

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 秋森 俊行
学位 博士 (歯学)
学位記番号 新大院博 (歯) 第 537 号
学位授与の日付 令和 5 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 Search for novel diagnostic markers for oral cancer and oral potential malignant disorders using LBC methods
(LBC 法を用いた口腔がん及び口腔潜在的悪性疾患に対する新規判定用マーカーの検索)
論文審査委員 主査 教授 富原 圭
副査 教授 田沼 順一
副査 教授 前田 健康

博士論文の要旨

【緒言】 2020 年 WHO 報告によると全世界的に口腔扁平上皮癌 (OSCC) の罹患者数は急激な増加があり、罹患者数 (約 38 万人) に対する死亡者の割合は約 50%と比較的に高い傾向が見られる。また、OSCC Stage I・II 症例の 5 年生存率は約 80%台であるのに対し、Stage III・IV 症例では約 40~65%と低いとの報告がある。つまり口腔領域は、発語や摂食などの機能の重要な部分であることから OSCC を早期に発見し治療することが、患者さんの生存率や生活の質の向上につながるのである。また多くの OSCC は多段階発がん過程によりがん化することは研究者内では知られており、早期発見に向けた研究は数多く実施されているが、依然として有効な診断・判定方法やマーカーが確立していないのが現状である。

そこで早期発見やスクリーニングに対応できる口腔細胞診は、技術的に簡便で、低侵襲的な診断・判定方法であり、一部では口腔がん検診に用いられている。昨今注目されている液状化検体細胞診 (LBC 法) はこれまで行われてきた塗抹法 (従来法) と異なり、質の高い標本が作製できるだけでなく、同一検体から免疫染色や遺伝子解析を併施できることも特筆すべき方法なのである。

また我々が以前開発した 4NQO 誘発ラット舌がん発生モデルは、ヒトに発がん過程に類似した 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の発症時期は先行研究で既に明らかにした (Oncology Reports, 2014)。さらに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を確立した。この研究結果より *BRD4*、*c-MYC*、*MUC21*、*TP53* を OSCC 早期発見に有効な判定用の候補マーカーと考えており、これら 4 種類のマーカーにおいて、各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い、論文が公表されている (Oncology Letters, 2022)。

そこで今回我々は、4NQO 誘発ラット舌がん発生モデルに LBC 法を応用させた先行研究の結果に基づいて、発現量で有意な値を示すマーカー *BRD4*、*c-MYC*、*MUC21*、*TP53* などを応用し、ヒトの OSCC や口腔潜在的悪性疾患 (Oral Potentially Malignant Disorders: OPMDs) などのサンプルを対象に、免疫細胞診学的検討を加えて、LSIL 以上の症例における病理組織像 HE 標本に関しても報告する。

【材料と方法】 2020年度 新潟大学医歯学総合病院 顎顔面口腔外科を受診してLBC法を施行した100例を対象とし、LBC法による検体および生検・外科切除検体を材料に、プロテオミクス解析を含めた先行研究の結果より有意な値を示した候補遺伝子から選抜された、*BRD4*、*c-MYC*、*MUC21*、*TP53*の免疫組織・細胞診の検討を行った。

採取された細胞診検体はPapanicolaou染色を行い口腔のBethesda分類を利用した形態変化を、免疫細胞診染色による蛋白質発現変化を、qRT-PCRでは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*、*MUC21*、*TP53*の核または細胞質に陽性像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 (NILM、LSIL、HSIL、SCC) における発現様式を評価した。

【結果】 免疫細胞診の結果から*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、*TP53*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、*TP53*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。

ま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*、*TP53*いずれもROC曲線下面積は85%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*TP53*よりも多く同定できていた。

以上より、細胞診の判定がNILM、LSIL、HSIL、SCCとGradeが上がるにつれて、各抗体に対する免疫細胞診の陽性細胞率は*c-MYC*と*BRD4*では増加を、*MUC21*では減少を示した。一方、病理組織標本のHE標本と免疫染色において、口腔潜在的悪性疾患 (OPMD) の一つである上皮性異形成と比較してOSCCでは、陽性細胞率は同様の傾向を示した。

【考察】 今回の結果より2つのことが明らかになった。1つ目は、*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。2つ目は、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。

特に口腔細胞診の検体は、主に表層の細胞が採取され、標本は角化細胞で構成されていることが多いため、口腔のBethesda分類による形態変化を評価する際は、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いることから、免疫細胞診染色で早期に発がん過程を同定できると考えられる。

一方で、*TP53*はOSCCの病理組織学的診断の補助として有用であるが、OSCCの時点までは表層細胞に陽性細胞が認められず、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。

以上より、日常臨床で行われている口腔細胞診の診断・判定する際には、*BRD4* と *c-MYC* の免疫細胞診

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用いて検出し、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

口腔領域を含む頭頸部領域は、発声や摂食などの必須機能の中心であり、悪性度が極めて高い口腔扁平上皮癌 (OSCC) は予後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、正常から過形成、上皮性異形成を経て、発がんする Carcinoma Sequence モデルはよく知られているが、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、ほとんど普及していないのである。我々は以前の研究で、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・判定用マーカーを同定している。今回は、その際に見出された候補遺伝子をヒトの症例に応用することで、この4つの遺伝子が有用なマーカーであることを証明することである。

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されて、*BRD4*、*c-MYC*、*TP53* が経時的に発現上昇し、*MUC21* は減少傾向を示している事を観察した。特に、*BRD4* と *c-MYC* は *TP53* より早期に発現が上昇しており、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。2) 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が確立され、これの研究結果より見出された候補遺伝子は、極めて新規性が高いと考えられる。

本研究の結果より、ヒト口腔細胞診の診断・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大きく寄与すると考えられる。特に、確立された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、これらを応用させる事で、これまでのマーカーと比べても極めて有用な口腔がん早期発見マーカーが見出されることが期待される。

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。