

氏名	ワエル スウェラム Wael Swelam
学位	博士 (歯学)
学位記番号	新大院博 (歯) 第 42 号
学位授与の日付	平成 17 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 3 条第 3 項該当
博士論文名	Vascular endothelial growth factor in salivary pleomorphic adenomas: one of the reasons for their poorly vascular stroma (唾液腺多形性腺腫の乏血管性間質における血管内皮細胞増殖因子)
論文審査委員	主査 教授 朔 敬 副査 教授 川島博行 教授 林孝文

## 博士論文の要旨

### 緒言

唾液腺でもっとも高頻度に発生する多形性腺腫は、病理組織学的にその間質表現が硝子様から軟骨様、粘液様まで、多彩であると同時に、間質中の血管配置がきわめて少ないことも特徴である。血管の誘導は腫瘍の基本的特性とされ、豊富な血液循環で腫瘍細胞の増殖は維持されるものと信じられてきたが、多形性腺腫の組織構築はその腫瘍総論の一般原則に反する。したがって、乏血管性環境のなかでなぜ多形性腺腫細胞は増殖可能なのかは唾液腺腫瘍病理学の重要な命題のひとつであった。そこで、同腫瘍組織内では低酸素状態が予測されるので、むしろ低酸素を利用した細胞増殖機構が多形性腺腫細胞にそなわっているのではないかという仮説のもとに、本研究を計画した。すなわち、近年判明しつつある低酸素反応性遺伝子発現機構を多形性腺腫で確認することを目的に、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) とその細胞膜受容体を軸に低酸素環境特異的な分子群の腫瘍組織・細胞内発現状況を検討した。

### 材料と方法

【症例】本学病理検査標本から多形性腺腫 100 症例を検鏡し、病理組織学的に多彩な間質表現を有する症例を 20 例抽出し、それらのホルマリン固定パラフィン連続切片を免疫組織化学的検索対象とした。対照には、10 例の正常顎下腺組織の同様に調整された組織切片をもちいた。

【免疫組織化学】上記切片について、組織学的検討のためにヘマトキシリン・エオジン染色をほどこし、さらに、VEGF とその受容体 Flt-1 および Flk-1、血管内皮細胞マーカとしての CD31、筋上皮細胞マーカとしてのケラチン 14 と S-100 蛋白質、低酸素マーカとしての hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) と乳酸脱水素酵素 (LDH) の抗体をもちいて酵素抗体法をおこなった。

【初代培養】多形性腺腫 6 例と正常範囲の顎下腺 2 例の新鮮手術材料各 0.1 g をコラゲナーゼ処理によって、腫瘍細胞ならびに正常唾液腺細胞を分離し、初代培養をおこなった。実験には  $5 \times 10^4$  個の細胞を 35 mm シャーレに血清加 DMEM 培地で播種し、7 日後に固定して間接蛍光抗体法に供した。

【遺伝子発現】前段の材料から全 RNA を抽出し、cDNA に逆転写後、GAPDH 遺伝子を内部標準にして競合的ポリメラーゼ連鎖反応をおこない (RT-PCR)、VEGF mRNA の選択的スプライシングおよび HIF-1 $\alpha$  遺伝子発現レベルを半定量的に決定した。

## 結果と考察

正常顎下腺および腫瘍周囲小唾液腺では、VEGF は血管内皮細胞のほか線状部および介在部導管上皮細胞および筋上皮細胞に免疫陽性で、導管上皮細胞は細胞膜および細胞質内に Flk-1 および Flt-1 の二種の VEGF 受容体の強度陽性をしめした。CD31 陽性は血管のみにえられた。介在部導管上皮細胞および腺房細胞はまた HIF-1 $\alpha$  陽性で、小葉内および小葉間の線維性結合組織はびまん性に LDH 陽性であった。したがって、正常唾液腺においても VEGF はひろく上皮細胞ならびに筋上皮細胞に発現しており、唾液腺小葉内はとくに終末部で低酸素状態にあることが示唆された。

多形性腺腫では、腫瘍細胞の充実性増殖部で、VEGF はシート状および導管様構造をなす腫瘍細胞で免疫陽性、Flk-1 も強陽性とくに導管様構造細胞に高度に、Flt-1 は弱陽性で導管様細胞にやや強調された。いっぽう、粘液様間質内の星状腫瘍細胞は VEGF 強陽性、さらに Flk-1、Flt-1 陽性をしめした。また、HIF-1 $\alpha$  はひろく腫瘍細胞に陽性であったが、とくに粘液様間質内の星状細胞に強陽性で、その周囲には LDH 陽性基質が沈着していた。しかし、CD31 陽性の血管は腫瘍間質組織内にはほとんどみられず、多形性腺腫間質の乏血管性が再確認されると同時にその低酸素状態が示唆された。したがって、VEGF 遺伝子はそのプロモータの低酸素反応要素によって発現亢進している可能性が示唆された。

同腫瘍細胞初代培養では、周密化前段階で VEGF、Flk-1、Flt-1、HIF-1 $\alpha$  の明らかな免疫陽性がえられ、試験管内でもこれらの分子の発現が蛋白質レベルで確認され、オートクラインに VEGF が機能していることが示唆された。ついで、RT-PCR 実験では、多形性腺腫組織で VEGF121 スプライシング亜型が常に高度に発現し、VEGF189 および VEGF165 の VEGF121 に対する相対量は正常組織より高かった。腫瘍組織の HIF-1 $\alpha$  の発現レベルも正常組織よりも有意に高く、とくにヘパラン硫酸豊富な粘液様間質が優位をしめる症例で顕著であった。したがって、これらのスプライシング亜型の発現調節とその遺伝子産物の基質内流動性・結合性が規定されており、その背景としての低酸素環境が示唆された。

以上の結果から、血管に乏しい唾液腺多形性腺腫組織には低酸素状態が惹起されており、この環境で活性化される VEGF 発現経路が同腫瘍細胞の増殖に関与している可能性がしめされた。

## 審査結果の要旨

多形性腺腫は唾液腺腫瘍のなかでもっとも発生頻度が高く、病理組織学的にその間質表現が多彩で、間質中の血管配置がきわめて少ないことが特徴である。腫瘍は自身の間質中に血管を誘導し、豊富な血液循環で腫瘍細胞の増殖が維持されることが腫瘍の基本概念として信じられてきたが、多形性腺腫の組織構築はその一般原則に反する。したがって、乏血管性環境のなかでなぜ多形性腺腫細胞は増殖可能なのかは唾液腺腫瘍病理学の重要な命題のひとつであった。

そこで、低酸素状態が予測される同腫瘍組織内では、むしろ低酸素を利用した細胞増殖機構が多形性腺腫細胞にそなわっているのではないかという仮説のもとに、申請者・Wael の実験が計画された。すなわち、近年判明しつつある低酸素反応性遺伝子発現機構を多形性腺腫で確認することを目的に、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) とその細胞膜受容体を軸に低酸素環境特異的な分子群の腫瘍組織・細胞内発現状況を、免疫組織化学および初代培養細胞をもちいた RT-PCR 法により、それら分子群の蛋白質局在および遺伝子発現レベルを検討したものである。

その結果、正常顎下腺および腫瘍周囲小唾液腺では、VEGF は血管内皮細胞のほか線状部および介在部導管上皮細胞、筋上皮細胞に免疫陽性で、導管上皮細胞は細胞膜および細胞質内に Flk-1 および Flt-1 の VEGF 受容体の強度陽性をしめした。介在部導管上皮細胞および腺房細胞はまた HIF-1 $\alpha$  陽性で、小葉内および小葉間の線維性結合組織はびまん性に LDH 陽性であった。したがって、正常唾液腺においても VEGF はひろく上皮細胞ならびに筋上皮細胞に発現しており、唾液腺小葉内はとくに終末部で低酸素状態にあることが確認されたという。

一方、多形性腺腫では、腫瘍細胞の充実性増殖部で、VEGF はシート状および導管様構造をなす腫瘍細胞で免疫陽性、Flk-1 も導管様構造細胞に強陽性、Flt-1 は弱陽性で導管様細胞にやや強調された。とくに、粘液様間質内の星状腫瘍細胞は VEGF 強陽性であったという。また、HIF-1 $\alpha$  はひろく腫瘍細胞に陽性であったが、とくに粘液様間質内の星状細胞に強陽性で、その周囲には LDH 陽性基質が沈着していた。しかし、CD31 陽性の血管はほとんどみられず、多形性腺腫間質の乏血管性が再確認されると同時にその低酸素状態がしめされた。したがって、VEGF 遺伝子はそのプロモータの低酸素反応要素によって発現亢進している可能性が示唆されたという。

同腫瘍細胞初代培養では、周密化前段階で VEGF、Flk-1、Flt-1、HIF-1 $\alpha$  の明らかな免疫陽性がえられ、試験管内でもこれらの分子の発現が蛋白質レベルで確認され、オートクラインに VEGF が機能していることをしめしている。ついで、RT-PCR 実験では、多形性腺腫組織で VEGF121 スプライシング亜型が常に高度に発現していたという。腫瘍組織の HIF-1 $\alpha$  の発現レベルも正常組織よりも有意に高く、とくにヘパラン硫酸豊富な粘液様間質が優位をしめる症例で顕著であったという。したがって、これらのスプライシング亜型の発現調節とその遺伝子産物の基質内流動性・結合性が規定されており、その背景としての低酸素環境が示唆されたとしている。

以上の結果は、血管に乏しい唾液腺多形性腺腫組織には低酸素状態が惹起されており、この環境で活性化される VEGF 発現経路が同腫瘍細胞の増殖に関与している可能性をしめしている。

すなわち、本研究によって、多形性腺腫の乏血管性間質における細胞増殖機構が初めて証明されるとともに、腫瘍一般における低酸素環境特異的な腫瘍細胞の動態について新たな研究展開の方途を開拓したという点で、本研究の学位論文としての価値を認める。