

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 河原田 壮史
学位 博士 (歯学)
学位記番号 新大院博 (歯) 第 512 号
学位授与の日付 令和 4 年 3 月 23 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 Novel cytological model for the identification of early oral cancer diagnostic markers:
the carcinoma sequence model
(口腔がん早期診断用マーカーを同定するための新規発がんモデルの確立)

論文審査委員 主査 田沼 順一 教授
副査 前田 健康 教授
副査 小林 正治 教授

博士論文の要旨

【緒言】世界的に口腔扁平上皮癌 (OSCC) の罹患者数は増加傾向にあり、罹患者数に対する死亡者の割合は 49.9%と比較的高い傾向がある。また、OSCC StageI、II症例の 5 年生存率は 80%台であるのに対し、StageIII、IV症例では 39.1~65.0%と低い傾向が見られる。その上、口腔は発語や摂食など、必須機能の中心であることから OSCC を早期に発見し治療する事は、生存率や生活の質の向上につながる。多くの OSCC は多段階発がん過程をとる事は知られており、早期発見に向けた研究は数多く行われているが、依然として有効な診断方法は確立していないのが現状である。

また細胞診は技術的に簡便で、非侵襲的な診断方法であり、OSCC のスクリーニングに用いられる。昨今、注目されている液状化検体細胞診法 (LBC 法) はこれまで行われてきた塗抹法と異なり、質の高い標本が作製できるだけでなく、同一検体から免疫細胞染色や遺伝子解析を併施できる。

以前に我々が開発した 4NQO 誘発ラット舌がん発生モデルは、ヒトに類似した Carcinoma Sequence を観察できる唯一の実験モデルであり、4NQO 曝露期間と発がん段階の病変発症時期は先行研究で既に明らかにされている。そこで我々はこのモデルに LBC 法を応用する事で、同一個体の発がん過程で生じる形態変化や遺伝子・蛋白質発現変化を継続的に捉えることが可能な実験モデルの確立を試みた。さらに、我々の先行研究から Brd4 と c-Myc、p53 を OSCC 早期発見に有効な候補マーカーと考えており、これら 3 種類のマーカーの発がん過程における発現動態を新規実験モデルで解析を行なった。

【材料と方法】51 匹の雄性 Dark-Agouti 系ラットに、生後 6 週齢から 0.001%4NQO 水溶液を飲用水として与え、3 週間ごとにラットの舌背部から歯間ブラシで 20 回擦過する事で細胞を採取した。採取した細胞診検体は Papanicolaou 染色を行い口腔 Bethesda 分類で形態変化を、免疫細胞染色で蛋白質発現変化を、qRT-PCR で遺伝子発現変化を経時的に評価した。なお、蛋白質発現量は Labeling index で評価した。その算出方法は 200 倍の視野で陽性細胞を多く認める視野を 6 カ所選択し、キャプチャーした画像を用いて、画像解析ソフト e-Count2 (e-Path 株式会社) で細胞数を計測し、Brd4、c-Myc、p53 の核陽性が占める割合を算出した。

さらに、免疫組織化学染色で各候補マーカーの発がん段階（正常、過形成、上皮性異形成、SCC）における発現様式を評価した。

【結果】 4NQO 投与 14 週目でラット舌背部に白色病変を認め、17 週目以降では潰瘍や腫瘍の形成を認めた。細胞診の結果では、投与 14 週目で LSIL、17 週目で HSIL、21 週目で全例 SCC の判定となった。免疫細胞染色の結果から Brd4 や c-Myc は LSIL 以上の病変で陽性細胞の出現を認める一方で、p53 は SCC にのみ陽性細胞を認めた。各候補マーカーの蛋白質発現量は Brd4 と c-Myc は LSIL 以上の病変で、p53 は SCC で Labeling index の有意な増加を認めた。一方、遺伝子発現量はいずれの候補マーカーも SCC の時点で有意な増加を認めた。また、蛋白質発現量と遺伝子発現量に有意な相関関係を認めた。

各候補マーカーの NILM と LSIL 以上の病変を区分する診断精度を検証するため ROC 解析を行い、その結果、Brd4、c-Myc、p53 いずれも ROC 曲線下面積は 80% を超えており高い診断精度が示された。さらに、ROC 解析から算出した cut-off 値より高い値を示す LSIL 以上の検体は Brd4 と c-Myc の方が p53 よりも多く同定できていた。

免疫組織化学染色標本で各候補マーカーの発現様式を評価した結果、Brd4 は過形成で、c-Myc は上皮性異形成で表層細胞に陽性細胞を認めるのに対して、p53 は過形成や上皮性異形成の段階では表層細胞に陽性細胞は認められず、SCC の時点で表層に陽性細胞が出現していた。

【考察】 4NQO 誘発ラット舌がん発生モデルに LBC 法を応用した新規実験モデルは、同一個体の発がん過程で生じる形態変化や遺伝子・蛋白質発現変化を経時的に捉えることが可能であった。また、本結果より 2 つのことが明らかになった。第 1 に、Brd4 と c-Myc は OSCC 早期発見に有用な細胞診の候補マーカーになる。第 2 に、候補マーカーは遺伝子レベルよりも蛋白質レベルで捉えた方が早期に発現変動が検出できる。

特に細胞診の検体は、主に表層細胞で構成されているので、口腔 Bethesda 分類による形態変化の評価は時に、反応性変化と腫瘍性変化の区分に難渋する事があり、この点が口腔細胞診の診断精度を低下させる要因となっている。我々は口腔細胞診で早期に正確に OSCC を同定するためにも、発がん段階の初期に表層細胞で生じる分子の発現変動を捉える必要があると考えている。免疫組織化学染色の結果から Brd4 と c-Myc は過形成や上皮性異形成の段階で表層細胞に陽性細胞が出現しており、つまり免疫細胞染色で早期に発がん過程を同定ができると考えられる。一方で、p53 は OSCC の組織病理学的診断の補助として有用であるが、SCC の時点まで表層細胞に陽性細胞は認められず、口腔細胞診において早期発見に有用な診断・判定用マーカーになりえないことが示された。

また、候補マーカーを遺伝子レベルで捉える際には、細胞診検体全体を評価している。一方、蛋白質レベルで捉える場合には、陽性細胞が多い場所を選択的に評価している。これらのことから、蛋白質レベルつまり Labeling index で評価した方が、OSCC 早期発見に有効と思われる。

以上のことより、日常臨床で行われている細胞診の診断・判定する際には、Brd4 と c-Myc の免疫細胞染色を併用する事で、形態評価では検出できない腫瘍性変化を示す細胞診検体を検出し、口腔細胞診の診断・判定の精度向上に寄与すると思われる。

審査結果の要旨

口腔は発声や摂食などの必須機能の中心であり、口腔扁平上皮癌（OSCC）は日々の生活に深刻な影響を及ぼすことから、OSCC 早期発見は生活の質の改善にもつながる。多くの OSCC は、正常から上皮性異形成を経て発がんする事は知られているが、発がん過程を継続的かつ同一個体で捉える実験方法は今日まで存在していない。そのため、OSCC の早期発見に関する研究は数多く行われているが、依然として診断・判定に有用なマーカーは得られていないのが現状である。

現在、液状化検体細胞診法（LBC 法）は、技術的に簡便で低侵襲かつ、同一検体から様々な検索（免疫細胞染色や qRT-PCR 等）を行うことが出来る診断・判定方法であり、昨今、病理診断の補助として用いられている。しかし、口腔細胞診の診断・判定精度は組織診より劣るために、OSCC の診断・判定方法として注目されてはいるが、普及していないのである。そこで我々は、LBC 法を 4NQO 誘発ラット舌がん発生モデルに応用する事で、同一個体の発がん過程を継続的に観察可能な実験系を確立し、LBC 法の診断精度を改善できる診断・判定用マーカーの同定を目的とした。

本研究では、1) 同一個体の発がん過程で生じる形態変化や遺伝子・蛋白質発現変化を継続的に観察可能な実験モデルを確立し、2) Brd4、c-Myc、p53 が経時的に発現上昇している事を観察した。特に、Brd4 と c-Myc は p53 より早期に発現上昇しており、OSCC 早期発見に有用な診断・判定用マーカーである事が明らかになった。3) さらに遺伝子発現量より、蛋白質発現量で評価した方が OSCC 早期発見に有効であることが示された。本研究の特質すべき点として同一個体の Carcinoma Sequence で生じる形態変化や遺伝子・蛋白質発現変化を経時的に明らかにし、Brd4 と c-Myc が OSCC 早期発見に有用な診断・判定用マーカーになりうることを証明した点にある。これまで OSCC 早期発見に有用な診断・判定用マーカーを探索した研究は数多く行われているが、4NQO 誘発ラット舌がん発生モデルに LBC 法を応用する事で、同一個体の発がん過程を経時的に観察可能な実験モデルを確立したことは、極めて新規性が高いと考えられる。

本研究の結果より口腔細胞診の診断・判定において、Papanicolaou 染色を用いた口腔 Bethesda 分類に Brd4 と c-Myc の免疫細胞染色を併用する事で口腔細胞診の診断・判定の精度が向上し、口腔がん早期発見に寄与すると考えられる。また、今回確立した新規実験モデルから得られる細胞診検体を用いて、マイクロアレイ解析を行う事により、OSCC 早期発見に有用な未知の診断・判定用マーカーが同定される事も期待される。

審査員 3 名の口頭試問の結果（別紙：最終審査結果の要旨参照）、本論文が博士の学位論文として十分な価値を持ち、さらに申請者が大学院医歯学総合研究科博士課程修了者としての学力ならびに見識を有し、博士（歯学）の学位を有するものと判定した。