

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名	阿部 達也
学位	博士(歯学)
学位記番号	新大院博(歯)第354号
学位授与の日付	平成28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	Histopathological characterization and proteomic analysis of the interface formed between lateral invasion fronts of oral squamous cell carcinoma/carcinoma in-situ and non-cancerous epithelial zones. (口腔扁平上皮癌・上皮内癌の側方浸潤先端と非癌上皮部とが形成する界面の病理組織学的検討とプロテオーム解析)
論文審査委員	主査 教授 大島 勇人 副査 教授 朔 敬 教授 小林 正治

博士論文の要旨

【緒言】がん発生のクローン説に対峙するフィールド説すなわち field cancerization の概念は口腔扁平上皮癌 (SCC) 症例を病理組織学的に解析した Slaughter らが 1953 年に提唱した。それは彼らが 60 年前にすでに口腔の表在性癌という病変複合体の主たる病変・上皮内癌 (CIS) には粘膜上皮層を側方に進展し、同時多発・再発する特徴を認知していたからにはほかならない。がん細胞が上皮層内を側方に進展すれば、周囲の非がん上皮細胞に対する浸潤界面が形成されるはずで、事実、病理組織診断の現場でもがんのフロント形成所見が認識されていた。しかし、口腔 SCC・CIS の側方界面が研究対象として解析されたことはなかった。近年の細胞生物学の展開で細胞競合の現象が注目されるようになるのに対応して、申請者らはフィールド発がんの原点である口腔がんに立ち返り、口腔がんの進展を細胞競合現象の視点から捉え直すことを計画した。すなわち、口腔 SCC・CIS の側方浸潤先端には非がん粘膜上皮との間に形成された界面では、がん細胞と非がん細胞のあいだに競合現象が生じているという仮説を立て、側方浸潤界面でがん細胞と非がん細胞の接触の際に相対的な「勝者」・「敗者」の関係が生じる現場を口腔 SCC/CIS を材料に検索した。

【材料と方法】口腔扁平上皮癌 SCC・上皮内癌 CIS 症例 200 例から明瞭な側方進展界面を形成した CIS 55 界面・SCC 57 界面、合計 112 界面を抽出し、形態学的検索および免疫組織化学による検索を行った。とくに明瞭な界面を形成した 10 例を選択し①界面から遠位の癌組織、②界面に直接する癌組織、③界面に直接する非癌組織、④界面から遠位の非癌組織の各 4 区域をレーザーマイクロダイセクション (LMD) 法で分取して、それらを液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析法でプロテオーム解析した。emPAI 法による定量的解析で、界面特異的蛋白質を選択し、組織切片と口腔扁平上皮癌由来細胞株 HSC-2 で、それらの発現状態を確認した。

【結果と考察】再検鏡して CIS 55 界面・SCC 57 界面、合計 112 界面を抽出した。病

理組織学的には、側方浸潤界面は、癌部からみて直線型（47%）、斜面型（34%）、凸面型（19%）に分類された。界面域では、細胞間隙拡大（71%）、基底膜破壊（83%）、癌細胞質濃縮（65%）、アポトーシス（60%）に加えて好酸性硝子体（36%）が出現したが、いずれも癌部で圧倒的に高頻度であった。好酸性硝子体は一部アポトーシスとの共通点があったが、アポトーシスとは異なる未知の細胞死機序が示唆された。以上、癌部で細胞死が亢進し、SCC・CIS細胞が細胞競合における敗者となる可能性が示された。一方、プロテオーム解析の結果、癌部（区分①+②）側で約4,035種の遺伝子産物（蛋白質）（3,138遺伝子）、非癌③+④側で2,812の蛋白質（2,236遺伝子）が同定され、SCC・CIS細胞における細胞活性の多彩さが確認された。定量的解析から、癌部では、非癌部よりK17の増加（11倍）とK13の減少（69倍）がみられ、免疫組織学的に両者の相互増減をCISの診断基準としてきたことの正当性が定量的に検証されたと同時に、LMD法による試料採取が正確に行われていたことが確認された。さらに12種のケラチン分子種発現の有意な増減があった。癌部でemPAI値の大きいものからtubulin alpha-1A chain、histone H1.4ほか7分子が、非癌側ではuncharacterized protein C2orf54ほか8分子が特異的に同定された。ついで、癌部と非癌部の隣接・遠位二区分間を比較したところ、laminin-1、interleukin-1 receptor antagonistなど7分子の増減がみいだされた。これらの特定された分子の癌・非癌部特異的発現状況は口腔SCC・CIS組織切片と培養HSC-2細胞において免疫組織化学的に検証できたので、プロテオーム解析の精度が確認された。ただし、既知の細胞死関連分子や細胞競合関連分子は今回のプロテオーム解析では同定されなかった。以上のとおり、口腔SCC・CISと非癌上皮部との界面では、特定の分子発現に変動があることが確認されたので、側方浸潤に際して界面特異的な細胞間クロストークの存在が示唆された。側方浸潤界面ではむしろ癌部に細胞傷害性変化が強調されたが、臨床的には最終的にがん細胞が勝者となるシナリオがどの時点で成立するのかは未詳である。細胞競合の結果、癌部に細胞死をもたらす現象は制がん方策としてもユニークであり、臨床応用も視野に入れて今後さらにがんの側方浸潤界面を詳細に解析して新たな研究領域を創出していく予定である。

審査結果の要旨

がん発生におけるフィールド発がん field cancerization の概念は口腔扁平上皮癌(SCC)症例を病理組織学的に解析・提唱された。フィールド発癌においては、口腔粘膜上皮から発生した扁平上皮癌・上皮内癌(CIS)は上皮内を側方に進展・浸潤し、がん細胞と非がん上皮細胞との間に浸潤界面が形成することが想定される。これらのがん組織-非がん組織界面は、病理組織診断の現場でもがん界面形成所見が認識されていたが、がん細胞-非がん細胞間の生物学的相互作用が検証されることはこれまでなかった。同時に、近年の細胞生物学の展開で細胞競合の現象が注目されるようになるのに対応して、フィールド発がんの現場は細胞競合現象の病態モデルとしての位置づけられるようになったが、実際の病理組織標本を用いて解析されたことはなかった。そこで、申請者・阿部はフィールド発がんの原点である口腔がんに立ち返り、口腔がんの進展を細胞競合現象の視点から捉え直すことを計画したという。

方法としては、口腔SCC・CISの外科材料を用い、SCC・CISと周囲非癌上皮との間の界

面を形態的に分類・解析し、免疫組織化学および TUNEL 法を用いて蛋白質発現および細胞死についての評価を行っている。ついで、蛋白質の網羅的解析を計画し、病理組織標本から免疫組織化学を併用したレーザーマイクロダイセクション法により癌領域・非癌領域を選択的に採取し、LC-MS/MS 法を用いたプロテオーム解析によって、界面特異的蛋白質の発現動態を明らかにし、それらを病理組織標本を用いた免疫組織化学および培養細胞による免疫蛍光法により、それぞれ確認している。

口腔 SCC・CIS と周囲非癌上皮との間の界面の形態解析によって、側方浸潤界面を、垂直型、斜面型、凸面型に分類できたとしている。界面域では特徴的な形態変化のなかでも、アポトーシス・好酸性硝子体が強調されたことから、癌-非癌接触条件下では癌部で細胞死が亢進し、SCC・CIS 細胞が細胞競合における敗者となる可能性が示されたという。このうち、好酸性硝子体は cleaved caspase 3 陽性である点でアポトーシスとの共通点があったが、TUNEL 陽性消失が生じていたことから、アポトーシスとは異なる未知の細胞死機序によって生成されることを示唆している。

一方、プロテオーム解析の結果、癌部側で非癌側よりも多数の蛋白質が同定され、SCC・CIS 細胞における細胞活性の多彩さを確認している。emPAI 法という定量的解析方法を用いることによって、癌部で非癌部より keratin (K) 17 増加と K13 減少を確認し、LMD 法による試料採取の精度を保証すると同時に、免疫組織学的に両者の相互増減を CIS の診断基準としてきたことの正当性が定量的に検証されたとしている。ケラチン分子以外に、数種の癌組織特異的な同定結果を得た蛋白質や、界面特異的特異的発現増減を示した蛋白質の発現状況は、口腔 SCC・CIS 組織切片と培養 HSC-2 細胞において免疫組織化学的に検証し、プロテオーム解析の精度を確認している。そのうち、RBP1、LAD1、IL1RN の特異的な増減は、細胞間クロストークを示唆する可能性があるとしている。

以上の結果から明らかなように、口腔 SCC・CIS と非癌上皮部との界面解析という独自のアプローチによる特定の分子発現変動を発見し、側方浸潤に際して界面特異的な細胞間クロストークの存在可能性を示した。さらにプロテオーム解析によってこれまでの病理組織学的診断根拠に一定の科学的な裏付けを与えた点が特筆される。

以上のとおり、細胞生物学上での新たな知見を得て、臨床応用として病理診断学上での科学的診断根拠を提示しえた点で、本研究の学位論文としての価値を認める。