



Title	新規口腔がん治療法開発のための個体解析基盤の創出 [全文の要約]
Author(s)	木村, 拓
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第15501号
Issue Date	2023-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/89638
Type	doctoral thesis
File Information	Taku_Kimura_summary.pdf



学位論文内容の要約

学位論文題目

新規口腔がん治療法開発のための
個体解析基盤の創出

博士の専攻分野名称 博士（歯学） 氏名 木村 拓

口腔がんは頭頸部がんの約半分を占めるがん種で、病理組織学的分類では約 90%が扁平上皮がん [Oral squamous cell carcinoma (OSCC)] である。我が国における OSCC の罹患者数はがん全体の 11 位だが、世界的にその患者数は増加傾向にあり、OSCC 患者の救済は顕著な福祉課題となりつつある。OSCC 患者に対する現在の標準治療では、外科的切除に補助療法として化学療法や放射線治療を組み合わせた集学的治療を実施する。しかしこれら従来の治療を実施しても、多くの患者に薬剤耐性や副作用が発現するため、治療を完遂することは困難である。近年では従来の補助療法に加えて、免疫チェックポイント阻害薬などの分子標的治療薬が口腔がん治療に用いられているが、その効果は限定的で、OSCC 患者の全ステージを合わせた 5 年相対生存率は過去数十年にわたり約 50%にとどまっている。さらに、外科的切除による患者の口腔機能の低下は必発であり、口腔機能の回復のための皮弁等を用いた再建手術や顎補綴を以ってしても OSCC 患者の生活の質の回復は困難である。そのため、口腔機能を保ちつつ、現在の標準治療と比較してより有効性が高くかつ副作用の小さい新規治療法の開発が喫緊の課題となっている。

この課題を解決すべく、これまでヒト口腔がん細胞株やモデルマウスを使用した OSCC の治療法開発が進められてきたが、OSCC の遺伝子変異は多様で、発がんを促進する明確なドライバー遺伝子が同定されていない。このため、OSCC 発症機序の全貌の解明や新規治療標的の網羅的な同定、そして新規治療法の効率的な創出を実現する目処は立っていない。

そこで本研究で申請者は、新規口腔がんモデルショウジョウバエの作成やこれを含む複数の OSCC モデルの使用、そして異分野融合を特徴とする独自の研究基盤を駆使し、新規口腔がん治療法の創出を目指す。申請者の所属研究室は、多様ながんの発生素過程の解明や新規治療薬の開発を効率的に推進すべく、従来の培養ヒトがん細胞株やモデルマウスにショウジョウバエを相補的に組み合わせてきた。ショウジョウバエは、ヒト疾患に関わる遺伝子やシグナル伝達経路の遺伝的保存度が高く、遺伝子改変系統や解析手法が充実している。またハエは、マウスなどの哺乳類モデルと比較し非常に安価で、約 10 日間で次世代を産生することから、大規模な実験を効率的に進める事が可能である。加えて申請者の所属研究室は近年、がん治療薬候補に対する応答性が哺乳類とハエの間で極めて類似していることも確認した。実際に当研究室では、ハエを起点とする研究から甲状腺髄様がんや膵がんの治療薬シーズを同定することに成功している。

本研究で申請者はこの基盤に立脚し、ヒト口腔がんの遺伝子型を模倣したモデルハエの創出に取り組んだ。申請者の所属研究室では、酵母由来の *GAL4-UAS* 転写制御系を利用して、ハエ幼虫の任意の組織や細胞種に外来遺伝子を発現する系を確立している。そこで申請者は、①翅原基の扁平上皮細胞で転写因子 *GAL4* を発現するドライバーハエの同定と、②*GAL4* が結合して転写を活性化する *UAS* 配列の下流に OSCC で観察されるミスセンス変異遺伝子の DNA 配列を配置した *UAS* ハエ群を作出した。

①で申請者はまず、扁平上皮細胞に活性を示すドライバーハエを同定すべく、当該細胞で活性を示すことが示唆されている計 11 系統のドライバーハエの遺伝学スクリーニングを

実施した。すなわち申請者は、これらの系統をそれぞれ *UAS-GFP* ハエと交配し、*GFP* の発現を指標にして、翅原基の扁平上皮細胞で安定的に外来遺伝子を発現するドライバーハエの同定を行った。その結果申請者は、扁平上皮細胞特異的に外来遺伝子を発現する能力のある3種類 *Ultrabithorax-GAL4*、*Grunge-GAL4*、*teashirt-GAL4* のドライバーハエを同定することに成功した。

次に②で申請者は、OSCC 患者で高頻度に変異が観察される4遺伝子に特に着目し、オルソログ検索データベース *DIOPT* を使用してこれらのヒト遺伝子と機能的に相同なハエ遺伝子をそれぞれ同定した。そして申請者は、ハエ3齢幼虫のゲノム DNA から各遺伝子の cDNA を PCR により増幅し単離して、ライゲーション反応を実施して外来遺伝子導入用ベクターへ搭載した。その後申請者は、各ベクターのハエ受精卵への顕微注入を通じ、OSCC の遺伝子変異を再現した *UAS* ハエ群を作出した。そして、導入した各遺伝子がハエ組織中で期待する機能を有しているか検証すべく、申請者はこの *UAS* ハエ群を使用し、先行研究で多用されている複眼や翅原基をモデル組織とする表現型解析を実施した。その結果申請者は、着目した4遺伝子のミスセンス変異型や野生型を発現すると、これらの組織が先行研究と類似した表現型を示すことを見出した。この結果から申請者は、着目した4遺伝子は期待する機能を有していることを確認した。

そして申請者は、上記の *UAS* ハエ同士を交配することで、遺伝子変異の多様な組み合わせを有する *UAS* ハエを計6系統新規に作出した。さらに申請者は、扁平上皮細胞特異的に活性を示す *Ultrabithorax-GAL4* ドライバーハエとこれらの *UAS* ハエ群と交配することで、OSCC の遺伝子型を模倣したハエの作出に成功した。そこで申請者は、これらの遺伝子型モデルハエの表現型を解析するために、まず各系統の個体生存率を解析した。*GAL4-UAS* 転写制御系は、ハエの飼育温度を上げることで転写因子 *GAL4* の活性を上昇させることが可能で、その結果 *UAS* 下流に配置した外来遺伝子の発現量は上昇する。そこで申請者は、ハエの至適飼育温度を含む 22°C から 29°C の範囲におけるハエの個体生存率を評価した。その結果申請者は、飼育温度の上昇に伴い、各変異遺伝子を導入した全てのハエ系統の生存率が低下することを見出した。この結果は、ヒト口腔がんの遺伝子型をハエ扁平上皮細胞で模倣することでこの細胞で形質転換が生じ、個体生存率が低下したことを示唆している。

また、6系統の口腔がん遺伝子型モデルハエのうち1系統が他5系統と比較して生存率の低下傾向を示したことから、申請者は、*patched>GFP* ハエ系統を用いて扁平上皮細胞における表現型比較を実施した。*patched>GFP* ハエは、翅原基の前方部と後方部の境界領域に存在する上皮細胞で *GAL4* の活性を示すドライバーハエである。そこで申請者はこのドライバーの活性化領域に遺伝子を発現させ形質転換細胞の増殖能を評価し、他よりも変異遺伝子を多く有するこの系統が他の系統よりも翅原基全体に占める扁平上皮細胞の割合が高いことを見出した。この結果は、扁平上皮細胞において発現する変異遺伝子の数の増大に伴い、扁平上皮細胞の形質転換が亢進したことを示唆している。

また申請者は、口腔がん遺伝子型モデルハエを使用して、網羅的薬物スクリーニングで得

られると予想する新規治療薬候補を哺乳類実験系で検証するのに備えて、ヒト口腔がん細胞株の実験系の確立に取り組んだ。申請者は3種類のヒト口腔がん細胞株（SAS、HSC-3、HSC-4）を使用し、Spheroid forming assay および Soft agar assay の2種類の三次元（3D）培養系を実施した。その結果申請者はこれまでに、SAS がスフェロイドおよびコロニー形成能を有する一方、HSC-3 や HSC-4 はこれら 3D 培養系ではスフェロイドやコロニー形成能を有していないことを見出した。申請者は今後、これらの細胞を活用した異種移植モデルマウスの樹立に取り組み、治療薬候補やがん発生機序の解析にこれらのマウスを援用する予定である。

本研究で申請者が創出した口腔がん遺伝子型モデルハエは、個体致死性を示すことが明らかとなった。今後申請者は、このモデルハエを大規模スクリーニングの解析基盤として活用し、新規口腔がん治療法の開発を加速する予定である。申請者は、今後も本研究に継続して取り組むことで新規口腔がん治療法を創出し、福祉向上への貢献を目指す。