよぼす影響の評価を同様の手法で行った。

《結 果》

ウエスタンブロッティング法により全ての組織型の耳下腺癌組織において、CD81 タンパク質の発現を確認した。免疫組織化学染色により、SDC と MEC の組織において腫瘍細胞の細胞膜に CD81 の発現を認めたが、ACC と Ca ex PA の組織では間質に CD81 の発現を認めるも腫瘍細胞の細胞膜に発現は認めなかった。SDC 由来細胞および MEC 由来細胞

における CD81 タンパク質の発現をウエスタンブロッティング法により確認し、また定量リアルタイム RT-PCR 法により Lncap と比較して *CD81* 遺伝子が有意に高発現していることを確認した。また、siRNA 投与による SDC 由来細胞の *CD81* 遺伝子のノックダウンが、また抗 CD81 抗体投与により SDC 由来細胞の細胞増殖の有意な抑制が確認された。

《考 察》

本研究では、耳下腺癌組織および耳下腺癌由来細胞を用いてウエスタンブロッティング法、免疫組織化学染色、定量リアルタイム RT-PCR 法により耳下腺癌における CD81 の発現を評価した。さらに、siRNA 投与による *CD81* 遺伝子のノックダウンならびに抗 CD81 抗体の投与が細胞増殖に及ぼす影響を評価した。その結果、SDC および MEC の腫瘍細胞の細胞膜で CD81 の発現を認めたが、ACC と Ca ex PA では腫瘍細胞に発現がみられなかったことから、耳下腺癌の組織型によって CD81 の発現レベルが異なることが示唆された。また、siRNA 投与による *CD81* 遺伝子のノックダウンや抗 CD81 抗体が耳下腺癌由来細胞の増殖を抑制することを見出した。CD81 は細胞膜表面に発現し、テトラスパニンに富むマイクロドメイン (tetraspanin-enriched microdomain; TEM) の形成や他の分子との相互作用により、細胞膜分子の組織化、タンパク質輸送、細胞融合、細胞間相互作用などの多くの重要な細胞恒常性に関与している。ゆえに、これらの機能の一部を阻害することで、細胞増殖が抑制されたと推察される。

以上の結果から CD81 は耳下腺癌細胞の増殖機構に関与し、また耳下腺癌の治療標的となる可能性が示唆された。

論文審査結果の要旨

耳下腺癌には多彩な組織型が存在し、その悪性度も様々である。そのため個々に合わせた治療を行うことは容易ではない。手術が耳下腺癌治療の第一選択であり、他に有効な治療法は確立されていない。一方、膜貫通型タンパクのひとつ、テトラスパニンファミリーのメンバーである CD81 は、悪性腫瘍において増殖、浸潤、転移に重要な役割を果たすことが示されているが、耳下腺癌における CD81 の発現およびその役割についての報告はこれまでにない。

このような背景を受け、申請者はテトラスパニン CD81 に着目した。本研究では耳下腺癌（唾液腺導管癌、粘表皮癌、腺様嚢胞癌、多形腺腫由来癌）における CD81 の発現とその細胞増殖に対する影響を、免疫組織化学的手法および分子生物学的手法を用いて検討した。その結果、唾液腺導管癌および粘表皮癌の腫瘍細胞の細胞膜に CD81 の発現が認められ、さらに唾液腺導管癌由来細胞においては siRNA による *CD81* 遺伝子のノックダウン、および抗 CD81 抗体の投与によって腫瘍細胞の増殖が有意に抑制されることが明らかとなった。

本研究の結果から、CD81 の発現レベルは耳下腺癌の組織型によって異なること、CD81 は耳下腺癌細胞の増殖に関与し、また耳下腺癌において CD81 の抑制が腫瘍増殖を抑制し、ひいては予後の向上に繋がる新規治療の標的となる可能性が示唆された。

以上により、本論文は本学大学院学則第 13 条第 1 項に定めるところの博士（医学）の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology 2023, in press