

氏 名	村 上 知 弘
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学 位 記 番 号	甲第 713 号
学位授与年月日	令和 6 年 3 月 18 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	口腔扁平上皮癌における幹細胞関連因子と基底細胞分化の解析
論 文 審 査 委 員	(委員長) 教授 金澤 丈治 (委 員) 教授 西野 宏 准教授 大西 康晴

## 論文内容の要旨

### 1 研究目的

口腔扁平上皮癌は、口腔癌の 90%を占める悪性腫瘍である。口腔扁平上皮癌の 5 年生存率は 60%~70%前後と比較的予後不良の悪性腫瘍として捉えられ、過去約 40 年間に於いて予後の改善には至っていないことが報告されている。その理由として、口腔扁平上皮癌は複数かつ多段階の遺伝子変化を経て発症する悪性腫瘍であることから、代表的なドライバー遺伝子を特定するまでには至っておらず、それに伴い現在利用している抗がん剤も従来のものが主体であるという点がある。口腔扁平上皮癌における治療ターゲットの発見や、それに対する治療法開発は、より多角的でより多くの研究が必要な状態である。

近年の癌研究において、癌幹細胞という考えが定着してきている。自己複製能をもち、分化能が保たれているという正常な幹細胞と共通の性質をもち、腫瘍形成や再発、治療抵抗性に寄与していることが、口腔扁平上皮癌を含めた様々な癌で報告されてきている。この癌幹細胞における性質の維持に重要な役割を担う転写因子を幹細胞関連因子と呼ぶ。最も代表的なものは、体細胞に導入することで多能性幹細胞を誘導する山中因子と呼ばれる OCT3/4、SOX2、KLF4、MYC の 4 因子と、core regulator として知られる NANOG である。これらに加えて、同じく幹細胞特異的な性質に直接的もしくは間接的に作用する様々な核内の転写因子についても包括することが多い。ポリコムグループタンパク質として知られる BMI1、EZH2 や、Hippo 経路のエフェクターである YAP/TAZ などがある。これら幹細胞関連因子は、口腔扁平上皮癌を含む様々な癌において予後不良因子となり得ることが報告されている。

病理組織学的に口腔扁平上皮癌は、主に角化度によって推定される組織学的分化度によって、高分化型、中分化型、低分化型扁平上皮癌に分類される。予後不良型とされる低分化型口腔扁平上皮癌の浸潤前面にて主に見られるのが基底層様細胞分化である。一般的に扁平上皮における組織幹細胞は基底層に存在し、この幹細胞が口腔扁平上皮癌の発癌に寄与していることを考えると、口腔扁平上皮癌における基底層様細胞分化の状態や程度は、幹細胞の性質と関連する予後因子である可能性が高い。実際に乳癌ではトリプルネガティブ乳癌に代表される「基底型」という分類が臨床で広く認識され、極めて予後不良の型であることが知られている。口腔扁平上皮癌においてはこれほどの認識には至っていないが、過去のマイクロアレイ解析では、「基底型」とされる頭頸部癌の存在については既に示されており、さらなる解析が望まれる。

そこで本研究では、基底型の頭頸部扁平上皮癌のマーカーとして報告されている collagen type XVII (COL17) を用いて、口腔扁平上皮癌を高発現型と低発現型の 2 群に分類することで、基底層様細胞分化の状態が及ぼす予後との関連を解析した。次に、基底層様細胞分化と、同部位の幹細胞による口腔扁平上皮癌の形成との関連を検討するため、口腔扁平上皮癌の基底層様細胞部分の幹細胞関連因子の発現を検索した。これにより、口腔扁平上皮癌における腫瘍形成の新たな洞察と、新たな予後予測因子を見出すことを目的とした。

## 2 研究方法

2012 年～2015 年にかけて自治医科大学附属病院歯科口腔外科で口腔扁平上皮癌として外科的に切除され、自治医科大学附属病院病理診断部にてパラフィン包埋病理ブロックが作成され、口腔扁平上皮癌と診断された 65 例を選択した。基底層様細胞分化マーカー COL17 の発現レベルを、Allred score 4 をカットオフとして高発現型と低発現型に分類した。また、SRF transcription factor 2 (SOX2)、KLF transcription factor 4 (KLF4)、MYC protooncogene, bHLH transcription factor (MYC) の代表的な幹細胞関連因子に加え、proto-oncogene and polycomb ring finger 1(BMI1)、enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit (EZH2)、yes-associated transcriptional regulator (YAP)と、そのパラログである transcriptional coactivator with PDZ-binding motif (TAZ) (以下 YAP/TAZ)について免疫組織化学的に解析した。それぞれの因子について Kaplan-Meier 曲線による Log Rank 検定並びに COX 回帰分析により予後を解析した。

## 3 研究成果

口腔扁平上皮癌 65 症例を、COL17 高発現群 30 例と低発現群 35 例の 2 群に分類した。次にこの 2 群について単変量 Cox 回帰分析を行ったところ、HR=2.801 と予後不良の傾向がみられた。また SOX2、KLF4、EZH2、YAP/TAZ についても、基底層様細胞における発現の有無により 65 症例を陽性と陰性の 2 群に分類した。SOX2 が 8 例、KLF4 が 62 例、EZH2 が 44 例、YAP/TAZ が 42 例がそれぞれ陽性に分類された。SOX2、KLF4、EZH2、YAP/TAZ について疾病特異的生存率の検定を行ったが、それぞれの因子単独では有意差は認められなかった。次に COL17 高発現群、低発現群と、SOX2、KLF4、EZH2、YAP/TAZ の基底層様細胞における発現の有無を組み合わせることで、それぞれ疾病特異的生存率の検定を行った。まず Log rank 検定によって予後不良となり得る群の検索を行った。その結果、COL17 高発現型と SOX2 陰性、COL17 高発現型と KLF4 陽性、COL17 高発現型と YAP/TAZ 陽性組み合わせ、さらに SOX2 陰性かつ KLF4 陽性と COL17 高発現型の組み合わせが疾患特異的生存率にて予後不良な一群である可能性が示唆された。これらの可能性を検証するため、多変量 Cox 回帰分析を行った。その結果 COL17 と SOX2 の組み合わせは HR=3.348、COL17 と SOX2 の組み合わせについては HR=3.747 と、COL17 単独の HR=3.093 と比較して予後不良の傾向がみられた。また、SOX2 かつ KLF4 の状態を含めた COL17 高発現型については HR=3.990(95% CI 1.018-15.643)と、有意に予後不良であった。

## 4 考察

過去の報告のマイクロアレイ解析から、乳癌と同様に頭頸部癌においても、基底層様細胞分化によって「基底型」とされるサブタイプの存在が示されている。本研究にて用いた COL17 は、口

口腔扁平上皮癌における基底層様細胞部分に限局して安定的に発現を認めた。これは我々の選択した COL17 の発現の程度が、基底層様細胞分化の状態を振り分けることで、口腔扁平上皮癌における「基底型」を分類する指標のひとつとして機能することを示した。

一般的に扁平上皮における組織幹細胞は基底層に存在することから、口腔扁平上皮癌の基底層様細胞分化を示す部分は、幹細胞の性質に関係している可能性がある。したがって、基底層様の癌細胞における幹細胞関連因子の発現の有無を検討することが重要であると考えた。さらに我々の検討では、正常粘膜ならびにマウス胚舌上皮において SOX2、KLF4、EZH2、YAP/TAZ の発現がそれぞれ異なる局在を認めたため、これらの因子の発現の局在が重要と考え検討したところ、口腔扁平上皮癌における予後予測に重要な情報を提供することが示唆された。

本研究における Log-rank 検定、Cox 回帰分析を用いた生存分析は、COL17 に幹細胞関連因子 SOX2、KLF4、EZH2、YAP/TAZ の 4 種のいずれかを組み合わせるという手法であり、口腔扁平上皮癌 65 症例というサンプルサイズの関係上、解釈に限界が存在する。一般的にサンプルサイズが小さいことで、Cox 回帰分析の 95%信頼区間の範囲は拡大する傾向にあることが知られており、本研究の示唆した可能性についての実証は、より多くのサンプルを用いたさらなる解析が望まれる。それでもなお Cox 回帰分析における HR は高く、有意差を認めた群もあり、統計解析結果として妥当であったものとする。

## 5 結論

我々は、口腔扁平上皮癌の基底細胞分化の状態と、基底層における SOX2、KLF4 の発現状態との組み合わせが、口腔扁平上皮癌の予後予測因子となる可能性を示した。

本研究は COL17 を用いて口腔扁平上皮癌の基底層様細胞の状態から、以前から存在が指摘されていた「基底型」の分類を試み、同部の幹細胞関連因子の局在が予後予測に影響を与えるという、腫瘍形成に関する新しい洞察を提供するものである。

本研究で得られた知見は、現在乳癌治療に用いられている分類のように、臨床応用として口腔扁平上皮癌においても「基底型」の分類の運用につながる可能性をもつ。また基底層様細胞部に局在した幹細胞関連因子、もしくは COL17 を主とした基底層様細胞を治療標的とすることで、口腔扁平上皮癌の予後不良群の予後改善につながる可能性がある。

## 論文審査の結果の要旨

学位申請者は、口腔扁平上皮癌の基底細胞分化の状態と基底層における SOX2、KLF4 の発現状態との組み合わせが、口腔扁平上皮癌の予後予測因子となる可能性を見出した。更に、研究をすすめて COL17 を用いて口腔扁平上皮癌の基底層様細胞の状態から以前から存在が指摘されていた「基底型」の分類を試み、同部位の幹細胞関連因子の局在が予後予測因子に影響を与えるという腫瘍形成に関する新しい見解を予測している。この研究で得られた知見は、現在、乳癌において用いられているような「基底型」の分類が口腔扁平上皮癌においても用いられる可能性を示している。また、基底層様細胞部に局在した幹細胞関連因子もしくは COL17 を主とした基底層様細胞を治療標的とすることで、口腔扁平上皮癌の予後不良群の予後改善につながる可能性があるこ

とを示した。本学位論文は、用語の使用法や統計解析法など臨床的立場から追加が望ましいデータなどはあるものの、この研究内容自体は高く評価すべきものであり、本学医学博士論文審査において合格に値するという結論で審査員全員の意見が一致した。

## 最終試験の結果の要旨

学位審査会は2024年2月6日19時30分より臨床教育棟1階大教室1で行われた。まず、申請者の村上知弘氏より研究内容に関してスライドによるプレゼンテーションが行われ、審査委員から以下のような質問および指摘がなされた。

- ・カプランマイヤーを用いていることから患者の治療内容の背景を記載する必要がある。
- ・COL17のこれまでのバックグラウンドを詳しくイントロダクションに入れた方が良い。
- ・生存曲線について、手術だけでなく他の治療も行っていることを追加で記載した方が良い。
- ・多くの negative data を入れているので論文全体が分かりにくくなっている。重要ではない negative data は削除すること。
- ・提出論文では記載はなかったが、プレゼンテーションで述べられた実験1と実験2との関連が不明瞭でした。実験1は思い切って省略するか、用いるとすると抑制剤の使用により細胞の動態がどのように変化したかを記載すべき。
- ・Positive control および negative control をどのように設定したかを記載すべき。(図3)
- ・COL17染色においてスコア0-3の症例数を表にして記載すべき。(表2)
- ・DOIを5mm未満と5mm以上とした理由を述べること。(表2)
- ・TNM分類やステージ分類ごとの生存率を記載又はグラフ化することが必要。(P11)
- ・各サブグループの症例数をグラフ中に記載するか表を作成すること。(図8,9)
- ・SOX, KLF4, EZH2, YAP/TAZの遺伝子導入実験による細胞動態の変化など考察内に記載すべき。(考察)

これを受け審査会では村上氏はその場で答えられる範囲で丁寧な考察を行い即答可能な事項に関しては適切な回答を行った。検討すべき問題点を再確認した後、村上氏は委員からの質問に真摯に回答するかたちで論文の改訂を申し出た。2024年2月10日に提出された改訂版では質問や修正が要求された全ての点に関して丁寧な修正がなされていることが確認できた。以上の結果により全ての審査委員が学位論文としての適格性を確認した。