

鶴見大学大学院歯学研究科博士学位論文
内容の要旨

氏 名 (本籍)	藤 井 恵 介 (愛知県)
博士の専攻分野	博 士 (歯 学)
学 位 記 番 号	甲 第 427 号
学位授与年月日	平成 26 年 3 月 31 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 専 攻	鶴見大学大学院歯学研究科 (博士課程) 歯学専攻
学位論文題目	Clinicopathological significance and prognostic value of CD133 expression in oral squamous cell carcinoma (口腔扁平上皮癌における癌幹細胞マーカーCD 133 の発現がもつ臨床病理学的意義) Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology impress
論文審査委員	主査 教授 里村一人 副査 教授 大井田新一郎 副査 教授 濱田良樹

内 容 の 要 旨

【緒言】

頸部リンパ節転移を伴う進行性の口腔扁平上皮癌 (oral squamous cell carcinoma, OSCC) は、局所制御や転移抑制が困難で予後不良となることが少なくない。これまでもOSCCの予後予測に関する臨床病理学的な検討は行われているが、腫瘍の進展や転移に直接関与する有用なマーカーは同定されていない。

近年、腫瘍組織中にも組織幹細胞と同様に自己複製能と分化能を有し、腫瘍形成に関与する癌幹細胞 (Cancer stem cell, CSC) が存在することが明らかになってきた。OSCC を含む固形腫瘍では、CSC が様々な性質の癌細胞を供給することで階層性を有する腫瘍組織を構成し、腫瘍内不均一性や多様性が形成されている。腫瘍組織中の CSC の比率は数%であるが、この僅かに存在する CSC が腫瘍形成能を有し、放射線・化学療法に対して高い抵抗性を示すため、再発・転移に関与すると考えられている。これまで固形腫瘍の臨床病理学的な悪性度や病態進行度に関連する CSC マーカーとしては CD133 や CD44 が報告されている。

CD133 は 5 回細胞膜貫通型糖蛋白で、マウス prominin-1 のホモログでもある。CD133 は、脳腫瘍で CSC マーカーとして報告されて以来、前立腺癌や大腸癌などで同定されており、予後と関連することが報告されている。また、CD44 は、ヒアルロン酸をリガンドとする接着分子であり、癌細胞の増殖、浸潤、転移に関与するとされている。とくに胃がんにおける腫瘍再発や予後と関連し、胃がんの悪性度の指標となり得るとされている。

しかしながら、OSCC における CD133 と CD44 の発現様式や臨床病理学的因子との関連性は明らかにされていない。そこで本研究では、OSCC 原発組織中の CD133 と CD44 の発現量を解析し、各マーカーの発現と臨床病理学的因子およびリンパ節転移との関連性について検討することを目的とした。

【材料および方法】

当院または臨床連携病院にて、口腔癌原発巣切除術および頸部郭清術を施行した OSCC 患者 29 例を対象とし、手術時に切除した原発組織の一部を検体とした。検体組織より Total RNA を抽出・精製し、cDNA の合成を行い、CD133 と CD44 の発現量を定量 PCR 法にて解析した。対照にはヒト正常口腔粘膜組織 14 例を用いた。さらに、CD133 のタンパク質レベルでの発現解析を、免疫組織化学的染色と Western blotting 法にて検討した。

OSCC 原発組織と正常口腔粘膜組織における各マーカーの発現量を比較した。また、OSCC 原発組織における CD133 の発現量を、1) 年齢 (65 歳未満/65 以上)、2) 原発部位 (舌/歯肉/口底/頬粘膜)、3) 原発の大きさ (T1&T2/T3&T4)、4) 頸部リンパ節転移 (陰性群/陽性群)、5) リンパ節被膜外浸潤 (陰性群/陽性群)、6) 病期進行度 (stage I・II/III・IV)、7) 腫瘍浸潤度 (4mm 未満/4mm 以上) の各臨床病理学的因子別に検討した。

統計解析には、Mann-Whitney U-test あるいは Kruskal-Wallis test を用いた。なお、統計ソフトは StatView software (SAS, Cary, NC, USA) を用い、有意水準を 0.05 として評価した。

【結果】

OSCC 原発組織における CD133 の発現量は、正常口腔粘膜組織と比べ有意に高かった ($P = 0.004$)。原発組織における CD133 の発現量については、年齢 65 歳未満と 65 歳以上の 2 群間に差を認めず ($P = 0.3485$)、舌・歯肉・口底・頬粘膜の原発部位においても差はなかった ($P = 0.2305$)。また、T1&T2 と T3&T4 の 2 群間においても差を認めなかった ($P = 0.057$)。一方、頸部リンパ節転移陽性群での発現量は、転移陰性群に比べ有意に高く ($P = 0.0362$)、リンパ節被膜外浸潤陰性群に比較して陽性群で有意に高かった ($P = 0.0424$)。stage III・IV 群の CD133 の発現量は、stage I・II 群に比べ有意に高く ($P = 0.0437$)、腫瘍浸潤 4mm 以上の症例群の方が、腫瘍浸潤 4mm 未満に比べて有意に高かった ($P = 0.0066$)。なお、原発組織における CD44 の発現量は、病期進行度を除いた他の臨床病理学的因子において有意差を認めなかった。

また、CD133 のタンパク質の発現を免疫組織化学的染色・Western blotting 法にて検討したが、正常口腔粘膜ならびに OSCC 原発組織の両者とも発現は認められなかった。

【考察】

本研究結果より、OSCC 原発組織における mRNA レベルでの CD133 発現量は、OSCC の腫瘍進展度や頸部リンパ節転移の有無と有意に相関していることが明らかとなった。とくに、予後不良とされているリンパ節被膜外浸潤症例、stage III・IV 症例ならびに 4mm 以上の腫瘍浸潤症例において高発現を認めた。リンパ節被膜外浸潤については、術前画像診断による診断は困難であるが、本研究結果より、生検時に採取した原発組織における CD133 発現量から、腫瘍の臨床的悪性度や予後の予測が可能となることが期待できる。

また、タンパク質レベルでの発現を確認するために免疫組織化学的染色と Western blotting 法を実施したが、正常口腔粘膜、OSCC 原発組織とも発現は認められなかった。CD133 抗体は、グリコシル化エピトープを認識するが、エピトープマスキングにて喪失した非グリコシル化エピトープの認識が困難で、全ての CD133 発現を網羅出来ないとされており、現在使用可能な CD133 抗体では組織中の免疫組織化学的な発現解析を行うことは困難であると考えられる。CD133 mRNA は 7 つのバリエーションがあり、そのすべてのバリエーションをカバーするプライマーの設計は可能なため、定量 PCR 法による mRNA レベルでの解析方法は、CD133 の発現量を反映していることが示唆された。

【結論】

OSCC 原発組織における mRNA レベルでの CD133 発現量は、OSCC の進行度や頸部リンパ節転移と関連することが明らかとなり、有用な予後予測因子となり得ることが示唆された。