博士（歯　学）　松　沢　祐　介

学位論文題名

口腔扁平上皮がん予後因子の検討

－E1AF・MT1-MMP・VEGFの発現と転移との関連－

Expression of E1AF, MT1-MMP and VEGF as predictive factors for the metastasis of oral squamous cell carcinomas.

学位論文内容の要旨

がんの浸潤・転移には，原発巣で増殖したがん細胞の原発巣からの遊離，周囲組織間の移動，基底膜等の分解と脈管内への侵入，ならびに原発巣と離れた部分での再増殖など様々な要因が関与している．

今回著者は，がんの浸潤・転移能を術前に把握することが可能か否かを明らかにするために，細胞外基質分解酵素マトリックスメタロプロテアーゼ（以下MMP）の発現を誘導する *ets* がん遺伝子群転写因子 E1AF と，がん細胞が産生し周囲基質の分解を促進する膜型マトリックスメタロプロテアーゼ 1（以下MT1-MMP），および脈管新生能力との関連が報告され種々のがんで腫瘍の増大や予後との関連が示唆されている Vascular Endothelial Growth Factor（以下VEGF）の発現を検索し，転移との関連について検討した．

E1AF は *ets* がん遺伝子群転写因子で，口腔扁平上皮がんの浸潤能に関与している可能性があることが報告されている．

MT1-MMP は E1AF によりその転写が亢進することが報告されている．また，MMP-2（ゼラチナーゼ A）は口腔を含む様々なヒト扁平上皮がんでその発現が亢進しており，がんの浸潤･転移に深く関与しているとされているが，MT1-MMP は，生体内で通常不活性な潜在型酵素として存在している MMP-2 を活性化することが知られている．

VEGF は血管内皮細胞に特異的に作用し内皮細胞の増殖を促進する血管新生増殖因子で，様々ながんで血管密度と VEGF の発現強度および転移との間に相関が認められ，VEGF の発現は予後因子となり得ることが示唆されている．

対象症例は，1992 年から 1998 年までの間に北海道大学歯学部附属病院口腔

外科で治療を行った口腔がん症例のうち，病理組織学的に扁平上皮がんと診断され，初診時の原発巣の大きさが T1 および T2 で術前放射線療法ないし化学療法が行われていなかった 32 例とした．性別は男性 18 例，女性 14 例で，初診時年齢は 28 歳から 81 歳（平均 64.1 歳）であった．腫瘍の臨床病期的分類は 1987 年の UICC 分類に，腫瘍の組織学的分化度は WHO 分類に従った．TNM 分類の内訳は T1N0 が 6 例，T2N0 が 19 例，T2N1 が 5 例，T2N2b が 1 例，T2N2bM1 が 1 例であった．N0 症例 25 例中 11 例にリンパ節後発転移が認められたため，全経過中では 18 例（56.3%）がリンパ節転移例であった．組織学的分化度は Grade Ⅰ が 15 例，Grade Ⅱ が 17 例であった．原発部位は舌 20 例，下顎歯肉 5 例，上顎 3 例，口底，下唇，頬粘膜，中咽頭が各 1 例であった．

E1AF と MT1-MMP の検索は RT-PCR で行った．構造タンパクをコードしている β-actin の増幅を行い RNA が保存されているのを確認した後に，oligo (dT) プライマー(GibcoBRL U.S.A.)と Superscript Ⅱ (GibcoBRL U.S.A.)逆転写酵素により cDNA を合成し，E1AF と MT1-MMP に対する RT-PCR を行った．E1AF のセンスプライマーは 5'-TCAGGTACCAGACAGTGATGAGCAGTTTGT-3' (n.n.140-169)，アンチセンスプライマーは 5'-AAGGGCTGTAGGGGCGACTG-3' (n.n.378-397)を用いた．MT1-MMP のセンスプライマーは 5'-AAGCTGATGCAGACACCCATGAAGG-3' (n.n.347-370)，アンチセンスプライマーは 5'-TTATCAGGAACAGAAGGCCG-3' (n.n.1015-1034)を用いた．VEGF の発現は免疫染色で検索した．手術時に得られたパラフィン包埋標本から 4μm の薄切標本を作成し，抗 VEGF マウスモノクローナル抗体と抗 CD34 マウスモノクローナル抗体を用いた免疫染色を行い、腫瘍細胞の VEGF の発現と血管新生との関連を検索した。判定は Kaya らの報告に準じ，薄切々片中腫瘍細胞の 30%以上が染色される症例を VEGF 発現症例とした．

全症例中 E1AF 陽性症例は 11 例（34.4%）であった．MT1-MMP は 5 例（15.6%）が陽性で，その全例が E1AF 陽性であった．VEGF は 11 例（34.4%）が陽性であった．VEGF 陽性例の CD34 免疫染色像では，腫瘍細胞間に認められる血管は微細で数も多く活発な血管新生を示していた．

リンパ節転移と E1AF および VEGF の発現との関連では，E1AF 陽性例 11 例のうち 7 例（63.6%）にリンパ節転移を認め，E1AF 陰性症例 21 例中 11 例

学位論文審査の要旨

主 査　教 授　戸 塚 靖 則
副 査　教 授　向 後 隆 男
副 査　教 授　福 田　 博

学 位 論 文 題 名

口腔扁平上皮がん予後因子の検討

－ E1AF・ MT1-MMP・ VEGF の発現と転移との関連－

Expression of E1AF, MT1-MMP and VEGF as predictive factors for the metastasis of oral squamous cell carcinomas.

審査は、審査員全員出席の下に、申請者に対して提出論文とそれに関連した学科目について口頭試問により行われた．審査論文の概要は、以下の通りである．

本研究は、がんの浸潤・転移能を術前に把握することが可能か否かを明らかにする目的で、細胞外基質分解酵素マトリックスメタロプロテアーゼ（以下MMP）の発現を誘導する*ets*がん遺伝子群転写因子E1AFと、がん細胞が産生し周囲基質の分解を促進する膜型マトリックスメタロプロテアーゼ1（以下MT1-MMP）、および脈管新生能力との関連が報告され種々のがんで腫瘍の増大や予後との関連が示唆されているVascular Endothelial Growth Factor（以下VEGF）の発現を検索し、転移との関連について検討したものである．

対象症例は、外科単独治療を行った口腔扁平上皮癌T1・T2症例32例で、男性18例、女性14例、初診時年齢は28歳から81歳（平均64.1歳）である．N0症例25例中11例にリンパ節後発転移が認められ、全経過中では18例（56.3％）がリンパ節転移症例である．組織学的分化度はGradeⅠが15例、GradeⅡが17例である．原発部位は舌20例、下顎歯肉5例、上顎3例、口底、下唇、頬粘膜、中咽頭が各1例である．

E1AFとMT1-MMPの検索は、RT-PCR法により行った．組織よりRNAを抽出し逆転写酵素によりcDNAを合成したのち、これを鋳型としてE1AFとMT1-MMPに対する特異的プライマーを用いたPCRにより増幅産物の有無を検索した．

VEGFの発現は免疫染色で検索した．手術時に得られたパラフィン包埋標本から4μmの薄切標本を作成し、抗VEGFマウスモノクローナル抗体と抗CD34マウスモノクローナル抗体を用いて免疫染色を行い、腫瘍細胞のVEGFの発現と血管新生との関連を検索した．

全32症例中、E1AF陽性症例は11例（34.4%）であった．MT1-MMP陽性症例は5例（15.6%）で、いずれもE1AF陽性症例であった．VEGFは11例（34.4%）が陽性であった．VEGF陽性例のCD34免疫染色像では、腫瘍細胞間に認められる血管は微細で数も多く活発な血管新生を示していた．

リンパ節転移とE1AFおよびVEGFの発現との関連では、E1AF陽性症例に転移の多い傾向がみられたが、E1AFの発現とリンパ節転移との間に統計学的有意差は認められなかった．一方、VEGF陽性例11例では10例（90.9%）、VEGF陰性症例21例中8例（38.1%）にリンパ節転移を認め、VEGFの発現とリンパ節転移との間に、χ^2検定で危険率5％以下の統計学的有意差が認められた．E1AFとVEGFが共に陽性であった5例では全例にリンパ節転移を認め、いずれか一方が陽性であった17例では12例（70.6%）にリンパ節転移を認めた．これに対して、E1AFとVEGFが共に陰性であった15症例ではリンパ節転移を認めたものは6例（40.0%）に過ぎなかった．病理組織学的分化度とE1AFおよびVEGFの発現と間には統計学的有意差は認められなかった．

以上の検索結果から、E1AFの発現およびこれに伴うMT1-MMPによる細胞外基質の分解と、腫瘍細胞が産生する血管増殖因子による新生血管の増加が、口腔扁平上皮がんの悪性度の指標の一つである腫瘍の転移に関して重要な役割を演じていることが示唆され、E1AF、MT1-MMP、VEGFの術前の検索が患者の予後を決定する因子の一つとなりうるものと考えられた．

論文の審査にあたって、論文申請者による研究の要旨の説明後、本研究ならびに関連する研究について質問が行われた．いずれの質問についても、論文申請者から明快な回答が得られ、また将来の研究の方向性についても具体的に示された．本研究は、臨床材料を用いて、E1AF、MT1-MMP、VEGFの術前検索が患者の予後を決定する因子の一つとなりうることを明らかにしたことが高く評価された．本研究の業績は、口腔外科の分野はもとより、関連領域にも寄与するところ大であり、博士(歯学)の学位授与に値するものと認められた．