The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	歯肉扁平上皮癌におけるGalectin-1発現に関する研究
Author(s)	野田, 百合
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/61668
rights	Copyright © 2017 BMJ Publishing Group Ltd & Association of Clinical Pathologists. All rights reserved.
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　野田　百合　）	
論文題名	歯肉扁平上皮癌におけるGalectin-1発現に関する研究

論文内容の要旨

【目的】

Galectin-1(Gal-1)は、β-galactoside に結合する動物レクチンである。大腸癌、乳癌などの様々な悪性腫瘍で、Gal-1 発現が亢進していることが報告されており、Gal-1 発現の亢進は、腫瘍の浸潤や転移に関与していると考えられている。頭頸部扁平上皮癌においても、Gal-1 の発現が亢進していることが知られており、培養細胞を用いた *in vitro* 解析からは、Gal-1 が扁平上皮癌細胞の細胞骨格の再構成による細胞遊走や上皮-間葉転換(EMT)に関与すること、また、リンパ球の T 細胞へのアポトーシス誘導に関与することが示唆されている。しかしながら、*in vivo* の口腔扁平上皮癌組織における Gal-1 発現と腫瘍進展に関与する臨床病理学的因子との関連は明らかではない。

本研究では、歯肉扁平上皮癌を用いて *in vivo* における Gal-1 発現と臨床病理学的因子の関係について、癌の浸潤や腫瘍免疫の観点から検討を行った。

【材料と方法】

1. 検体材料

大阪大学歯学部附属病院にて生検時に採取された歯肉扁平上皮癌 80 症例と正常歯肉上皮を含む歯肉病変 10 症例のホルマリン固定パラフィン包埋標本を用いて検討を行った。本研究の実施は、大阪大学歯学研究科および歯学部附属病院倫理委員会より承認済みである(承認番号：H27-E15-1)。

2. 歯肉扁平上皮癌組織における Gal-1 発現と臨床病理学的因子との関係

パラフィン薄切切片を作製し、抗 Gal-1 抗体を用いて LSAB 法にて免疫染色を行った。癌胞巣における Gal-1 発現レベルは、Chiang らの判定基準(2008)により、癌胞巣内の Gal-1 陽性範囲が 10%未満 : Negative、10%以上-50%未満：Weak、50%以上：Strong の 3 段階で評価し、$m \times n$ 検定によって臨床病理学的因子との関係を検討した。

3. 歯肉扁平上皮癌組織における Gal-1 発現と腫瘍免疫との関係

In vitro 実験で示唆された癌の Gal-1 発現による T 細胞へのアポトーシス誘導について、免疫染色にて検討を行った。アポトーシスの検出には抗 Cleaved Caspase-3 抗体、T 細胞のサブセットの識別には、汎 T 細胞を認識する抗 CD3 抗体、細胞傷害型 T 細胞を認識する抗 CD8 抗体、ヘルパーT 細胞を認識する抗 CD4 抗体を用いた免疫染色を行い、各 T 細胞を同定し、その浸潤レベルを Tsukahara らの判定基準(2006)により、Mild、Moderate、Diffuse の 3 段階に分類した。アポトーシスを起こした各 T 細胞は、上記抗体を組み合わせた二重免疫染色により同定した。各 T 細胞についてアポトーシスを起こした細胞の割合を算出し、Gal-1 発現レベルとの関係を多変量解析により検討した。

4. 口腔扁平上皮癌細胞株の遊走・浸潤における Gal-1 発現の変化

口腔扁平上皮癌細胞株(HSC-3細胞)の遊走におけるGal-1発現を検討するため、スライドガラス上でHSC-3細胞を90%の細胞密度まで培養し、スクラッチにより中央部分のHSC-3細胞を除去したのちに、非スクラッチ部分からの遊走細胞を検討した。また、癌浸潤モデルとして、コラーゲンゲル上でHSC-3細胞を培養して、ゲル内に侵入す

るHSC-3細胞を検討した。遊走細胞の解析には、Gal-1、vimentin、E-cadherinに対する各抗体とphalloidin染色を組み合わせた免疫染色、浸潤細胞の解析には、Gal-1、vimentin、F-actinに対する各抗体を用いた蛍光二重染色にて検討した。

5. 癌浸潤先端部における Gal-1 発現の意義

腫瘍と間質の境界部が明瞭な歯肉扁平上皮癌組織の 57 症例を選択し、Gal-1 と vimentin に対する二重免疫染色を行った。癌浸潤先端部における Gal-1 発現と vimentin 発現を「有無」の 2 段階で評価し、癌の浸潤様式は、Anneroth らの分類(1986)を改変して、Grade1, 2 を Low grade、Grade3, 4 を High grade と定義して評価した。癌の浸潤先端部における Gal-1 発現と、EMT を示唆する vimentin 発現ならびに浸潤様式との関係はχ^2検定により検討した。

【結果・考察】

1. 正常歯肉上皮に Gal-1 発現は認められず、歯肉扁平上皮癌胞巣に Gal-1 発現を認めた。歯肉扁平上皮癌の癌胞巣における Gal-1 の発現レベルが亢進すると、組織学的分化度が低下し($P<0.05$)、リンパ節転移がみられ($P<0.033$)、全生存率は低下する($P<0.021$)ことが示された。

2. *In vitro* 実験で示唆された腫瘍の Gal-1 発現による T 細胞へのアポトーシス誘導を、病理組織標本を用いて検討した。その結果、癌胞巣における Gal-1 発現レベルは、汎 T 細胞の浸潤レベル($P=0.004$)と細胞傷害性 T 細胞の浸潤レベル($P=0.004$)と負の相関を示した。また、Gal-1 発現レベルが亢進すると、アポトーシスを起こす汎 T 細胞や細胞傷害性 T 細胞の割合が増加することが示された($P<0.05$)。以上から、歯肉扁平上皮癌では、癌胞巣の Gal-1 発現亢進により T 細胞へのアポトーシス誘導の割合が増すことを *in vivo* で明らかにした。

3. *In vitro* の遊走実験では、スクラッチ部で遊走する HSC-3 細胞には Gal-1 が発現し、vimentin 発現(間葉性形質)、E-cadherin 発現減少(上皮性形質)、ストレスファイバー形成が認められた。*in vitro* の浸潤実験では、コラーゲンゲル内に侵入した HSC-3 細胞は Gal-1 を発現し、vimentin 発現(間葉性形質)とストレスファイバー形成が認められた。これらの結果から、癌細胞における Gal-1 発現は、癌の浸潤先端部にみられる EMT の誘導やストレスファイバー形成による癌細胞運動の活性化に関与すると考えられた。

4. 癌の浸潤先端部における Gal-1 発現の意義を検討するため、病理組織において、Gal-1 発現と、EMT を示唆する vimentin 発現ならびに細胞運動が関与する癌の浸潤様式との関係を統計学的に解析した。その結果、癌の浸潤先端部に Gal-1 発現を認める症例は、同部に EMT を誘導し($P<0.01$)、High grade の浸潤様式を示す事が分かった($P<0.01$)。

【結論】

歯肉扁平上皮癌胞巣における Gal-1 発現亢進は、リンパ球の T 細胞のアポトーシスを誘導して腫瘍免疫を抑制すると共に癌の浸潤先端部における EMT 誘導や浸潤様式に関与して、リンパ節転移や生命予後の悪化に関与する重要な因子であると考えられる。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　野　田　百　合　）		
論文審査担当者	（職）	氏　名
	主 査　教 授	豊 澤　悟
	副 査　教 授	古 郷 幹 彦
	副 査　准教授	波 多 賢 二
	副 査　講 師	中 澤 光 博

論文審査の結果の要旨

本研究は、歯肉扁平上皮癌における動物レクチンの Galectin-1（Gal-1）発現亢進の臨床病理学的意義について検討したものである。

歯肉扁平上皮癌胞巣における Gal-1 発現亢進は、癌の浸潤先端部の上皮-間葉転換と低分化な浸潤様式という悪性形質の獲得や T 細胞のアポトーシスによる腫瘍免疫の抑制を介して、リンパ節転移や生命予後に関与することが示唆された。

以上の結果は、口腔の扁平上皮癌の進展を臨床病理学的に理解する上で重要な知見を与えるものと考えられ、博士（歯学）の学位を授与するに値するものと認める。