学 位 論 文 審 査 の 要 旨

論 文 提 出 者	中尾　寿奈
論 文 審 査 委 員	（主　査）　朝日大学歯学部　教授　永山　元彦 （副　査）　朝日大学歯学部　教授　住友　伸一郎 （副　査）　朝日大学歯学部　教授　薗村　貴弘

論 文 題 目

口腔粘膜上皮腫瘍性病変に有用な新規マーカーの検索

論文審査の要旨

口腔癌で最も多い組織型である扁平上皮癌では、*de novo* だけでなく前駆病変である口腔上皮性異形成を経た発癌が知られており、癌罹患率の低減には口腔上皮性異形成の早期発見と確実な診断および早期治療が求められる。しかし、形態学的特徴での診断は、主観的な要素が強く影響し施設や病理医間でばらつきが生じやすい。上皮性異形成の診断基準はいまだ統一されていないことからも明らかで再現性に乏しく、早急な分子生物学的で客観的診断基準が必要とされる。また遺伝子発現変化の詳細なプロファイルによる口腔癌の発癌メカニズムは未だ明らかではない。そこで本研究は、口腔粘膜上皮の腫瘍性変化を規定する新たな分子生物学的特徴を見出し、病理診断の客観的診断指標や新規治療方法および予後因子となる可能性がある新たなバイオマーカーの探索を目的とした。

6 週齢の雄 Dark-Agouti（DA）ラットに最終濃度 0.001%の 4-nitroquinoline 1-oxide（4NQO）を経口投与し、対照群には 4NQO を除いた飲料水を同様に投与した。腫瘍の形成を確認した舌組織のホルマリン固定パラフィン包埋標本（FFPE）を作製し、病理組織学的評価を行った。4NQO 投与群扁平上皮癌組織（4NQO-SCC）2 例、それに隣接する上皮性異形成組織（4NQO-OED）2 例ならびに対照群正常舌組織 1 例の FFPE より total RNA を抽出し、RNA シーケンシング法（RNA-seq）にて網羅的遺伝子発現解析を行った。（朝日大学動物実験承認番号：18-019）

朝日大学医科歯科医療センターで切除後に病理組織学的診断されたヒトの扁平上皮癌（SCC）20 例、上皮内癌を含む上皮性異形成（OED）20 例ならびに切除検体に含まれる異型細胞を含まない正常上皮組織（Normal）20 例の FFPE 標本を用い、抗 S100A8、抗 S100A9、および抗 CD147 抗体を一次抗体とする免疫染色を行った。発色は DAB および Alexa Fluor 488 と Alexa Fluor 594 の蛍光色素にて行った。（倫理委員会承認番号：29032）

4NQO 投与群のラット舌組織で扁平上皮癌の形成を認めた。癌組織から隣接移行する上皮には上皮性異形成を認めた。ラット舌組織 RNA-Seq 解析の結果、4NQO-OED に比べ 4NQO-SCC に *S100A8*、*S100A9* 遺伝子の高発現を認めた。ヒト病変組織における免疫組織化学的解析で、S100A8、S100A9 のいずれも、Normal、OED の棘細胞および SCC 腫瘍胞巣内の棘細胞様細胞で陽性を示した。Normal の上皮細胞内では細胞質と核に S100A8、S100A9 の局在を認めた。腫瘍細胞内では Normal の上皮細胞と同様のパターンの他、核における発現消失がみられた。さらに S100A9 に関連する CD147 は、Normal の基底細胞、OED の基底細胞と棘細胞に陽性で、SCC では腫瘍胞巣に陽性を示した。

4NQO 投与群ラット舌組織の HE 染色結果より、扁平上皮癌組織周囲の非浸潤部上皮組織に糸状乳頭の過角化や細胞異型を認めたことから、*de novo* 発癌ではなく上皮性異形成を経て扁平上皮癌が生じたと考えられた。

RNA-seq 解析で *S100A8*、*S100A9* 遺伝子は 4NQO 投与群に高発現がみられ、またその発現量が 4NQO-OED よりも 4NQO-SCC で高かったことから腫瘍性変化に関連する候補遺伝子として挙げられた。S100A8、S100A9 は、2 量体を形成する炎症性カルシウム結合タンパクで潰瘍性大腸炎など炎症性疾患での上昇が知られ、多数の臓器において癌との関連が報告されているがその報告は過剰発現や発現抑制などさまざまである。

ヒト標本の免疫組織化学的解析を行ったところ、S100A8、S100A9 タンパクは好中球やマクロファージだけでなく、Normal、OED の上皮細胞および SCC の腫瘍細胞にも発現を認めた。これは *S100A8*、*S100A9* を含む *S100* カルシウム結合性タンパクスーパーファミリー遺伝子群が 1q21 上にあるヒト上皮分化に関与する遺伝子をコードする Epidermal differentiation complex に存在するためと考えられた。Normal と OED では基底細胞と傍基底細胞に、高分化型 SCC では腫瘍胞巣内の基底細胞様細胞に S100A8、S100A9 が共に陰性であったことから、上皮細胞分化との関連が示唆された。細胞内の局在は Normal、OED および高分化型 SCC いずれの上皮細胞の細胞質でも発現がみられた一方、核内の発現率は OED、SCC で有意に低下した。このことから、S100A8、S100A9 の上皮細胞核内発現の低下が上皮細胞の腫瘍化に関連していることが示唆された。上皮細胞内外それぞれの機能と発現メカニズムのさらなる研究が必要である。

S100A9 受容体のひとつとされる CD147 は、Matrix metalloproteinase（MMP）の分泌促進や MMP を介した血管新生促進など、がんの増殖や浸潤と関連することが知られている。Normal では基底細胞のみに局在を示したが SCC では腫瘍胞巣全体の腫瘍細胞でみられたことから、CD147 を介する腫瘍細胞の浸潤への関与が示唆された。

ラット舌扁平上皮癌組織の RNA-seq 解析結果より得られた候補遺伝子 *S100A8*、*S100A9* とそのタンパクがヒトの口腔粘膜の上皮性腫瘍性病変の新たな診断基準マーカーとして有用である可能性が示唆された。

審査では、学位申請者による論文内容について概要説明に続き，表記方法やデータおよび本研究の今後の展望について確認を行った。本研究では腫瘍性病変で上皮細胞の核における S100A8 の消失を明らかにしたことから、この現象を数値化し基準を定めることで、腫瘍性マーカーとしての可能性が広がることが期待された。また客観的な基準を画像解析に応用する新しい診断への可能性も議論され、審査委員は本論文内容が上皮細胞の腫瘍性病変の特徴を捉えるひとつの要素と評価し、博士（歯学）の学位を授与するに値するものと判断した。