

学位論文題名

口腔扁平上皮がんにおける VEGF-C の発現と  
リンパ節転移の関連

学位論文内容の要旨

緒言

腫瘍の転移は悪性腫瘍の治療においてその予後に影響する最も重要な因子であり、口腔悪性腫瘍の大部分を占める扁平上皮がんにおいても、転移の有無が予後と深く関わっている。それ故その治療にあたっては、原発巣とともに転移リンパ節の制御が必須であり、術前にリンパ節転移の予測が可能であればその意義は大きい。

Vascular endothelial growth factor (VEGF) -A は強力な血管透過性亢進作用を持ち、血管内皮細胞に特異的に作用する増殖因子として発見された。その後、高い相同性をもつ関連遺伝子が発見され VEGF ファミリーを形成している。VEGF-C は VEGF ファミリーの一つで、リンパ管内皮細胞に特異的に発現する受容体 VEGFR-3/Flt-4 にリガンドとして結合し、リンパ管新生を促進することが明らかになった。近年、腫瘍細胞の発現する VEGF-C がリンパ管新生を誘導し、リンパ節転移と強い関連性のあることが示唆されている。

今回筆者らは、口腔扁平上皮がん症例を対象として real time RT-PCR による VEGF-C の発現を検索し、臨床病理学的パラメーターと比較することで、口腔扁平上皮がんにおける VEGF-C の発現の意義について検討した。

方法および結果

1. Real time RT-PCR による培養細胞株における VEGF-C の発現検索

VEGF-C を発現していることが知られているヒト線維肉腫細胞株 HT1080 を陽性対象とし、VEGF-C の発現のないヒト乳がん細胞株 MCF7 を陰性対象として用いた。さらに、

VEGF-C発現プラスミドを構築し遺伝子導入したMCF7細胞 (MCF7/VEGF-C) を作製した。これらの細胞株からRNAを抽出し、VEGF-Cに対する特異的プライマーを用いて Syber green によるReal time RT-PCRを行った。その結果、MCF-7細胞にVEGF-Cの発現はみられなかったが、HT1080とMCF7/VEGF-CにはVEGF-Cの発現がみられ、Real time RT-PCRによるVEGF-Cの発現が確認された。

## 2. 口腔扁平上皮がんにおける VEGF-C 発現の検索

1995年から2003年の間に北海道大学歯学部附属病院口腔外科を受診し、病理組織学的に口腔扁平上皮がんと診断された48症例を本研究の対象としてReal time RT-PCRを行った。正常粘膜4例をスタンダードとし、正常粘膜より高い値を示した症例をVEGF-C高発現群、それ以下を低発現群とした。VEGF-C高発現症例は全48例中20例、低発現症例は28例であった。

## 3. VEGF-C 発現と臨床病理学的パラメーターとの比較検討

VEGF-C高発現群では20例中14例にリンパ節転移を認めたのに対し、VEGF-C低発現群28例では9例のみで、VEGF-Cの発現とリンパ節転移に有意の相関が認められた。

T2症例を腫瘍径30mm以下のT2Eとそれ以上のT2Lに分け、T1とT2Eをearly stage症例、T2L・T3・T4をlate stage症例として分類した。Early stage 23例において、VEGF-C低発現群では12例中2例にのみリンパ節転移を認めたのに対し、VEGF-C高発現群では11例中7例にリンパ節転移を認め、VEGF-Cが高発現している症例では腫瘍径が小さいものでも有意にリンパ節転移の頻度が増加することが明らかになった。

初診時N0であった36例についてVEGF-Cの発現とリンパ節後発転移の関連について検討した。その結果、VEGF-Cを高発現している14例中8例にリンパ節後発転移を認めたのに対し、低発現だった22例では3例にのみリンパ節転移が認められた。さらに、初診時N0かつearly stageである21例を対象として検討したところ、リンパ節転移を認めた7例は全てVEGF-Cを高発現しており、低発現であった10例においてはリンパ節転移は1例も認められなかった。

対象症例の摘出物病理組織標本により浸潤様式を診断し、VEGF-C並びにリンパ節転移との関係を検索した。膨脹性増殖を示す21例のうち8例でVEGF-Cの高発現を認め、その内の4例でリンパ節転移を認めたのに対して、VEGF-C低発現症例で転移を認めた

のは 13 例中 4 例にすぎなかった。さらに、浸潤性増殖を示した 27 例で VEGF-C を高発現していた 12 例中 10 例に転移がみられたのに対し、VEGF-C 低発現症例では 15 例中 5 例のみであった。このような傾向は early stage のみを対象とするとより顕著であった。

## 考察

リンパ管は全身の免疫系に重要な役割を果たしている一方で、悪性腫瘍においてはその転移経路としての意味を有しており、遠隔臓器への転移よりも所属リンパ節転移の多い口腔扁平上皮がんでは、腫瘍細胞とリンパ管の増生の関係を明らかにすることは臨床的に意義があると思われる。腫瘍細胞のリンパ行性転移には、腫瘍細胞の原発巣からの遊離・周囲基質の分解・運動能の亢進に加えて、腫瘍間質のリンパ管の存在あるいはリンパ管新生が必要で、後者においては、腫瘍細胞の産生するリンパ管増生因子の関与が考えられている。

VEGF-C はリンパ管内皮細胞がもつ VEGFR-3 細胞外ドメインに結合し、細胞内キナーゼドメインをチロシンリン酸化する。それにより MAP キナーゼカスケードが活性化され、リンパ管内皮細胞の増殖を促すと考えられている。免疫組織化学的手法あるいは Western blotting により腫瘍細胞の VEGF-C 発現に関する検索が行われ、各種がんにおいて、VEGF-C の発現亢進がリンパ節転移と関連しているという報告がなされているが、口腔がんでの報告はほとんど認められず、また mRNA の発現を定量的に検索した報告もみられない。

本研究の結果、正常舌および歯肉粘膜での VEGF-C の発現はいずれも低く、生理的状態での VEGF-C の発現は低いレベルであることが明らかになった。これに対して、口腔扁平上皮がん組織では検索した 48 例中 20 例で VEGF-C の発現亢進がみられた。

今回の検索により、腫瘍細胞の VEGF-C 発現亢進はリンパ節転移の頻度を有意に増加させることが明らかになった。一般的に腫瘍サイズの増大は転移の危険性を増大させると考えられている。しかし、VEGF-C が高発現を示す症例は腫瘍径が小さいものでもリンパ節転移を起こす可能性が有意にかつた。さらに、初診時にリンパ節転移の認められない症例でも、VEGF-C の発現が亢進しているものでは、高頻度にリンパ節後発転移が生じる可能性があることが示された。

これまで、浸潤性に増殖する腫瘍は膨脹性に増殖するものに比べて、リンパ節転移や再

発率が高いことが示され、予後と関連することが指摘されている。今回の検索で、膨脹性発育を示す腫瘍でも VEGF-C の発現亢進のみられた症例では転移が増加する傾向がみられ、逆に浸潤性増殖を示す腫瘍でも、VEGF-C の発現量が少ないものは転移活性が低いことが示され、腫瘍の浸潤様式に VEGF-C の発現量を加味することでリンパ節転移の危険性をより正確に予測できる可能性が示された。

臨床的に初期がんであるのにも関わらず原病死する症例のほとんどがリンパ節転移と深く関係している。今回の結果より生検の際に一般的に行われている臨床病理学的パラメーターに加えて VEGF-C の発現検索を行うことによって潜在性のリンパ節転移の有無を予想し、これに基づいた治療法を選択することが口腔扁平上皮がん患者の生存率向上に寄与するものと思われた。

# 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 吉 田 重 光  
副 査 助 教 授 進 藤 正 信

学 位 論 文 題 名

## 口腔扁平上皮がんにおける VEGF-C の発現と リンパ節転移の関連

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。

Vascular endothelial growth factor (VEGF) -C は VEGF ファミリーの一つで、リンパ管内皮細胞に特異的に発現する受容体 VEGFR-3/Flt-4 にリガンドとして結合し、リンパ管新生を促進することが明らかにされている。本研究は、口腔扁平上皮がん症例を対象として VEGF-C の発現を検索し、臨床病理学的パラメーターと比較することで、VEGF-C の発現とリンパ節転移との係わりを検討したものである。

最初に VEGF-C を発現していることが知られているヒト線維肉腫細胞株 HT1080 を陽性対象、VEGF-C の発現のないヒト乳がん細胞株 MCF7 を陰性対象として、VEGF-C 発現プラスミドを構築し、遺伝子を導入した MCF7/VEGF-C 細胞を作製した。これらの細胞株から RNA を抽出し、VEGF-C に対する特異的プライマーを用いて Syber green による Real time RT-PCR を行った。その結果、MCF-7 に VEGF-C の発現はみられなかったが、HT1080 と MCF7/VEGF-C には VEGF-C の発現がみられ、Real time RT-PCR による VEGF-C の発現が確認された。

次いで、北海道大学歯学部附属病院口腔外科において口腔扁平上皮がんと診断された 48 症例を対象として Real time RT-PCR を行った。正常粘膜 4 例をスタンダードとし、それより高い値を示した症例を VEGF-C 高発現群、それ以下を低発現群とした。VEGF-C 高発現症例は全 48 例中 20 例、低発現症例は 28 例であった。

VEGF-C 発現と臨床病理学的パラメーターとの比較検討の結果は、高発現群では 20 例中 14 例にリンパ節転移を認めたのに対し、低発現群 28 例では 9 例のみで、VEGF-C の発現とリンパ節転移の間に有意の相関を認めた。T2 症例を腫瘍径 30 mm 以下の T2E とそれ以上の T2L に分けて検討するとその関係はより明らかなで、VEGF-C

が高発現している症例では腫瘍径が小さいものでも有意にリンパ節転移の頻度が増加することが明らかになった。

初診時 N0 の 36 例についての検討では、高発現の 14 例中 8 例に後発転移を認めただのに対し、低発現の 22 例では 3 例にのみ転移が認められた。さらに、初診時 N0 かつ early stage である 21 例を対象とすると、リンパ節転移を認めた 7 例は全て VEGF-C を高発現しており、低発現であった 10 例では転移は 1 例もなかった。病理組織学的な浸潤様式と VEGF-C、リンパ節転移との関係では、膨脹性増殖を示す 21 例中 8 例で VEGF-C の高発現を認め、その内 4 例で転移を認めたのに対し、VEGF-C 低発現症例で転移を認めたのは 13 例中 4 例にすぎなかった。このような傾向は early stage のみを対象とするとより顕著であった。

これらの結果は、腫瘍細胞の VEGF-C 発現亢進はリンパ節転移の頻度を有意に増大させることを示している。すなわち、一般的に腫瘍サイズの増大は転移の危険性を増大させるとされているが、VEGF-C が高発現を示す場合は、腫瘍径が小さくてもリンパ節転移を起こす可能性が高く、また初診時に転移がみられなくても後に転移を生じる可能性が高いことが明らかとなった。さらに腫瘍が膨脹性発育を示す場合でも VEGF-C の発現亢進がみられる場合は転移が増加する傾向があり、逆に浸潤性増殖を示す腫瘍でも発現量が少ない場合は転移活性が低いことが明らかとなり、腫瘍の浸潤様式に VEGF-C の発現量を加味することでリンパ節転移の危険性をより正確に予測できる可能性が示された。

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。主な質問事項は、VEGF-C 発現の高低とはどのような基準で決めたのか、VEGF-C のコピー数の絶対値がリンパ節転移の予測因子となり得るか、VEGF-C がリンパ管新生を促すとなぜリンパ節転移が多くなるのか、既存のリンパ管に比べて新生されたリンパ管は癌の転移に有利に働くのか、Real time RT-PCR は従来から行われている RT-PCR に比べてどのような特徴を有しているのか、等であった。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、VEGF-C 発現亢進がリンパ節転移の頻度を有意に増大させること、ならびに臨床的パラメーターに VEGF-C の発現量を加味することでリンパ節転移の危険性をより正確に予測できる可能性のあることを明らかにした点が高く評価された。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。