

学位論文題名

S100A2 expression as a predictive marker for late cervical metastasis in stage I and II invasive squamous cell carcinoma of the oral cavity

(Stage I・II 口腔扁平上皮癌における  
後発頸部リンパ節転移予測因子としての S100A2 発現)

学位論文内容の要旨

〈背景〉頭頸部癌において、頸部リンパ節転移は最も重要な予後規定因子である。頸部リンパ節転移の診断には CT や MRI、頸部エコー、PET 等の画像検査が施行されているが、諸検査にてリンパ節転移が陰性 (N0) と診断された症例の一部に後発頸部リンパ節転移 (late cervical metastasis; 以下 LCM) が認められる。stage I・II の早期口腔癌では、約 30% に LCM が認められ、それに如何に対応するかが予後を大きく左右するが、それらの潜在性転移症例に対し、予防的頸部郭清を行うべきかには未だ議論がある。現在、事前に潜在性転移を診断する有用な方法はなく、もし、その危険性を予測可能なマーカーが存在すれば、頸部リンパ節に対して適切な治療を選択する事が可能となる。これまでも臨床病理学的因子や転移の過程に関与する各種の遺伝子産物に関する検討がなされており、いくつかの因子の有用性が報告されてはいるものの、臨床的に N0 と診断された早期の口腔扁平上皮癌 (squamous cell carcinoma of the oral cavity; 以下 OSCC) における LCM の予測因子として実用化されているものはなく、そのようなマーカーを見つける事は重要な課題の一つである。S100A2 は S100 カルシウム結合蛋白の一員で、細胞の増殖・分化・運動・形質変化さらにはアポトーシスや癌転移に関与すると考えられている。これまでに腫瘍細胞内の S100A2 発現が喉頭癌やリンパ節転移のない食道癌における予後と相関する報告がある。また、S100A2 発現が肺の癌化の早期過程で抑制されており、肺癌の進行要因となる可能性が示唆されている。OSCC の LCM に関する S100A2 発現の報告はなく、本研究では stage I・II の OSCC において LCM と S100A2 との関連を検討した。

〈対象〉1994 年 1 月から 2004 年 3 月までの期間に治療を施行した T1-2N0 (stage I・II) OSCC 新鮮例のうち、他の頭頸部癌治療歴がなく、1 次治療を完遂でき、全身化学療法や頸部放射線照射を施行せず、1 年以上の経過観察が可能であり、かつ治療前の病理組織標本が検索可能であった 52 例を対象とした。頸部リンパ節は触診で触知できず、CT スキャンおよび頸部エコーで 1cm 未満かつ中心壊死を認めない場合に N0 と判断した。

〈免疫組織染色〉10%緩衝ホルマリン固定パラフィン包埋標本より切片を作成後、抗原の賦活化を行った。抗 S100A2 抗体として SH-L1 (SIGMA St.Louis, USA, 1:100 希釈) を用い、

通常の ABC 法にて免疫組織染色を行った。S100A2 発現は最も腫瘍が濃染した領域において、全腫瘍細胞のうち S100A2 陽性細胞の比率を測定し、20%以上の場合に陽性と判断した。

〈統計学的解析〉S100A2 発現の有無と対象患者の臨床病理学的因子（年齢・性別・T 因子・分化度・腫瘍の厚み・LCM や再発の有無）との関連を  $\chi^2$  検定（または Fisher 検定）にて解析した。また LCM と各因子との関連も同様に解析した。5 年粗生存率と後発頸部リンパ節転移陰性生存率を Kaplan-Meier 法にて算出した。p 値が 0.05 未満の場合に有意の差があるとみなした。

〈対象の特徴と結果〉対象 52 例の年齢は 28-85 歳（中央値 60 歳）であり、性別は男性 33 例、女性 19 例であった。経過観察期間は 9.5-109.8 月（中央値 32.1 月）で、全症例の 5 年粗生存率は 81%であった。このうち 21 例（40.4%）に LCM を認め、治療から LCM までの期間は 0-23 月（中央値 4.6 月）で、うち 19 例は 1 年以内であった。5 例に局所再発を認め（再発までの期間：13.3-87.6 月、中央値 48.1 月）このうち 3 例は局所再発よりも以前に LCM を認めていた。単変量解析では LCM を認めた症例は認めない症例と比較して有意に 5 年粗生存率が低かった（ $P=0.0061$ ）。多変量解析においても臨床病理学的因子の中で LCM だけが 5 年粗生存率に有意に影響を及ぼす因子であった。

腫瘍細胞における S100A2 の発現をみると 14 例（26.9%）が陰性で、38 例（73.1%）が陽性であり、そのうち LCM はそれぞれ 10 例（71.4%）、11 例（28.9%）に認められた。単変量解析では S100A2 発現が陰性の症例は陽性の症例と比較して有意に LCM の比率が高かった。S100A2 発現の有無と他の臨床病理学的因子との相関は認められなかった。また、LCM の比率においても、他の臨床病理学的因子との相関は認められなかった。多変量解析では S100A2 発現の有無が LCM に有意に影響を及ぼす唯一の因子であった。

〈考 察〉stage I・II OSCC は手術または放射線治療により良好な局所制御が得られるが、LCM が 21-41%に認められ、それが最も重要な予後規定因子となる。本研究においても LCM は 40.4%に認められ、LCM 例は有意に 5 年粗生存率が低かった。したがって、LCM を予測する因子を発見し、LCM を生じる危険性が高い症例に対し、予防的頸部郭清等の適切な治療を行う事が重要と考えられる。OSCC において LCM を予測する幾つかの臨床病理学的因子や免疫組織化学的マーカーが検討されている中で、後者では E-cadherin や Flt-4 と LCM との相関が報告されているが、統一の見解はなく、より信頼性の高いマーカーの報告が待たれている。本研究では多変量解析にて S100A2 が LCM に影響を及ぼす唯一の因子であり、S100A2 が LCM を予測するマーカーとして示唆された。われわれは E-cadherin を含む他の免疫組織化学的マーカーについても検討したが、LCM との相関は認められなかった。

S100A2 は腫瘍組織におけるその発現の低下が報告されている。その腫瘍抑制作用の詳細については不明な点も多いが、腫瘍抑制遺伝子である p53 が S100A2 発現を亢進させるとの報告があり、S100A2 は細胞の癌化を防ぐ働きがあると考えられている。また、喉頭癌の予後と相関するとの報告や気道上皮の癌化モデルの研究などから S100A2 は癌抑制因子であると推察されている。本研究でも S100A2 と OSCC における LCM との関連が示唆されたが、S100A2 がどのように LCM を制御しているのかについては不明であり、その作用機序の解明は今後の研究課題である。また、S100A2 単独では LCM のすべてを予測する事は困難であり、更なるマーカーの検索が必要である。S100A2 と最良の組み合わせとなるマーカーの検出には、網羅的な遺伝子発現解析が有用と考えられる。

〈結 語〉早期口腔扁平上皮癌症例において、S100A2 発現と臨床病理学的因子や後発頸部リ

リンパ節転移との関連を検討した。S100A2 発現の低下は後発頸部リンパ節転移を予測する重要な因子である事が示唆された。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 秋 田 弘 俊

副 査 教 授 近 藤 哲

副 査 教 授 福 田 諭

学 位 論 文 題 名

## S100A2 expression as a predictive marker for late cervical metastasis in stage I and II invasive squamous cell carcinoma of the oral cavity

(Stage I・II 口腔扁平上皮癌における

後発頸部リンパ節転移予測因子としての S100A2 発現)

口腔癌において、頸部リンパ節転移は最も重要な予後規定因子である。頸部リンパ節転移の診断には CT や MRI、頸部エコー、PET 等の画像検査が施行されているが、諸検査にてリンパ節転移が陰性 (N0) と診断された症例の一部に後発頸部リンパ節転移 (late cervical metastasis; 以下 LCM) が認められる。stage I・II の初期口腔癌では、約 30% に LCM が認められ、原発巣の制御が良好であるにも拘わらず予後を悪化させる要因となっている。現在、事前に LCM を診断する有用な方法はなく、もし、その危険性を予測可能なマーカーが存在すれば、頸部リンパ節に対して適切な治療を選択する事が可能となる。本研究ではそのようなマーカーを見つける目的で、潜在性癌抑制遺伝子産物と考えられている S100A2 に注目し、stage I・II 口腔扁平上皮癌 52 例を対象とし、S100A2 発現および臨床病理学的特徴と LCM との関連を検討した。S100A2 は S100 カルシウム結合蛋白の一員で、細胞の増殖・分化・運動・形質変化さらにはアポトーシスや癌転移に関与すると考えられている。これまでに腫瘍細胞内の S100A2 発現が喉頭癌やリンパ節転移のない食道癌における予後と相関する報告があり、また、S100A2 発現が肺の癌化の早期過程で抑制されており、肺癌の進行要因となる可能性が示唆されている。方法は対象例の腫瘍切除標本を用い、抗 S100A2 抗体による免疫組織染色を行い、全腫瘍細胞のうち S100A2 陽性細胞の比率を測定し、20% 以上の場合に陽性と判定した。S100A2 発現の有無と対象例の臨床病理学的因子 (年齢・性別・T 因子・分化度・腫瘍の厚み・LCM や再発の有無) との関連を  $\chi^2$  検定 (または Fisher 検定) にて解析した。また LCM と各因子との関連も同様に解析した。その結果、腫瘍細胞における S100A2 の発現は 14 例 (26.9%) が陰性で、38 例 (73.1%) が陽性であり、そのうち LCM はそれぞれ 10 例 (71.4%)、11 例 (28.9%) に認められた。単変量解析では S100A2 発現が陰性の症例は陽性の症例と比較して有意に LCM の発生頻度が高かった ( $P=0.0098$ )。S100A2 発現の有無と他の臨床病理学的因子との関係は認められなかった。また、LCM の発生頻度においても、他の臨床病理学的因子との関係は認められなかった。多変量解析では S100A2 発現の有無が LCM に有意に影響を及ぼす唯一の因子であった ( $P=0.0013$ )。以上の結果より、S100A2 発現の低下は、stage I・II 口腔扁平上皮癌における後発頸部リンパ節転移を

予測する重要な因子である事が示唆された。しかしながら、S100A2 がどのように LCM を制御しているのかについては不明であり、その作用機序の解明は今後の研究課題である。また、S100A2 単独では LCM のすべてを予測する事は困難であり、更なるマーカーの検索が必要である。S100A2 と最良の組み合わせとなるマーカーの検出には、網羅的な遺伝子発現解析が有用と考えられる。

口頭発表後、副査の近藤教授から S100A2 発現の判定におけるカットオフ値の根拠について、進行例・再発例や遠隔転移例における S100A2 発現について、副査の福田教授から、センチネルリンパ節生検との併用について、初期対象例の頸部リンパ節転移診断精度について、主査の秋田教授から、S100A2 のリンパ節転移における作用機序について、組み合わせが期待出来る他のマーカーについてそれぞれ質問がなされた。申請者は研究結果や臨床的データ、文献的知識に基づいて、いずれに対しても適切に解答した。

この論文は、stage I・II 口腔扁平上皮癌における後発頸部リンパ節転移を分子生物学的マーカーにより予測できる可能性を示した点が高く評価され、今後の口腔扁平上皮癌治療に応用し、その予後を改善させる事が期待される。

審査員一同はこれらの成果を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。