

学 位 論 文 要 旨

研究題目

Mechanism of Tumor Budding in Patient-Derived Metachronous Oral Primary Squamous Cell Carcinoma Cell Lines

(同一患者由来の口腔異時性癌培養細胞株における Tumor Budding 形成メカニズム)

兵庫医科大学大学院医学研究科

医科学専攻 器官・代謝制御系

口腔科学 (指導教授 岸本 裕充)

氏 名 大前 堯之

Tumor Budding (TB: 腫瘍簇出) とは、病理組織学的に腫瘍浸潤最先端部の間質内にみられる単一もしくは最大 5 個の腫瘍細胞塊のことで、先行研究から TB は口腔扁平上皮癌 (OSCC) の予後を左右する頸部リンパ節転移の予測因子となることが示されている。しかし、TB の発現機序は未だ不明であり、OSCC の新たな治療戦略として TB 発現メカニズムを探究する必要があった。我々は、同一患者に生じた TB 発現に差がある異時性 OSCC から 2 つの OSCC 培養細胞株 (TB (-) 歯肉癌: HCM-SqCC020;020、TB (+) 舌癌: HCM-SqCC020G;020G) を樹立した。本研究では、2 つの細胞株について異時性発癌における遺伝学的背景および腫瘍微小環境と TB 発現メカニズムとして、部分的上皮間葉転換 (p-EMT) が関与することを示した。

OSCC 培養細胞株 020 と 020G は STR 解析にて同一患者由来であることを確認した。020、020G と、正常サンプルとして患者由来血液から DNA を抽出し、遺伝子をコードするエクソン領域についてエクソーム解析を行い、細胞株の遺伝学的背景を調べた。次に、同患者の臨床検体を用いて腫瘍浸潤最先端部における TB 発現の差をパラフィン包埋切片を用いて検討するとともに、p-EMT マーカーの免疫組織化学染色 (IHC) を行い、発現を解析した。また、EMT 誘導因子として知られる TGF- β を 020 と 020G それぞれに作用させ、細胞増殖能、細胞形態、遊走能、浸潤能の変化とその差を解析した。さらに TGF- β を作用させたときの 020 と 020G について EMT 転写因子 (EMT-TFs) と p-EMT マーカー発現強度の差について Western Blotting および RT-PCR を用いて比較した。

エクソーム解析から、020 と 020G は異なる *p53* 変異を有しており、020G は OSCC で高い変異率を示す *CDKN2A* と *FAT1* 変異を認め、遺伝学的にも 2 つの細胞株は *de novo* であることが示された。浸潤最先端部における IHC では、TGF- β は腫瘍細胞と間質に発現を示し、p-EMT マーカーである LAMC2 は腫瘍細胞で発現し、後発舌癌では TB 細胞と間質と接する細胞に強陽性を示した。TGF- β 添加により細胞形態は紡錘形への変化を示し、遊走能と浸潤能はいずれも増加し 020G の方が顕著であった。TGF- β の作用で、*ZEB*、*Snail2*、*Twist* などの EMT-TFs と *MMP-9*、*MT1-MMP* などのゼラチナーゼ群が増加し、p-EMT 誘導が観察され、その発現強度に差を認めた。

同一患者から樹立した本細胞株は、異なる遺伝子変異と分子生物学的特性、遊走能、浸潤能と p-EMT マーカーの発現強度に差を有することが示され、これらは TB と p-EMT の関係を解明するために活用できる細胞株と考えられる。