

学 位 論 文 題 名

舌扁平上皮がんにおける低酸素誘導性因子-1 α
(HIF-1 α) の発現と臨床病理学的悪性度との関連

(A relationship between induction of HIF-1 α and clinical findings
in squamous cell carcinoma of the tongue)

学位論文内容の要旨

低酸素誘導性因子 HIF(Hypoxia inducible factors)は、細胞の酸素恒常性を維持する上で重要な役割を果たす転写因子である。HIF-1 はエリスロポエチン、血管内皮増殖因子 (VEGF)、解糖系酵素、グルコーストランスポーターなどの遺伝子の転写を活性化することによって、細胞を低酸素環境に適応させる働きを持つことが知られている。HIF-1 は α と β の 2 つのサブユニットからなり、HIF-1 β は細胞核内で恒常的に発現しているのに対し、HIF-1 α は組織の酸素濃度によりその発現の調節を受けており、正常の酸素濃度下ではプロテアソームの分解によりほとんど検出できないが、細胞が低酸素環境に暴露されると HIF-1 α の分解は抑制され、急速な蓄積を生じる。近年、HIF-1 α の発現が血管内皮増殖因子 (VEGF) の転写を亢進することによって血管新生を促し、腫瘍の進行増殖に関与することが報告されている。また、低酸素誘導性のアポトーシスには p53 タンパクの関与が知られている。そこで今回私は、北海道大学歯学部口腔外科を受診し舌扁平上皮癌と診断された 39 症例を対象に、抗 HIF-1 α 抗体を用いた免疫組織化学によって HIF-1 α の発現と臨床的、病理組織学的所見などのパラメーター、特に腫瘍の転移活性との関連と、それに伴う血管新生との関連、ならびに変異型 p53 と HIF-1 α の発現との関連について検討した。

本研究においては、舌扁平上皮がん患者の生検標本に対して免疫染色を行うことにより、腫瘍組織における HIF-1 α タンパクの発現を検索する手法をとった。また本実験に先立ち、口腔がん細胞株を用いた in vitro の実験系により本研究で行った免疫組織化学の確実性を確認した。口腔扁平上皮がんの細胞株である KB、Ca9.22 を正常酸素濃度下と低酸素濃度下の 2 種の条件で培養し、ウエスタンブロッティングと免疫染色の 2 種の方法で HIF-1 α タンパクの発現を調べたところ、低酸素濃度下で培養された Ca9.22 にのみ HIF-1 α の発現が認められた。この結果はウエスタンブロッティングと免疫組織化学の 2 種類の検出方

法で差異が無かった。このことより免疫組織化学による HIF-1 α の検出は有効であると考えられた。そこで1986年から2001年の25年間に北海道大学歯学部口腔外科を受診し、病理組織学的に舌扁平上皮がんと診断された症例の中で T1 および T2 の 39 症例を対象とし、抗 HIF-1 α 抗体を用いた免疫組織化学を行った。39 症例中 12 例に HIF-1 α の発現が認められた(陽性率:31%)。HIF-1 α の発現と患者の年齢、性別、腫瘍の病理組織学的悪性度、臨床病期、浸潤様式、局所再発の有無とは有意な相関は認められなかったが、HIF-1 α 陽性群は頸部後発転移、遠隔転移が有意に多く($p<0.01$;Fisher's exact test)、生存率も有意に低かった($p<0.01$;log rank test)。さらに、抗 CD34 抗体を用いた免疫染色により腫瘍周囲の間質における微小血管について検索したところ、HIF-1 α 陽性群は陰性群と比較して顕著な血管新生が確認され、HIF-1 α の発現により VEGF が活性化され血管新生を惹起したと考えられた。がん抑制遺伝子である p53 は HIF-1 α の発現調節を抑制し、低酸素誘導性の細胞死に関与するとともに、VEGF の転写抑制的にはたらくことが知られている。変異型 p53 の発現を免疫組織学的に検索したところ、変異型 p53 の発現と初診時の患者の腫瘍径に有意な相関がみられたが(mt-p53 陽性群 T1:7 例、T2:13 例、mt-p53 陰性群 T1:15 例、T2:4 例; $p<0.01$)、その他の臨床、病理学的所見とは相関せず、HIF-1 α の発現とも関連はみられなかった。しかし、HIF-1 α と変異型 p53 の両者の発現が陽性な群では、有意に頸部後発転移、遠隔転移が多く($p<0.01$)、生存率も有意に低かった($p=0.02$)。変異型 p53(mt-p53)は野生型 p53(wt-p53)によって HIF-1 α の発現が抑制する機能を喪失することにより HIF-1 α の発現抑制、VEGF の転写抑制が起こらず、HIF-1 α による転移活性の増大をより強く修飾する働きがあると考えられた。

今回の検索結果により、舌扁平上皮がんの腫瘍組織ならびに口腔がん細胞株の一部において HIF-1 α の過剰発現が認められた。このような悪性腫瘍における HIF-1 α の過剰発現が、腫瘍の急速な増大によって惹起された低酸素状態に対して組織の酸素濃度の恒常性を維持するために二次的に発現した結果なのか、それとも腫瘍細胞そのものが酸素濃度に依存せず恒常的に HIF-1 α の過剰な発現を呈す形質を得た結果によるものなのかは、未だ明らかではない。しかし舌はほとんどが血管に富む筋組織により構成されており、また対象として選択した腫瘍はすべて T1、T2 症例であり、今回検索した舌腫瘍組織は酸素欠乏状態ではない可能性が高いものと思われる。HIF-1 α の発現が血管新生、浸潤、代謝の変化など腫瘍生物学の鍵の一端を担うことによって、腫瘍の増殖プロセスで重要な役割を果たしていることを考えると、このように正常酸素濃度の環境下にも関わらず恒常的に HIF-1 α の発現を示すタイプの腫瘍細胞は、低酸素状態に暴露されることによってはじめて HIF-1 α の発現を示す腫瘍細胞、あるいは低酸素状態でも HIF-1 α の発現を認めないような腫瘍細胞と比較して、臨床的により悪性度が高い腫瘍と考えられる。また一般に病理組織学的に膨張性に増殖するタイプの腫瘍は再発、転移が少なく予後良好とされ、反対に浸潤性の増殖を認める腫瘍は再発、転移の頻度が高くより注意深い経過観察が必要とされて

いる。腫瘍の浸潤様式は患者の予後を類推する上で重要な所見ではあるが、実際の臨床では病理組織学的に膨張性の増殖を示しているにも関わらず、所属リンパ節や遠隔臓器に転移をきたしている症例も認められる。今回の検索で膨張性増殖を示す舌扁平上皮がんの中で HIF-1 α の発現のみられた 4 症例中 2 例で転移が確認されたことは、HIF-1 α タンパクの発現が腫瘍の転移活性の程度を知る上で有用な検索方法となりうることを示唆するものと考えられた。

結論：舌扁平上皮がんにおける HIF-1 α タンパクの発現は、腫瘍周囲の間質に著明な血管新生を惹起し、それにより腫瘍の転移活性に有意に関与し生存率にも影響を及ぼす事が明らかとなった。また、HIF-1 α の発現と腫瘍の転移活性増大の流れには、mt-p53 の発現が何らかの形で関与していることが考えられた。HIF-1 α は舌扁平上皮がんの新しい予後予測因子、特に腫瘍の転移に対する予測因子になりうることを示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	福 田	博
副 査	教 授	向 後	隆 男
副 査	教 授	戸 塚	靖 則
副 査	助教授	進 藤	正 信

学 位 論 文 題 名

舌扁平上皮がんにおける低酸素誘導性因子-1 α

(HIF-1 α) の発現と臨床病理学的悪性度との関連

(A relationship between induction fo HIF-1 α and clinical findings
in squaremous cell carcinoma of the tongue)

審査は向後、戸塚、進藤および福田審査員全員が出席のもとに口頭で行われた。まず申請者から提出論文の内容の説明を受けた。その内容は以下の如くであった。

HIF(Hypoxia inducible factors)は、細胞の酸素恒常性を維持する上で重要な役割を果たす転写因子で、エリスロポエチン、VEGF、解糖系酵素、グルコーストランスポーターなどの遺伝子の転写を活性化することによって細胞を低酸素環境に適応させる。HIF-1 は α と β の2つのサブユニットからなり、HIF-1 β は細胞内で恒常的に発現しているのに対し、HIF-1 α は組織の酸素濃度によりその発現の調節を受けている。近年、HIF-1 α の発現が血管内皮増殖因子 (VEGF) の転写を亢進することによって血管新生を促し、腫瘍の進行増殖に関与することが報告されている。今回我々は、北海道大学歯学部口腔外科を受診し舌扁平上皮癌と診断された 39 症例を対象に抗 HIF-1 α 抗体を用いた免疫染色を行い、HIF-1 α の発現と臨床病理学的パラメータとの相関を検索した。

39 症例中 12 例に HIF-1 α の発現が認められた (陽性率:31%)。HIF-1 α の発現と患者の年齢、性別、腫瘍の病理組織学的悪性度、臨床病期、浸潤様式、局所再発の有無とは有意な相関は認められなかったが、HIF-1 α 陽性群は頸部後発転移、遠隔転移が有意に多く ($p<0.01$;Fisher's exact test)、生存率も有意に低かった ($p<0.01$;log lank test)。さらに、抗 CD34 抗体を用いた免疫染色により腫瘍周囲の間質における微小血管について検索したところ、HIF-1 α 陽性群は陰性群と比較して顕著な血管新生が確認され、HIF-1 α の発現により VEGF が活性化され血管新生を惹起したと考えられた。がん抑制遺伝子である p53 は HIF-1 α の発現調節を抑制し、低酸素誘導性の細胞死に関与するとともに、VEGF の転写抑制的にはたらくことが報告され

ている。変異型 p53 の発現を免疫組織学的に検索したところ、変異型 p53 の発現と初診時の患者の腫瘍径に有意な相関がみられたが (mt-p53 陽性群 T1:7 例、T2:13 例、mt-p53 陰性群 T1:15 例、T2:4 例; $p < 0.01$)、その他の臨床、病理学的所見とは相関せず、HIF-1 α の発現とも関連はみられなかった。しかし、HIF-1 α と変異型 p53 の両者の発現が陽性な群では、有意に頸部後発転移、遠隔転移が多く ($p < 0.01$)、生存率も有意に低かった ($p = 0.02$)。変異型 p53 (mt-p53) は野生型 p53 (wt-p53) によって HIF-1 α の発現が抑制する機能を喪失することにより HIF-1 α の発現抑制、VEGF の転写抑制が起こらず、HIF-1 α による転移活性の増大をより強く修飾する働きがあると考えられた。今回の検索結果により、HIF-1 α は舌扁平上皮がんの新しい予後予測因子、特に腫瘍の転移に対する予測因子になりうることが示唆された。

ついで各審査員から申請者に対し、本論文の内容とそれに関連する種々の質問が行われた。主な質問は以下の通りである。

- 1) 野生型 p53 の存在下では HIF-1 α の分解が促進され、低酸素誘導性の apoptosis を惹起するとあるが、この機序は何か。
 - 2) 血管新生の惹起がリンパ節転移を増強した機序は何か。
 - 3) 今回 HIF-1 α 陽性であった腫瘍は、低酸素によって HIF-1 α を発現したと考えて良いのか。
 - 4) HIF-1 α の発現が腫瘍の浸潤様式と有意な相関を示さなかったのは何故か。
- などであった。申請者はこれらの質問に対して明確に説明した。

さらに本実験の今後の展望について尋ね、以下の回答を得た。

本実験は retrospective な実験系であるため、今後さらに症例数を増やし、より厳密な結果を得たいと考えている。また放射線治療前後における HIF-1 α タンパクの発現の変化など、他のパラメータについての検索も行う予定である。また、HIF-1 α の下流遺伝子の検索と、その下流遺伝子発現と臨床病理学的悪性度との関連についても検討予定であり、実際に HIF-1 α の下流遺伝子であることが確認されたがん遺伝子 pim-1 と血管拡張を調節する adrenomedullin について現在追加実験中である。

以上から、申請者は本研究およびその関連領域について十分な知識を有していると認められた。

本研究は腫瘍転移のメカニズム解明に大きく寄与するものであり、今後の研究結果が、がんの悪性度のスクリーニング、あるいはがんの遺伝子治療に役立つ可能性があり、医歯学の発展に貢献する研究であると評価され、申請者は博士 (歯学) を授与するに値するものと判定された。