

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 隅田賢正  
学位 博士(歯学)  
学位記番号 新大院博(歯)第397号  
学位授与の日付 平成30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 **Cytoplasmic expression of SOX9 as a poor prognostic factor for oral squamous cell carcinoma**  
(口腔扁平上皮癌における SOX9 細胞質陽性は予後不良予測因子となる)

論文審査委員 主査 教授 田沼 順一  
副査 教授 高木 律男  
副査 教授 大峽 淳

博士論文の要旨

**【緒言】**

Sry-box 9(SOX9)は性分化や軟骨形成を制御する重要な転写因子である。軟骨形成においては、SOX9 発現上昇により II 型コラーゲンやアグレカンなどの細胞外基質 (ECM) の分泌を促進させることで軟骨形成の足場となり、軟骨内骨化を促進することが知られている。また乳癌や大腸癌など種々の癌においても SOX9 が高発現し、癌細胞の浸潤増殖に関与することも認知されてきたが、口腔癌での SOX9 の発現および機能は未だ知られていない。これまでに我々は ECM のひとつであるパルカン (PN) が口腔癌胞巣の周囲の腫瘍間質に存在していることを明らかにするとともに、PN の種々の細胞増殖因子のリザーバーとしての機能を解明してきた。さらに近年では、癌の浸潤において、SOX9 が PN を含む ECM 発現を調節していることが示唆された。そこで本研究で、我々は口腔扁平上皮癌 (OSCC) およびヒト OSCC 由来培養細胞株における SOX9 の発現パターンを解析し、OSCC における SOX9 の機能を検討した。

**【材料・方法】**

新潟大学医歯学総合病院口腔外科において、2008 年から 2011 年の間に外科的に切除された OSCC49 症例を対象とした。正常粘膜から浸潤癌までの病変を含むパラフィン標本を選択し、SOX9 および Ki-67、PN の免疫組織化学を行い、SOX9 のタンパク質発現パターンと臨床病理学的因子との相関を統計学的に解析した。また、ヒト OSCC 由来細胞株 (高転移性細胞株 HSC-3 / 非転移性細胞株 HSC-4) を用いて、Real-time PCR 法、ウェスタンブロット法及び免疫蛍光抗体法にて SOX9 発現パターンを解析するとともに、細胞増殖能および遊走能試験を行い、SOX9 の癌細胞での機能を検討した。

**【結果・考察】**

外科材料における検討の結果、正常粘膜上皮においては、SOX9 は非陽性あるいは棘細胞層に弱い核陽性を認めるのみであったが、上皮異形成・上皮内癌と病変の進行につれて、傍基底細胞層から棘細胞層での SOX9 核陽性が増加し、SOX9 核陽性を示す症例は、上皮異形成で全体の 79% (38/48)、上皮内癌で 93% (38/41) の症例で、特に Ki-67 陽性細胞からなる増殖帯に一致した SOX9 核陽性を示した。浸潤癌胞巣では全体の 88% (43/49) で SOX9 核陽性がみられ、さらに細胞質陽性を示す症例が全体の 88% (43/49) に認められ、上皮内癌と明瞭に対比された。また PN の沈着が上皮内癌では SOX9 陽性細胞間に、浸潤癌では SOX9 陽性胞巣周囲で認められた。そこで浸潤癌胞巣での SOX9 細胞質陽性の増加に着目し、癌胞巣内での細胞質陽性率を指標に統計学的解析を行った結果、SOX9 細胞質陽性は後発リンパ節転移の増加と有意に関連していた。生存率曲線の解析では SOX9 細胞質陽性の増加は、無再発生存期間およ

び疾患特異的期間の短縮と有意に相関していた。ヒト OSCC 由来細胞株 HSC-3 と HSC-4 を用いた検討では、免疫蛍光抗体法にて、HSC-4 では SOX9 陽性は核に局在しているのに対し、HSC-3 では核陽性に加えて細胞質陽性も認められた。SOX9 mRNA 発現解析では、HSC-3 が HSC-4 と比べ高発現しており、ウェスタンブロット法によるタンパク質発現でも同様の結果が得られた。よって HSC-3 における SOX9 の細胞質発現は、その細胞の SOX9 発現量の著しい増加により生じている可能性が考えられた。細胞の機能については、遊走能試験で HSC-3 が有意に高い結果が得られた。

以上の結果をまとめると、OSCC では SOX9 が高発現し、病期依存的に核陽性率の上昇が見られた。前立腺癌では SOX9 発現は Wnt シグナル伝達経路により制御され、 $\beta$ -catenin/TCF4 と共発現することが知られているが、OSCC においても、 $\beta$ -catenin が SOX9 陽性のみられた増殖帯で核発現し、その周囲に PN の陽性がみられることから、SOX9 発現は Wnt シグナル伝達経路により制御され、さらに PN の発現を制御している可能性が示唆された。さらに浸潤癌では SOX9 核陽性に加え細胞質陽性が認められ、SOX9 細胞質陽性の増加は患者の予後不良と有意に相関していた。SOX9 細胞質陽性に関しては、その詳細な分子機構は明らかにされていないものの、乳腺の浸潤性導管癌においても SOX9 細胞質陽性の増加と予後不良の相関が報告されているように、OSCC においても SOX9 細胞質陽性の増加は患者の予後不良因子と相関関係にあることから、OSCC の免疫組織における SOX9 細胞質陽性を検討することが重要であると考えられる。今後は SOX9 および PN を含めた腫瘍性 ECM との分子発現、癌細胞動態の関連を分析し、OSCC における SOX9 の分子機構を解明したい。

#### 審査結果の要旨

厚生労働省 2015 年口腔・咽頭がんの予測死亡者数は約 7,000 人を超えており、癌全体の約 2% である。5 年生存率はステージによって異なるが、例えばステージ 1 では 70% 以上という高い値を示す。すなわち口腔がんにおける早期発見・治療の重要性は他臓器のがんと同様であると言える。しかし直視・直達が可能で口腔がんにおいても、意外に早期の診断は困難であることが多い。口腔がんの大部分は、重層扁平上皮からなる口腔粘膜上皮に由来する扁平上皮癌であるが、発がんメカニズムや病理組織像の多彩性は一般には十分に理解されていない。そのために診断基準は 2017 年と 2005 年 Head and Neck tumor の WHO 分類、口腔癌取扱規約（日本口腔腫瘍学会）および頭頸部癌取扱規約（日本頭頸部学会）により、Dysplasia 分類だけでなく SIN・OED・OIN・Binary System 分類も加わり、一番理解しているはずの口腔病理専門医でさえ混乱しているのが現状で、診断基準は各施設の病理医に委ねられている。一方、口腔がん・口腔前がん病変を規定する有力な候補遺伝子・マーカーに関する報告は未だにされてない上、現在明確で新たな実験結果もまったく得られていないのである。

ところで学位申請者が所属する研究室ではこれまで、境界悪性病変を含む口腔粘膜腫瘍の客観的な評価基準策定を目指して、研究を進めてきたが、その中でパールカン (PN) が口腔がんの進展、特に間質浸潤のステップに重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた。そこで学位申請者は、PN 発現の制御に関わる候補遺伝子として、転写因子である SOX9 に注目し、OSCC での SOX9 の発現様式と役割を解明する研究を遂行した。本論文では、1) 上皮性異形成、上皮内癌、浸潤癌の順に段階的に SOX9 の核発現が亢進することを見出し、SOX9 が細胞増殖をはじめとする発癌促進に関与すること、2) 浸潤癌において SOX9 は核のみならず細胞質にも発現が認められ、SOX9 細胞質発現レベルが予後不良因子となることを明らかにした。本研究の成果から、SOX9 免疫組織化学を口腔病理診断に応用すれば、口腔粘膜腫瘍の客観的な病理診断ならびに OSCC の予後予測への貢献が期待される。

今後は SOX9 や PN を含めた腫瘍性 ECM との分子発現、癌細胞動態の関連を分析し、OSCC における SOX9 の分子機構を解明することが出来れば新しい予防・製薬および治療の戦略を立てることが可能となると考えられる。他方で、審査員 3 名の口頭試問の結果、本人は博士 (歯学) にふさわしい学力を有していると認められるため、大学院博士課程の修了に値する。