鶴見大学大学院歯学研究科博士学位論文
内容の要旨および審査の結果の要旨

氏　名（本籍）	大橋　祥浩（東京都）
博士の専攻分野	博士（歯学）
学 位 記 番 号	甲　第　460　号
学位授与年月日	平成 28 年 9 月 30 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 専 攻	鶴見大学大学院歯学研究科 （博士課程）歯学専攻

学位論文題目

Overexpression of ErbB4 is an independent marker for lymph node metastasis in Japanese patients with oral squamous cell carcinoma

（日本人の口腔扁平上皮癌における ErbB4 の過剰発現はリンパ節転移を示唆する因子である）

Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology

論文審査委員　主査　教授　斎藤一郎

副査　教授　里村一人　　副査　教授　濱田良樹

【緒言】

上皮増殖因子受容体（Epidermal growth factor receptor: EGFR/ErbB1）は、チロシンキナーゼ型受容体のひとつであり、構造上の類似性から EGFR ファミリーとよばれる ErbB1（EGFR）、ErbB2、ErbB3、ErbB4 の 4 つの受容体が存在する。これらは、共通した構造としてリガンド結合部位を持ち、リガンドの結合によって活性化しシグナル伝達することが知られている。EGFR は癌細胞の発生・増殖・転移にも関与するとされており、近年では抗 ErbB1 抗体が大腸癌を対象とした分子標的薬として認可され、臨床データが蓄積されつつある。一方、頭頸部癌においても同抗体薬が臨床応用されるに至り、放射線療法や他の抗がん薬との併用効果等が報告されている。しかしながら、頭頸部癌組織における EGFR ファミリーの発現様式や、その臨床データとの相関性については不明な点が多い。

そこで本研究では、日本人の口腔扁平上皮癌（Oral Squamous Cell Carcinoma：OSCC）原発組織における EGFR ファミリーの発現量を、定量的 PCR 法および免疫組織化学染色を用いて正常組織における発現量と比較した。また、各種臨床データと EGFR ファミリーの発現量との相関性についても検討した。

【研究方法】

研究対象

同意を得た OSCC 患者 68 名より採取された腫瘍原発組織を研究対象とした。対照には健常人 18 名の口腔粘膜組織（Normal Oral Mucosa：NOM）を用いた。

定量 PCR 法

各検体より RNA を抽出し cDNA を合成した後、各種プライマーを用いて、NOM ならびに OSCC における EGFR ファミリーの発現量を定量 PCR 法により測定した。

先ず、適正な内部標準遺伝子（HKG）を選定するために、候補となる glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase（GAPDH）、hypoxanthine phosphoribosyltransferase（HPRT）、β-actin（ACTB）の発現量を測定した。NOM および OSCC 各組織でほぼ均等な発現を認めた β-actin（ACTB）を内部標準遺伝子として用いた。また，各検体組織中の EGFR ファミリー遺伝子の発現量と臨床データの各項目（年齢、性別、T 分類、臨床病期、リンパ節転移の有無）との関連性について検討した。

免疫組織化学的染色

免疫組織化学的染色により EGFR ファミリー蛋白の発現解析を ENVISION 法により行った。

統計解析

統計解析は Mann-Whitney U 検定、Spearman 相関係数検定、Log-rank 検定を用いて評価した。なお、統計解析ソフトには Prism5 for Windows(GraphPad Software, CA, USA)を用い、$P<0.05$ を有意と判定した。

【結果】

１．OSCC における EGFR ファミリーの mRNA 発現量

NOM と比較して OSCC 原発組織における EGFR ファミリーの発現量は、ErbB1 が有意に高く（$P<0.05$）、ErbB2 と ErbB3 は有意に低かった（$P<0.001$、$P<0.001$）。また、ErbB4 は両群間で有意差を認めなかった。

２．OSCC の臨床データとの比較における EGFR ファミリーの mRNA 発現量

OSCC 原発組織における EGFR ファミリーの発現量については、低年齢（65 歳未満）群およびリンパ節転移陽性群において、ErbB4 の有意な高発現を認めた（$P<0.05$、$P<0.05$）。他の項目では、有意な所見は得られなかった。

３．OSCC における EGFR ファミリー間での mRNA 発現量の相関性

OSCC 原発組織における EGFR ファミリー間での相関性は、ErbB2 と ErbB3 において強い相関関係を認めた（$P<0.001$、$\rho=0.724$）。さらに、リンパ節転移陽性群では、ErbB4 に対する ErbB2（$P<0.05$、$\rho=0.459$）および ErbB3（$P<0.05$、$\rho=0.461$）の発現量に相関関係を認めた。

４．免疫組織化学染色による OSCC における EGFR ファミリー蛋白の発現

NOM 上皮基底層において ErbB1 蛋白の強発現を認めた。一方、OSCC では細胞膜に ErbB1 の強発現を認めた。また、リンパ節転移陽性群の症例において、細胞膜および細胞質に ErbB4 の発現を認めた。

５．リンパ節転移の有無による生存率への影響

Kaplan-Meier 法によると、リンパ節転移陽性群の生存率は、リンパ節転移陰性群に比較して有意に低かった（$P=0.0067$）。

【考察】

OSCC における ErbB1 の高発現は、悪性転化や予後不良を示す所見で、ErbB1 を経由するシグナル伝達が癌の病態形成に関与していると考えられている。本研究の結果でも、NOM と比較して OSCC における ErbB1 の有意な高発現を認めており、OSCC に対する抗 ErbB1 抗体の臨床的有用性を示す１つの証左になると考えられた。一方、以前にわれわれが報告した大腸癌における EGFR ファミリーの発現解析では、ErbB1 が低発現で、OSCC における発現様式とは異なっていた。この発現様式の相違は、扁平上皮癌と腺癌を主体とする大腸癌との組織型の違いによるものと考えられた。

EGFR ファミリーの発現と各臨床データとの相関性については、OSCC の予後不良因子とされるリンパ節転移を伴う症例群および低年齢群（65 歳未満）において ErbB4 の有意な高発現を認めた。ErbB4 は他の EGFR ファミリーとヘテロ二量体を形成し、癌の浸潤や増殖に関与するとされている。OSCC においては、節外浸潤を伴うリンパ節転移を有する症例で ErbB4 と ErbB1 の共過剰発現を認め、生存率の低下を示唆するとの報告があり、本研究でも、リンパ節転移陽性群で ErbB2 と ErbB4 および ErbB3 と ErbB4 との間において有意な相関性を認めた。また、OSCC における ErbB2 と ErbB3 の相関性も生存率の低下を示唆すると言われているが、本研究でも ErbB2 と ErbB3 の強い相関性を認めた。しかしながら、リンパ節転移などの予後不良因子との関連性は見出せなかった。なお、免疫組織化学染色によって EGFR ファミリーの蛋白発現を解析したところ、mRNA レベルでの発現と相関する結果を得た。

以上より、リンパ節転移陽性群で高発現を呈した ErbB4 は、口腔癌の予後を直接反映し得る有用なバイオマーカーとなり得ることが示唆された。

審査の結果の要旨

EGFR（Epidermal growth factor receptor）ファミリーには ErbB1、ErbB2、ErbB3、ErbB4 の 4 つの受容体が存在し、これらは共通したリガンドの結合によって活性化しシグナル伝達することで癌細胞の発生・増殖・転移にも関与するとされている。しかしながら、頭頸部癌組織における EGFR ファミリーの発現様式や、その臨床データとの相関性については不明な点が多いことから本研究では、日本人の口腔扁平上皮癌（Oral Squamous Cell Carcinoma：OSCC）原発組織における EGFR ファミリーの発現量を定量的 PCR 法および免疫組織化学染色を用いて正常組織における発現量と比較し各種臨床データと EGFR ファミリーの発現量との相関性についても検討することを目的に行われた。

本研究の結果、以下のことが明らかとなった。

１．正常粘膜組織と比較して OSCC 原発組織における EGFR ファミリーの発現量は、ErbB1 が有意に高く（$P<0.05$）、ErbB2 と ErbB3 は有意に低かった（$P<0.001$、$P<0.001$）。また、ErbB4 は両群間で有意差を認めなかった。

２． OSCC 原発組織における EGFR ファミリーの発現量は、低年齢（65 歳未満）群およびリンパ節転移陽性群において、ErbB4 の有意な高発現を認めた（$P<0.05$、$P<0.05$）。

３．OSCC 原発組織における EGFR ファミリー間での相関性は、ErbB2 と ErbB3 において強い相関関係を認めた（$P<0.001$、$\rho=0.724$）。さらに、リンパ節転移陽性群では、ErbB4 に対する ErbB2（$P<0.05$、$\rho=0.459$）および ErbB3（$P<0.05$、$\rho=0.461$）の発現量に相関関係を認めた。

４． 正常粘膜上皮基底層において ErbB1 蛋白の強発現を認めた。一方、OSCC では細胞膜に ErbB1

の強発現を認めた。また、リンパ節転移陽性群の症例において、細胞膜および細胞質に ErbB4 の発現を認めた。

５． Kaplan-Meier 法によると、リンパ節転移陽性群の生存率は、リンパ節転移陰性群に比較して有意に低かった（P=0.0067）。

以上のことから、リンパ節転移陽性群で高発現を呈した ErbB4 は、口腔癌の予後を直接反映し得る有用なバイオマーカーとなり得ることが示唆された。このように本研究により口腔扁平上皮癌の診断に寄与する知見を明らかにしたことの意義は大きく、今後の臨床応用への道を拓くものと考えられる。

よって、本論文は博士（歯学）の学位請求論文として十分な価値を有するものと判定した。