

博士(歯学) 長峯杏介

学位論文題名

Expression of PTHrP in mucoepidermoid carcinoma

(粘表皮癌におけるPTHrPの発現)

学位論文内容の要旨

PTH・副甲状腺ホルモン・上皮小体ホルモンは、血清カルシウム濃度の恒常性を維持するために働くホルモンで、骨芽細胞のもつPTH受容体と結合してRANKLを発現し、そのRANKLが前破骨細胞のもつ受容体RANKに結合することで破骨細胞を誘導・活性化し、骨吸収を促進する。

副甲状腺関連タンパクPTHrPはPTHと同一の受容体と結合し、PTHと同様の生理活性を示すホルモン様タンパクで、PTHの発現が副甲状腺に限局しているのに対し、PTHrPは多くの組織・細胞で普遍的に産生されており、とくに乳がんや前立腺癌の骨転移に伴う高カルシウム血症の発現には腫瘍細胞の産生するPTHrPが関与していることが知られている。しかし、口腔がんでのPTHrP発現についてはこれまでほとんど検索されておらず、さらに骨転移以外の腫瘍悪性形質との関連についても不明な点が少なくない。そこで、今回、口腔がん細胞株におけるPTHrPの発現の有無について検索を行うと共に、腫瘍を構成する細胞が多彩で、かつ良性腫瘍に近い形質をもつものから悪性度の高いものまで形態学的ならびに生物学的性状がvariationに富む唾液腺腫瘍である粘表皮癌についてもPTHrPの発現を検索した。

粘表皮癌は最も発生頻度が高い唾液腺悪性腫瘍で、耳下腺や口蓋腺に好発する。1945年にStewartにより粘表皮腫として報告され、1972年WHO分類では粘表皮腫の名称で良性腫瘍に分類されていた。しかし本腫瘍の中には局所再発や転移を生じるものがあることから、1992年のWHO分類では悪性腫瘍に分類され、2005年分類でも継続して悪性腫瘍として分類されている。粘表皮癌にみられる幅広い生物学的性状の違いを組織学的悪性度で分類する試みがなされている。2005年WHO分類では、5つの組織学的特徴、すなわち囊胞成分の割合、神経周囲浸潤、壊死、分裂像の多さ、退形成の程度をスコアリング化し、これにより良性腫瘍に近い低悪性度腫瘍、中悪性度および高悪性度腫瘍に分類する試みがなされている。この分類は粘表皮癌の治療にあたって有効な分類であるが、症例の中には形態的に低悪性度腫瘍であっても転移するものがあり、腫瘍のもつ生物学的悪性度をより的確に把握する方法の確立が望まれている。

口腔扁平上皮癌細胞株におけるPTHrPの発現をWestern blotにより検討したところ、口腔癌細胞株HSC-2, -3, -4では程度の差はみられるがいずれもPTHrPを高発現していた。しかもその程度は骨転移の頻度が高い前立腺がん細胞株PC3に比べてもより高いものであった。

次に、北大病院歯科診療センターで、粘表皮癌と診断された 21 症例を対象として PTHrP の発現を免疫染色にて検索した。粘液産生細胞では PTHrP 発現細胞は少なく、中間細胞と類表皮細胞で PTHrP の発現を示す細胞が多い傾向がみられた。腫瘍全体に占める構成細胞ごとの PTHrP 陽性率を求め、腫瘍の悪性度との関連について検討した。その結果、類表皮細胞における PTHrP 陽性率は転移再発を来たした 7 症例と予後良好であった 14 症例の間で差は認められなかつたが、PTHrP 発現中間細胞の多い症例では PTHrP 陽性率と予後との間に有意な相関が認められた。

近年、腫瘍をとりまく微小環境が注目を浴びている。これまで間質は正常細胞から構成されていると考えられてきたが、腫瘍間質に存在する線維芽細胞は、TGF- $\beta$  や VEGF など、通常の線維芽細胞ではほとんど発現のみられないタンパクを発現していることが明らかになってきた。腫瘍間質に存在する線維芽細胞は、正常細胞とは異なった形質を発現することから、Cancer-associated fibroblasts (CAF) と呼ばれ、CAF とがん細胞との相互作用が注目されている。 $\alpha$  SMA は筋線維芽細胞や血管平滑筋に発現し、線維芽細胞では通常発現していないが、CAF では高発現しており、CAF の有用なマーカーとなつてている。しかし、がん細胞が CAF を誘導するメカニズムの詳細については未だ不明な点が多い。本研究では、 $\alpha$  SMA 免疫染色を行い粘表皮癌組織における CAF の発現についても検討した。

正常粘膜においては、上皮下の結合組織にみられた  $\alpha$  SMA 陽性細胞は全て CD34 陽性の血管内皮細胞で CAF の性格をもつ線維芽細胞はほとんど認められなかつた。粘表皮癌では  $\alpha$  SMA 陽性を呈する線維芽細胞が認められたが、粘液産生細胞周囲では  $\alpha$  SMA を発現する線維芽細胞はごく少数が認められるにすぎなかつた。類表皮細胞が増生している部分では、腫瘍間質に  $\alpha$  SMA 陽性線維芽細胞が増生している部分もみられたが、血管以外に陽性を呈さない部分もみられた。一方、中間細胞を主体としている部分では  $\alpha$  SMA 陽性線維芽細胞が広範にみられ、このような  $\alpha$  SMA 陽性線維芽細胞の周囲には CD34 陽性小血管の増生もみられた。

CAF が発現する VEGF により血管新生が誘導されることや、TGF- $\beta$  によりがん細胞に EMT (Epithelial mesenchymal transition: 上皮間葉移行) が生じることが報告されている。粘表皮癌を構成する細胞の中で PTHrP を産生する頻度の高い中間細胞の周囲に CAF が多くみられたことは PTHrP により CAF が誘導され、さらに CAF により EMT が生じている可能性が考えられた。さらに CAF の中に径の小さな新生血管が豊富に認められたことは、PTHrP を産生する中間細胞が多い粘表皮癌では転移や再発の頻度が高いこととの関連性を支持するものと考えられた。

まとめ

1. 粘表皮癌で PTHrP の発現を検索したところ、PTHrP は中間細胞や類表皮細胞で高頻度に発現する傾向がみられ、とくに中間細胞で PTHrP の発現が多い腫瘍では転移再発の可能性の高いことが示された。
2.  $\alpha$  SMA に陽性を示す CAF は粘表皮癌組織でも間質に豊富に存在していたが、とくに中間細胞の周囲に CAF が多く認められる傾向があり、その周囲に微小血管が豊富に存在したことから、血管新生との関連性が示唆された。
3. このような所見は、粘表皮癌における腫瘍の悪性度と PTHrP 発現は相関しており、PTHrP の発現が腫瘍の予後予測因子の一つとなる可能性を示唆するものであった。

## 学位論文審査の要旨

主査 特任教授 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

## Expression of PTHrP in mucoepidermoid carcinoma (粘表皮癌におけるPTHrPの発現)

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。

粘表皮癌は唾液腺悪性腫瘍の中で最も発生頻度が高く、耳下腺や口蓋腺に好発する。腫瘍を構成する細胞が多彩で、形態学的にも生物学的性状にも variation に富む。粘表皮癌における幅広い生物学的性状の違いを 5 つの組織学的特徴から低悪性度腫瘍、中悪性度および高悪性度腫瘍に分類する試みがなされ、治療法の選択に広く用いられているが、時には生物学的悪性度と一致しないこともあり、生物学的悪性度をより的確に把握する方法の確立が望まれている。

副甲状腺関連タンパク PTHrP は乳がんや前立腺癌の骨転移において重要な役割を果たすことが知られているが、口腔がんではこれまでほとんど検索されていない。本研究は、口腔扁平上皮癌細胞株と粘表皮癌について PTHrP の発現を検索し、さらに粘表皮癌を対象として PTHrP の発現と生物学的悪性度との関係を検討したものである。

まず、口腔癌細胞株における PTHrP の発現を Western blot により検討し、口腔癌細胞株 HSC-2, -3, -4 では程度の差はあるものの、いずれも PTHrP を高発現しており、しかもその程度は骨転移頻度が高い前立腺がん細胞株 PC3 より高いことを明らかにした。

次に、北大病院歯科診療センターで粘表皮癌と診断された 21 症例を対象として PTHrP の発現を免疫染色により検索し、PTHrP 発現細胞は中間細胞と類表皮細胞が多く、粘液産生細胞で少ないことを示した。生物学的悪性度との関係については、PTHrP 発現中間細胞の多い症例では PTHrP 陽性率と転移・再発との間に有意な相関が認められること、ならびに類表皮細胞では両者の間に有意な関連はないことを明らかにした。

近年、腫瘍間質に存在する線維芽細胞は、TGF- $\beta$  や VEGF など、通常の線維芽細胞ではほとんど発現のみられないタンパクを発現していることが明らかになっている。これらの線維芽細胞は正常の細胞とは異なった形質を発現することから、Cancer associated fibroblasts (CAF) と呼ばれ、CAF とがん細胞との相互作用が注目されている。

そこで、血管内皮細胞のマーカーである CD34 と CAF の有用なマーカーである  $\alpha$ SMA の免疫染色を行い粘表皮癌組織における CAF の発現について検討し、中間細胞を主体とする部分で  $\alpha$ SMA 陽性の線維芽細胞が広範にみられ、またその周囲には CD34 陽性の小血管の増生が認められることを明らかにした。一方、粘液産生細胞周囲では  $\alpha$ SMA を発現する線維芽細胞はごく少数で、類表皮細胞が増生している部分では、腫瘍間質に  $\alpha$ SMA 陽性の線維芽細胞が増生している部分もみられたが、血管以外に陽性を呈さない部分もみられた。

このように粘表皮癌を構成する細胞の中で PTHrP を高頻度に産生する中間細胞の周囲に CAF が多くみられたことは、PTHrP により CAF が誘導され、さらに CAF が発現する TGF- $\beta$  により EMT が生じている可能性が高いと推論した。さらに CAF の中に径の小さな新生血管が豊富に存在したことは、PTHrP を産生する中間細胞が多い粘表皮癌では転移・再発の頻度が高いことを示唆するものと推論した。

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、以下の通りである。

- 1) 粘表皮癌を対象としたのは何故か
- 2) 図 3 と図 4 の関係、また図 4 の意味するのは何か
- 3) PTHrP を前立腺癌より強発現する口腔癌で、前立腺癌ほど骨転移が問題にならないのは何故か
- 4) PTHrP と頸骨浸潤の関係について
- 5) PTHrP 陰性症例における CAF の出現について
- 6) CAF により EMT が生じるとはどういうことか

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な回答が得られた。本研究は、粘表皮癌の中間細胞において PTHrP の発現が高い腫瘍では転移・再発の可能性が高いことを明らかにし、PTHrP の発現が粘表皮癌の予後予測因子の一つとなる可能性を示した点が評価された。また、中間細胞の周囲に CAF ならびに微小血管が豊富に存在することを明らかにし、PTHrP と血管新生との関連性を示唆したことでも高く評価された。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。