

Bcl-2 family 遺伝子の発現が口腔扁平上皮がんの 術前治療感受性に及ぼす影響

学位論文内容の要旨

【 緒 言 】

口腔扁平上皮がんの治療においては、外科的切除に加えて術前に放射線・化学療法を施行することが多いが、組織型や臨床病期がほぼ同一であるにもかかわらず、その治療に対する反応は必ずしも同様ではない。治療前に放射線や化学療法への感受性が把握できると、手術範囲の縮小や、無効な術前治療を行わずにすむなど、その意義は大きい。アポトーシスはプログラムされた細胞死であり、放射線や化学療法によるDNA損傷を背景としたストレス経路では、主としてミトコンドリアにおけるBcl-2ファミリー遺伝子／遺伝子産物の発現が重要な役割を演じていると言われている。

今回、放射線あるいは化学療法を開始する前にその治療効果や抵抗性を予測することが可能か否か、またその因子を明らかにすることを目的に、口腔扁平上皮がんと診断され、術前治療後に切除を受けた19症例を対象とし、生検材料より抽出したRNAを出発材料としたreal-time RT-PCRにより、7種類のBcl-2ファミリー遺伝子についてmRNAの発現を検索した。さらにBax、Bcl-2および代表的ながん抑制遺伝子の一つであるp53の変異についても、免疫染色を用いて検索し、術前治療効果との相関を検討した。

【材料と方法】

北海道大学病院歯科診療センターおよび恵佑会札幌病院歯科口腔外科において口腔扁平上皮がんと診断され、術前治療後に切除を受けた19症例を対象とした。症例の内訳は舌がんが12例、上顎歯肉がんが3例、口腔底がん、上顎

がん、頬粘膜がん、中咽頭がんがそれぞれ1例であった。年齢は42才から77才で、中央値は67才であった。性別は男性13名、女性6名であった。腫瘍の臨床ステージ分類では、stage2が7例、stage3が3例、stage4が9例で、進行症例の比率が高かった。治療は、放射線治療が14例、放射線・化学療法が5例であった。

初診時の試験切除標本の組織片よりtotal RNAを抽出し、逆転写反応を行ってcDNAを合成し、得られたcDNAを鋳型としてreal-time PCRを施行した。Real-time PCRは、イニシャルインキュベーションとして50℃2分、95℃15分を行い、熱変性94℃15秒、アニーリング60℃30秒、熱伸長反応72℃1分で40サイクル行った。標準cDNAの計測にはGAPDHを用いた。Real-time PCRで得られたデータは、正常粘膜の最低値から標準偏差を引いた数値と、最高値に標準偏差を加えた数値の範囲を正常値とし、それより高値を示したものを高発現、低いものを低発現として評価した。また、 χ^2 検定を行い正常粘膜と高発現、低発現群の値を比較した。

試験切除標本の一部は、免疫染色により、Bax、Bcl-2およびp53タンパクの発現を調べた。なお、治療効果の判定には、大星・下里の分類を用いた。

【結果】

大星・下里の分類による治療効果判定では、治療効果なしが14例、治療効果ありが5例であった。

定量RT-PCRによるBcl-2ファミリーの発現を調べたところ、Baxの発現は、全ての症例において正常組織での発現に比較して有意に ($p < 0.02$) 低下していた。一方、Bcl-2は19例中6例で正常粘膜組織より有意 ($p < 0.05$) に発現が亢進していた。その6例中5例で術前治療の効果が認められず、Bcl-2 mRNA発現の高い症例は治療効果が不良な傾向であった。一方、アポトーシスを抑制するとされているBcl-XLの発現と治療効果の間には明らかな相関は認められなかった。BH3-only proteinであるBik、Bim、Bid、BNIP3のmRNA発現量に関しても治療感受性との間に明らかな相関は認められなかった。

BaxおよびBcl-2の免疫染色の結果では、Baxはいずれの症例にも認められず、定量PCRの結果と一致していた。Bcl-2タンパクは検討した19例中4例で発現が認められ、定量PCRの結果と概ね相関していた。

p53タンパクは検索した19例中16例で発現が認められた。術前治療に抵抗性を示した14例は全ての症例でp53タンパクの核への発現が認められたのに対し、術前治療が有効だった5例中3例ではp53タンパクの発現が認められなかった。

【考察】

今回の検索で、治療前のがん患者ではBaxの発現が低下していることが明らかになった。細胞のがん化において、細胞の不死化や細胞増殖活性の亢進に加えてアポトーシスの抑制が必要であるとされており、結腸がんではBaxの発現低下が発がんおよび悪性形質の獲得と関わっていると報告されている。今回の結果は、口腔扁平上皮細胞のがん化の過程でも、アポトーシス誘導因子であるBaxの発現低下が重要な役割を演じていることを示している。Bcl-2は今回検索した19例中6例で発現亢進を認め、そのうち5例は術前放射線・化学療法に抵抗性を示した。症例数が少ないため、統計学的な有意差は得られなかったが、口腔扁平上皮がんにおける治療前のBcl-2発現の有無の検索は、術前放射線・化学療法に対する抵抗性を判定するうえで有効な方法となりうるものと考えられた。BH3-only proteinであるBid、Bik、BimならびにBNIP3の治療前生検材料での発現と術前治療に対する感受性との間には明らかな相関は認められなかった。その理由として、これらのapoptosis initiatorは放射線や抗がん剤が腫瘍細胞に作用してから発現が亢進し、アポトーシスを誘導することが考えられた。

p53は代表的ながん抑制遺伝子の一つであり、細胞周期の停止や、DNA修復のほか、Baxの転写を亢進することでアポトーシスを誘導するなど、様々な機能を有している。抗p53抗体を用いた免疫染色は変異型p53をゲノムにもつ腫瘍細胞の核に陽性所見を示し、p53の変異の有無の判定に有用性が高い。今回の検索で、19例中16例でほとんどの腫瘍細胞の核がp53タンパク陽性で、p53

が変異型となっていることが示唆された。免疫染色が陰性で、p53が野生型であると考えられた症例はいずれも術前治療に対する感受性が高かった。これは、術前治療によって細胞がストレスを受けた際に、Baxの転写亢進を介するいわゆる正常なアポトーシスの誘導が生じたためと思われた。

今回の検索結果により、治療前生検試料でBcl-2の発現が亢進している症例と変異型p53をゲノムに持つ症例は術前放射線・化学療法に対して感受性が低い傾向があることが示された。今後、症例数を重ねることにより、Bcl-2ファミリーの発現と術前治療効果との関連性がより明らかになるものと思われた。

【結語】

口腔扁平上皮がん19例について、生検材料から採取したRNAを用いたreal-time RT-PCRにより、Bcl-2ファミリー遺伝子の発現について検討した。その結果、アポトーシス促進Bcl-2ファミリーであるBaxは口腔扁平上皮がん全ての症例で健常粘膜組織より発現が低下しており、口腔扁平上皮がんの発生にアポトーシスの抑制が強く関与していることが示された。アポトーシスの抑制に働くとされるBcl-2の発現が高い症例では術前放射線・化学療法に抵抗性を示す症例が多く、Bcl-2ファミリー遺伝子の検索を行うことにより、術前治療の効果を予測できる可能性のあることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 戸 塚 靖 則

副 査 教 授 進 藤 正 信

副 査 教 授 北 川 善 政

学 位 論 文 題 名

Bcl-2 family 遺伝子の発現が口腔扁平上皮がんの 術前治療感受性に及ぼす影響

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。

がんの治療において、治療前に放射線や化学療法への感受性が把握できると、手術範囲の縮小や、無効な術前治療を行わずにすむなど、その意義は大きい。アポトーシスはプログラムされた細胞死であり、放射線や化学療法による DNA 損傷を背景としたストレス経路では、主としてミトコンドリアにおける Bcl-2 ファミリー遺伝子/遺伝子産物の発現が重要な役割を演じていると言われている。本研究は、放射線あるいは化学療法を開始する前にその治療効果を予測することが可能か否か、またその因子を明らかにすることを目的に、術前治療後に腫瘍切除を受けた口腔扁平上皮がん19症例を対象とし、生検材料より抽出したRNAを出発材料としたreal-time RT-PCRにより、7種類のBcl-2ファミリー遺伝子についてmRNAの発現ならびにp53の変異について検索し、術前治療効果との相関を検討したものである。

対象は切除前に放射線・化学療法を受けた口腔扁平上皮癌患者 19 例で、男性 13 例、女性 6 例、年齢は 42～77 歳であった。大星・下里の分類による治療効果判定では、治療効果なしが 14 例、治療効果ありが 5 例であった。

初診時の試験切除標本の組織片より total RNA を抽出し、逆転写反応を行って cDNA を合成し、得られた cDNA を鋳型として real-time PCR を施行した。標準 cDNA の計測には GAPDH を用いた。Real-time PCR で得られたデータは、正常粘膜の最低値から標準偏差を引いた数値と、最高値に標準偏差を加えた数値の範囲を正常値とし、それより高値を示したものを高発現、低いものを低発現として評価した。また χ^2 検定を行い正常粘膜と高発現および低発現群の値を比較した。試験切除標本の一部は、免疫染色により、Bax、Bcl-2 および p53 タンパクの発現を調べた。

定量 RT-PCR による Bcl-2 ファミリーの発現をみると、Bax の発現は、全ての症

例において正常組織での発現に比べて有意に ($p < 0.02$) 低下していた。一方、Bcl-2 は 19 例中 6 例で正常粘膜組織より有意 ($p < 0.05$) に発現が亢進していた。その 6 例中 5 例で術前治療の効果が認められず、Bcl-2 mRNA 発現の高い症例は治療効果が不良な傾向であった。一方、アポトーシスを抑制するとされている Bcl-XL の発現と治療効果の間に、また BH3-only protein である Bik、Bim、Bid、BNIP3 の mRNA 発現量と治療感受性との間にも明らかな相関は認められなかった。なお、Bax および Bcl-2 の免疫染色の結果では、Bax はいずれの症例にも認められず、定量 PCR の結果と一致していた。Bcl-2 タンパクは検討した 19 例中 4 例で発現が認められ、定量 PCR の結果と概ね相関していた。p53 タンパクは、検索した 19 例中 16 例で発現が認められた。術前治療に抵抗性を示した 14 例は全ての症例で p53 タンパクの核への発現が認められたのに対し、術前治療が有効だった 5 例中 3 例では p53 タンパクの発現は認められなかった。

今回の検索で、治療前のがん患者ではいずれも Bax の発現が低下していることが明らかになった。このことは、口腔扁平上皮細胞のがん化の過程でも、アポトーシス誘導因子である Bax の発現低下が重要な役割を担っていることを示している。Bcl-2 は今回検索した 19 例中 6 例で発現亢進を認め、そのうち 5 例は術前放射線・化学療法に抵抗性を示し、口腔扁平上皮がんにおける治療前の Bcl-2 発現の有無の検索は、術前放射線・化学療法に対する抵抗性を判定するうえで有効な方法となりうるものと考えられた。免疫染色が陰性で、p53 が野生型であると考えられた症例はいずれも術前治療に対する感受性が高かった。これは、術前治療によって細胞がストレスを受けた際に、Bax の転写亢進を介するいわゆる正常なアポトーシスの誘導が生じたためと思われた。

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。申請者から適切かつ明快な回答が得られ、研究の立案と実行、結果の収集とその評価について十分な能力のあることが確認された。また本研究に必要な定量 RT-PCR 解析に関する知識と技術を含め、関連分野に対して幅広い知識を有していることが認められ、本研究をもとにして、今後さらに研究を発展させていく可能性が高いと判断された。さらに、本研究において、治療前の生検で Bcl-2 の発現が亢進し、かつ変異型 p53 をゲノムに持つ症例は、術前放射線・化学療法に対して感受性が低い傾向のあることを明らかにし、これらの遺伝子の検索を行うことにより、術前治療の効果を予測できる可能性があることを示唆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。