

氏 名 寺邊 健人
学位の種類 博士（医学）
学位記番号 博甲第 8712号
学位授与年月 平成 30年 3月 23日
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
審査研究科 人間総合科学研究科
学位論文題目 口腔扁平上皮がん切除マージン部分におけるオートファジー

および酸化ストレス関連タンパク質の発現と臨床動態の関連について

主査	筑波大学教授	医学博士	野口 雅之
副査	筑波大学准教授	博士（医学）	石川 栄一
副査	筑波大学講師	博士（医学）	松井 裕史
副査	筑波大学助教	博士（医学）	安孫子 ユミ

論文の内容の要旨

寺邊健人氏の博士学位論文は、口腔扁平上皮がん切除マージン部分におけるオートファジーおよび酸化ストレス関連タンパク質の発現を解析し、その臨床病態との関連を検討したものである。その要旨は以下のとおりである。

（目的）

本研究は口腔がん患者の切除検体を用い、特に切除マージン部に着目し、オートファジー関連マーカーである p62, LC3A, LC3B と、DNA 損傷マーカーである 8-OHdG, γ H2AX、多くのがんで高頻度に異常が認められる p53 の発現を調べ、これらの発現と各種臨床指標との関連を調べることで口腔がんに関する新たなマーカーを発見し、患者の予後を予測・改善することを目的としたものである。

（材料及び方法）

筑波大学附属病院歯科口腔外科にて全身麻酔下、外科的切除を受けた 71 名の口腔がん患者のホルマリン固定パラフィン包埋組織ブロック標本を試料として用いている。材料は 1997 年から 2009 年の間に手術された検体である。各種臨床情報および追跡調査データは、すべて筑波大学附属病院の診療情報記録から得られ、臨床情報中の TNM 分類および Stage 分類は American Joint Committee on Cancer 第 7 版の基準に従っている。すべての標本は少なくとも 2 人の病理医によって断端陰性と診断され、切除縁から腫瘍までの距離が 10mm 以上離れており、切除縁周囲に電気メスなどによる変性を来していないことが確認された。本研究は筑波大学病院附属病院の倫理委員会の承認を受け、すべての患者の同意が得られていることが確認されている。

すべての組織切片は 3 μ m の厚さに切断した上で標本とし、その後免疫染色を行い、腫瘍から少なくとも 10mm 離れた正常粘膜上皮部分を観察する。すべての標本は明視野下、拡大率 400 倍で観察する。観察範囲内における各標的の陽性細胞数を計測し、視野下の全上皮細胞数に占める割合を算出する。陽

性/陰性の判定基準は各先行研究での手法と、各標本の陽性細胞占有率の 25th - 75th percentile をもとに、p62, LC3A, LC3B, p53 については陽性細胞占有率 1%以上、 γ H2AX については 3%以上、8-OHdG については 10%以上と設定した。判定は寺邊氏と 1 人の口腔病理医、2 人の口腔外科医が担当し、陽性か陰性のみの判定とした。

統計学的評価を行っているが免疫染色の結果と各種臨床指標との比較については χ^2 検定を採用した。また腫瘍再発の評価として無再発生存期間、予後の評価としては疾患特異的生存期間を採用した。これらは Kaplan-Meier 法を用いて図表とし、両群間の差の検定には log-rank 検定、さらに単変量および多変量 Cox 比例ハザード分析が試みられた。

(結果及び考察)

各解析タンパク質についての免疫染色の結果、オートファジー関連タンパク質である p62, LC3A, LC3B の発現は、いずれも口腔がんの局所再発の有無との間に有意差を認めた。一方で腫瘍関連死については、LC3A および LC3B の発現との間には有意差を認めたが、p62 との間には有意差が認められなかった。一方で DNA 損傷マーカーである 8-OHdG および γ H2AX の発現と、代表的ながん抑制遺伝子である p53 の異常を示す変異型 p53 タンパク質の発現はいかなる臨床指標との間にも関連を持たなかった。

p62 は細胞内に発生した異常タンパク質に対し、ユビキチンタンパク質を介して結合し、さらに LC3A および LC3B と結合することでオートファジーの一部である選択的オートファジーが進行、異常タンパク質が分解されると報告されている。この際 p62 および多くの LC3A, LC3B も分解されるが、何らかの原因で選択的オートファジーが停滞すると分解されず蓄積する。つまり p62 や LC3A, LC3B が蓄積している状態は、オートファジーの異常を意味する可能性があると考えられている。

免疫染色後に観察を行った部位は軽度の異型上皮が含まれる場合があったが、腫瘍細胞は勿論、中等度以上の異型上皮は含まれていなかった。したがって口腔がんの局所再発が発生した場合、病理学的に正常と診断された正常粘膜上皮にもオートファジー異常が発生している可能性が高いことを明らかにした。また腫瘍関連死については、選択的オートファジーに特異的なタンパク質である LC3A, LC3B の発現との間に有意差を認めたが、多機能のタンパク質である p62 の発現との間には優位差を認めなかったことから、特に選択的オートファジーの異常が予後不良に導いている可能性が示唆された。一方、正常粘膜上皮に対する様々な外的要因による DNA 損傷は発生していたとしても、各種臨床指標とは関連しないことを示した。また口腔がん近傍に位置するという要素は、正常粘膜上皮における p53 遺伝子異常の発生とは関連がないものと考えられた。

(結論)

以上から本論文では口腔がん切除マージン付近の正常粘膜におけるオートファジー関連タンパク質 p62, LC3A, LC3B の蓄積は、局所再発リスクの検出や、腫瘍関連死の評価に有用なマーカーとなりうる可能性を示すことができた。口腔はその性質上、さまざまな外的刺激による異常タンパク質蓄積を来しやすく、オートファジー異常が起こりやすい環境と言える。このため、オートファジー関連タンパク質が口腔がん切除マージン付近で発現している場合、局所再発に留意するため厳密な経過観察を行い、場合によっては早期追加切除も考慮されるべきである。

審査の結果の要旨

(批評)

著者の博士学位論文は、口腔扁平上皮がん切除マージン部分におけるオートファジーおよび酸化ストレス関連タンパク質の発現を解析し、その臨床病態との関連を検討したものである。扁平上皮癌そのものでなく、その切除断端の一見正常に見える上皮細胞に怒るオートファジー、酸化ストレス関連タンパク質の発現を解析したユニークな研究である。免疫染色のみの解析で今後その他の手法を用いて結果を証明していく必要があるものの、新しい知見を得た価値のある論文であると評価される。

平成 30 年 1 月 10 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。