

論文名：(要約) 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)

新潟大学大学院医歯学総合研究科

氏名 秋森 俊行

【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 49.9% 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 80% 台であるのに対し、Stage III、IV 症例では 39.1~65.0% 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法 (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の確立を試みた。この研究結果より *BRDA*、*c-MYC*、*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 3 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、有意な値を示すマーカー *BRDA*、*c-MYC*、*MUC21* 及び *TP53* などを用い、ヒトの OSCC や口腔潜在的悪性疾患 (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。

【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 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した、*c-MYC*、*MUC21*、*BRD4* および *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 Bethesda 分類で形態変化を、免疫細胞診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*、*MUC21* 及び *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、*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。

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、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】

本結果より 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ので、口腔 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たことから、免疫細胞診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、*TP53* は OSCC の病理組織学的診断の補助として有用であるが、SCC 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。

以上のことより、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。