

# 学位論文審査の要旨

論文提出者	金子 裕康
論文審査委員	(主 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 田沼 順一 (副 査) 朝日大学歯学部 教授 江尻 貞一
論文題目	液状化検体細胞診を用いたラット舌発がん実験における診断への応用
<u>論文審査の要旨</u> <b>【目的】</b> 口腔粘膜の細胞診は従来、ブラシ等で粘膜の病巣を擦過し、そのままスライドグラスに塗抹し、その後、アルコール等で固定あるいは風乾する方法、いわゆる従来法で行われていた。この従来法では、基本的な Papanicolaou 染色 (PAP 染色) と May-Giemsa 染色の 2 種類程度の検索しか行うことができず、また、細胞がスライドグラスの一部に密集してしまうことも多く、塗抹後の標本の乾燥や固定不足等の問題も回避できないものであった。これらの、従来法細胞診における問題点を解決するために、近年、採取に用いたブラシ等から直接専用の固定液に細胞を浮遊させ固定し、その後、専用の装置を用いスライドグラスに均一に塗抹する液状化検体細胞診 (liquid-based cytology, LBC) と呼ばれる手法が導入されつつある。 これまでに坂野らは 4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO) を用いた発がん実験により、ラット第 17 番染色体に含まれるがん関連遺伝子の 1 つ heterogeneous nuclear ribonucleic protein K (hnRNP K) の mRNA 発現はヒト舌がんの前がん病変と関係し、hnRNP K 抗体は p53 抗体に比較して上皮性異形成において有意にタンパクの高発現がみられ、hnRNP K は前がん病変の診断マーカーとして有用であることを組織学的に検討してきた。この hnRNP K は RNA 結合タンパクである hnRNP ファミリーの 1 つで、主に mRNA と結合して mRNA の核外輸送、転写、翻訳および修飾に関与している。 そこで今回、ラット舌の発がんモデルを用いて、経時的に擦過細胞診を行い、LBC 法の標本作製し、免疫組織化学的や遺伝子学的手法を検証するとともに組織診と比較し、診断の精度についても検討した。 <b>【材料および方法】</b> 4NQO 誘発舌前がん病変モデルラットの作製は、生後 6 週齢の DA ラットへ 0.001% に希釈した 4NQO を継続して飲用水により摂取させ、コントロール群として水を摂取させる通常飼育を 4NQO 投与群と同期間行った。投与後 10 週より 2 週間間隔で擦過細胞診を行った。SurePath™ 法にて検体処理を行い、通法に従い PAP 染色後、免疫組織化学的検索ならびにリアルタイム PCR 法による検索を行った。免疫組織学的検索は hnRNP K および p53 を行った。リアルタイム PCR による hnRNP K と TP53 の発現量は SurePath™ バイアルから total RNA を抽出して、cDNA に変換後、リアルタイム PCR は $\Delta\Delta C_t$ 法により求めた。	

## 【結 果】

PAP 染色において、Negative for intraepithelial lesion or malignancy (NILM) はケラトヒアリン顆粒を含むオレンジ G 好染・ライトグリーン好染の表層細胞を認め、核や細胞の大きさは均一であった。Low-grade squamous intraepithelial lesion or low-grade dysplasia (LSIL) は軽度の光輝性を有する細胞質を持った表層角化細胞と細胞異型を認めた。High-grade squamous intraepithelial lesion or high-grade dysplasia (HSIL) は角化細胞集団の核に多様性を認めた。Squamous cell carcinoma (SCC) は深層型異型細胞集団を多数認めた。また hnRNP K の免疫染色では、NILM は表層細胞の細胞質に強陽性、LSIL は表層細胞の細胞質と核に陽性、HSIL と SCC は角化型異型細胞と深層型異型細胞の核に強陽性を示した。さらにリアルタイム PCR 解析では hnRNP K の発現量が、NILM<LSIL<HSIL<SCC の順に高値を示し有意な値 ( $p<0.01$  および  $p<0.05$ ) であった。

## 【考 察】

免疫染色における hnRNP K の発現は NILM では細胞質への集積を認め、SCC では細胞核への集積を認めた。これに p53 のタンパクや mRNA 発現結果を合わせて考えると、hnRNP K は癌抑制遺伝子の p53 と共存的に働いていることを裏付けていると考える。すなわち、hnRNP K の mRNA 発現量が高くなるとともに hnRNP K タンパクの細胞質から細胞核へと発現が移行、ならびに p53 が高発現となることから盛んに DNA 修復が行われていることが示唆された。このことから、hnRNP K タンパクと mRNA の発現量に関連して p53 の発現量を比較することは、舌前がん病変において客観的に判定を検討することができ、細胞診においても組織診と遜色のない程に診断精度を向上させ、口腔前がん病変の早期治療方針決定に有益な情報をもたらすことが出来ると考えられる。

## 【結 論】

LBC は、hnRNP K や p53 の免疫染色に加え、リアルタイム PCR 法が可能であることにより、判定への応用が期待できる。hnRNP K タンパクと mRNA 発現の程度は舌前がん病変と関係する。hnRNP K 抗体は p53 抗体に比較して NILM から有意に高発現 ( $p<0.01$  および  $p<0.05$ ) がみられ、LSIL では主に細胞質や細胞核に偏在し、一方、細胞異型性の強い HSIL から SCC では細胞核にその局在が移行する。また hnRNP K mRNA の発現の程度も LSIL より発現を示し TP53 よりも有意な反応であった。

以上のことから、液状化検体細胞診では免疫組織化学や PCR の手法を加えることで、組織診と遜色のない程に診断精度を向上させ、口腔がんの早期発見が可能であることが示唆された。

よって審査委員は、本論文を博士（歯学）の学位を授与するに値すると判定した。