

氏 名	西村 尋眸
(ふりがな)	(にしむら ひろみ)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲 第81号
学位審査年月日	令和6年1月31日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題名	Increased chymase-positive mast cells in high-grade mucoepidermoid carcinoma of the parotid gland  (耳下腺粘表皮癌におけるキマーゼ陽性肥満細胞の増加について)
論文審査委員	(主) 教授 植野 高章 教授 矢野 貴人 教授 萩森 伸一

## 学位論文内容の要旨

### 《目的》

粘表皮癌は耳下腺癌の中で最も多い組織型であり、耳下腺癌の約半数を占めている。病理組織の構成に基づいて高悪性、中悪性、低悪性に分類されている。その5年生存率は高悪性では約50%、中悪性と低悪性では90から100%とされ、著しい予後の差異を認める。近年、肥満細胞やその分泌物質と腫瘍病理の関係、その中でもプロテアーゼの一種であるキマーゼについて、他領域の腫瘍における報告はあるものの耳下腺癌ではほとんど検討されていない。本研究はさまざまな悪性度を有する耳下腺粘表皮癌を対象に、悪性度別の肥満細胞におけるキマーゼ発現、腫瘍組織におけるキマーゼ関連物質発現、がん関連細胞などについて検討し、粘表皮癌におけるキマーゼの腫瘍活性への生物学的なメカニズムを解明することを目的とした。

## 《対 象》

1999年から2020年の間に当科にて手術加療を行った耳下腺粘表皮癌44例を対象とした。病理組織像において、嚢胞成分、神経浸潤、腫瘍壊死、核分裂像、退形成を指標として悪性度を判定した。その結果、高悪性は18例、中悪性は9例、低悪性は17例であった。それらの5年生存率は、低悪性および中悪性では95.5%、高悪性では53.8%であったため、本研究では高悪性群と低/中悪性群の2つに分類して検討した。

## 《方 法》

下記の手法で、免疫染色や遺伝子発現の観察を行った。免疫染色では、陽性細胞数を200倍視野にて1切片につき3か所で細胞数計測を行った。

1) 肥満細胞におけるキマーゼの発現：トルイジンブルー染色によって肥満細胞の発現と数を検討した。キマーゼとトリプターゼの発現を免疫染色およびRT-PCRで検討するとともに肥満細胞のphenotypeを同定した。2) 線維芽細胞の同定：線維芽細胞と筋線維芽細胞が染色されるvimentinと筋線維芽細胞が染色される $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA)を免疫染色し、線維芽細胞と筋線維芽細胞(がん関連線維芽細胞: CAFs)の割合を評価した。3) 腫瘍細胞増殖因子の検討：細胞増殖をみるためproliferating cell nuclear antigen (PCNA)に対して免疫染色を行い、その発現について検討した。また脈管新生を見るため、vascular endothelial growth factor (VEGF)を免疫染色およびRT-PCRで検討した。さらに血管新生、リンパ管新生をみるため、それぞれvon Willebrand factor (vWF)およびpodoplaninの免疫染色を行った。4) キマーゼが産生する腫瘍活性因子の検討：細胞外マトリックスの破壊に関連するmatrix metalloproteinase (MMP-9)および増殖、浸潤、転移に関連するtransforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )の免疫染色を行った。

## 《結 果》

1) 肥満細胞におけるキマーゼの発現：粘表皮癌組織中には肥満細胞が出現していた。高悪性群のほうがやや発現が高かったが、低/中悪性群との間に有意差を認めなかった

( $p=0.057$ )。トリプターゼ陽性細胞数、遺伝子発現ともに高悪性で多かった ( $p<0.01$  および  $p<0.05$ )。キマーゼ陽性細胞数は高悪性で多かった ( $p<0.05$ )。肥満細胞の phenotype はトリプターゼ、キマーゼともに陽性であることから MC<sub>TC</sub> であることがわかった。2) 線維芽細胞の同定: 低/中悪性群では線維芽細胞と筋線維芽細胞が混在していたのに対して、高悪性群では大部分が筋線維芽細胞であった。3) 腫瘍細胞の増殖に関する因子の検討: 高悪性群では陽性細胞数、遺伝子発現ともに有意に PCNA の発現が高かった ( $p<0.001$ )。VEGF の遺伝子発現は高悪性群で高い傾向があったが有意差は認めなかった ( $p=0.088$ )。高悪性群ではリンパ管新生を示す podoplanin の発現が高かったのに対して、低/中悪性群では血管新生を示す vWF の発現が高かった。4) 高悪性群におけるキマーゼが産生する腫瘍活性因子の検討: MMP-9 は腫瘍細胞および線維芽細胞様細胞の両方で発現が認められた。また TGF- $\beta$  は腫瘍細胞で発現がみられた。

#### 《考 察》

粘表皮癌組織には悪性度に関係なく肥満細胞が存在することが明らかになり、肥満細胞が産生する活性物質であるキマーゼは高悪性群で強く発現していた。粘表皮癌は悪性度群によって著しく予後が異なるが、キマーゼが悪性度に何らかの関与をしていることが示唆された。

キマーゼはアンギオテンシン系を介して VEGF 産生に関与しているとされている。今回、細胞増殖に関与する PCNA や脈管新生に関与する VEGF が高悪性でより強く発現していた。さらにリンパ管新生に関与する podoplanin が血管新生に関与する vWF より強く発現していたことは注目される。粘表皮癌高悪性の転移形式はリンパ節転移が主である臨床的事実から、キマーゼ-アンギオテンシン系の活性化がリンパ節転移に関わっている可能性があり、また podoplanin 発現がリンパ節転移活性の指標にできるかもしれない。

キマーゼは MMP の産生にも関わっているとされている。今回の検討でも粘表皮癌組織の癌細胞や線維芽細胞に MMP-9 の発現が見られた。MMP-9 は細胞外マトリックスの破壊に関与し、転移の重要なステップを担っているため、キマーゼ-MMP 系も転移を促進する経路であると考えられた。また、TGF- $\beta$  は腫瘍細胞で強く発現していたが、キマーゼは

TGF- $\beta$  産生にも関係しており、TGF- $\beta$  は腫瘍微小環境における癌の浸潤、転移や MMP 分泌促進にも関与するとされている。TGF- $\beta$  は腫瘍血管内皮細胞と腫瘍細胞からがん関連線維芽細胞 (CAF) の産生促進作用を有しているとされている。Vimentin と  $\alpha$ -SMA を用いて線維芽細胞と筋線維芽細胞の発現を検討したところ、高悪性群では筋線維芽細胞が有意であった。CAF には癌の悪性化を促進する筋線維芽細胞とそうでない線維芽細胞に分類されているが、今回高悪性群において筋線維芽細胞が有意に発現していたことは注目される。

#### 《結 語》

耳下腺粘表皮癌組織では肥満細胞が認められ、その活性物質であるキマーゼは特に高悪性群で有意に発現していた。キマーゼによるアンギオテンシン系、MMP、TGF- $\beta$  の発現はいずれも癌の浸潤、転移促進に働いており、キマーゼは高悪性癌、すなわち高い悪性度に強く関与する系であると考えられる。キマーゼが高悪性群で強い発現が見られたことから、今後のキマーゼの研究は種々の悪性度を有する粘表皮癌の病態解明や、創薬開発につながる可能性がある。

## 論文審査結果の要旨

粘表皮癌は耳下腺癌の中で最も多い亜組織型であり、耳下腺癌の約半数を占めており、病理組織の構成に基づいて高悪性、中悪性、低悪性に分類されている。粘表皮癌の5年生存率は、高悪性が53.8%であるのに対して、低/中悪性では90~100%であり、予後に著しい差異を認める。近年、肥満細胞やその分泌物質と腫瘍病理の関係について、特にプロテアーゼの一種であるキマーゼが注目されている。申請者は本研究で、さまざまな悪性度を有する耳下腺粘表皮癌を対象に、悪性度別のキマーゼおよびキマーゼ関連物質を検討して、粘表皮癌における腫瘍活性の生物学的なメカニズムの解明を目的として研究を実施している。

耳下腺粘表皮癌、高悪性18例、低/中悪性26症例を対象として、一般組織染色、免疫組織染色およびRT-PCRを行い、キマーゼおよびその関連因子の発現などを多方面から検討を行い、粘表皮癌組織には肥満細胞が認められ、キマーゼは特に高悪性群で強く発現していること、キマーゼに関連する細胞増殖因子や腫瘍活性因子を検討したところ、低/中悪性群と比べて高悪性群で有意に強く発現していた。また近年注目されているがん関連線維芽細胞についても高悪性群における筋線維芽細胞の発現から考察を行っている。

キマーゼによるアンギオテンシン系、MMP、TGF- $\beta$ の促進はいずれも癌の浸潤、転移に働いており、キマーゼは特に高悪性の癌、すなわち高い悪性度に関与する系であると考えられる。キマーゼおよび関連物質が高悪性群で強い発現が見られたことから、種々の悪性度を有する粘表皮癌の病態解明、特に悪性度との関連の解明のみならず創薬開発につながる可能性があることから、本研究は、耳下腺粘表皮癌の病態解明に貢献しうる新たな知見を得たと考えられる。

以上により、本論文は本学大学院学則第13条第1項に定めるところの博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

International journal of molecular science 2023 May 5;24(9):8267.

doi: 10.3390/ijms24098267.