

# 学 位 論 文 要 旨

氏 名 堤 翔平



論 文 題 目

「中咽頭扁平上皮癌における CD109 発現の意義」

指 導 教 授 承 認 印

山下 拓



## 1. 序論

CD109 は、細胞膜表面に存在する GPI (glycosylphosphatidylinositol) アンカー型糖タンパクである。CD109 は正常組織では血管内皮などの非常に限られた組織でのみ発現を認めるが、扁平上皮癌 (squamous cell carcinoma: SCC) などの様々な悪性腫瘍組織での高発現が確認されており、癌関連タンパクとして研究されている。しかし、CD109 の悪性腫瘍における役割は完全には解明されていない。

肺癌や上皮性卵巣癌などの悪性腫瘍において、CD109 が高発現している症例は治療効果や生存率が低下することが示唆されているが、頭頸部 SCC 組織における CD109 発現と治療効果や生存率との関連性については未だ検証されていない。

頭頸部 SCC の治療効果や予後を予測するバイオマーカーは、中咽頭扁平上皮癌 (oropharyngeal squamous cell carcinoma: OPSCC) におけるヒトパピローマウイルス関連の有無以外は確立されていない。そのため、予後を予測できる新しいバイオマーカーが確立されれば、より適切な治療方針の決定に寄与できる。

CD109 の発現と OPSCC の予後との関連を調査し、OPSCC における CD109 発現の意義を解明することを目的として本研究を行った。

## 2. 対象と方法

北里大学病院で病理組織学検査により OPSCC と診断され、北里大学病院耳鼻咽喉科・頭頸部外科で 2005 年から 2016 年の間に初回根治治療を受けた OPSCC 患者 169 例を対象とした。75 例は手術、94 例は化学放射線療法で主に治療されていた。免疫組織化学染色を用いて対象の組織標本における p16 および CD109 の発現を評価し、CD109 発現と臨床病理学的因子および無増悪生存期間 (Progression-free survival, PFS) との相関を評価した。

ヒト HPV-16 陽性頭頸部 SCC 細胞株である UM-SCC-47 および UM-SCC-104 における CD109 発現をウエスタンブロッティングで評価した。UM-SCC-47 を用いて、small interfering RNA (siRNA) によるトランスフェクションで CD109 の発現を抑制した。トランスフェクションの効率、ウエスタンブロッティングで評価した。増殖能および浸潤能に対する CD109 発現抑制の影響を Cell Counting Kit-8 を使用した細胞増殖アッセイ、Corning BioCoat マトリゲルインバージョンチャンバーを使用した浸潤アッセイでそれぞれ評価した。

## 3. 結果

免疫染色の結果、169 症例の OPSCC 症例のうち 143 症例 (84.6%) が CD109 陽性、90 症例 (53.3%) が p16 陽性であった。CD109 陽性群と CD109 陰性群の間では p16 発現に有意な差を認めなかった ( $p=0.20$ )。

手術を受けた患者と化学放射線療法を受けた患者では PFS に有意差を認めなかった。全症例を対象にした検討では CD109 陽性群と CD109 陰性群の間で PFS に有意差は認められず、続いて症例を p16 陽性 OPSCC 症例と p16 陰性 OPSCC 症例に分けてそれぞれにおける CD109 発現の有無と予後の関連性を評価した。p16 陽性 OPSCC 患者では、CD109 陽性群は CD109 陰性群に比べ有意に PFS が短かった ( $p=0.03$ )。p16 陰性 OPSCC 患者では、CD109 の発現と PFS の間に有意な関係は認められなかった。以上の結果より、CD109 の発現が p16 陽性 OPSCC の予後

不良と関連していることが示唆された。

CD109 発現と臨床病理学的因子の関係を OPSCC の全患者で分析した。CD109 陰性群は CD109 陽性群に比べて低分化 SCC の症例数が有意に多く ( $p=0.0005$ )、リンパ節転移を有する患者が有意に多かった ( $p=0.02$ )。次に、CD109 の発現と臨床病理学的因子の関係を p16 陽性群と p16 陰性群でそれぞれ分析した。CD109 陰性 p16 陽性群は CD109 陽性 p16 陽性群に比べ、低分化 SCC が有意に多かった ( $p=0.004$ )。CD109 陽性 p16 陽性群と CD109 陰性 p16 陽性群の間では、臨床病期、リンパ節転移、年齢、性別、亜部位、治療方法、飲酒歴、喫煙歴、パフォーマンスステータスに有意差はなかった。p16 陰性 OPSCC 患者の CD109 発現と臨床病理学的特徴との間に有意な関係は認められなかったが、CD109 陰性 p16 陰性群は CD109 陽性 p16 陰性群に比べ低分化 SCC が多い傾向にあった ( $p=0.08$ )。

ヒト HPV-16 陽性頭頸部 SCC 細胞株である UM-SCC-47 および UM-SCC-104 を用いてウエスタンブロッティングを実施し、両方の細胞株で CD109 の発現が約 180kDa と約 190kDa の 2 本のバンドとして検出された。ネガティブコントロール siRNA でトランスフェクトされた細胞およびコントロールのトランスフェクトされていない細胞と比較して、CD109 siRNA でトランスフェクトされた UM-SCC-47 細胞では CD109 の発現が減少していた。

siRNA による CD109 発現抑制の細胞増殖への影響を解析した結果、CD109 siRNA でトランスフェクトされた UM-SCC-47 細胞と、ネガティブコントロール siRNA でトランスフェクトされた UM-SCC-47 細胞およびコントロールのトランスフェクトされていない UM-SCC-47 細胞の間で増殖能に有意差はなかった。次に、CD109 発現抑制の細胞浸潤への影響について解析した。CD109 siRNA でトランスフェクトされた UM-SCC-47 細胞は、ネガティブコントロール siRNA でトランスフェクトされた UM-SCC-47 細胞よりも浸潤率が低い傾向があり ( $p=0.07$ )、コントロールのトランスフェクトされていない UM-SCC-47 細胞よりも浸潤率が有意に低かった ( $p=0.008$ )。そのため、CD109 が UM-SCC-47 細胞の浸潤を促進することが示唆された。

#### 4. 考察

口腔癌、尿路上皮癌、皮膚癌、食道癌では、低分化 SCC よりも高分化 SCC で CD109 の発現が高く、SCC の分化に CD109 が重要な役割を果たしていることが示唆されている。本研究の臨床データでも、p16 陽性 OPSCC 患者において、CD109 陰性群は CD109 陽性群と比較して有意に低分化 SCC が多いことが示された。p16 陰性 OPSCC 患者においても、CD109 陰性群は CD109 陽性群と比べて低分化 SCC が多い傾向にあった。これらの結果は、CD109 がトランスフォーミング増殖因子- $\beta$  シグナル経路の阻害を通じて上皮間葉転換を抑制することにより、SCC 細胞株における間葉系表現型の獲得を抑制するという過去の報告と一致する。CD109 と腫瘍細胞の分化度との関係の解明には、さらなる研究が必要である。

本研究の臨床データでは、CD109 陽性 p16 陽性群は CD109 陰性 p16 陽性群に比べ、PFS が有意に短かった。したがって、CD109 が p16 陽性 OPSCC 患者の予後不良のバイオマーカーであり、p16 陽性 OPSCC 患者の中から高リスクの患者を特定するのに役立つことが示唆された。

CD109 陽性 p16 陽性 OPSCC が予後不良である理由を調査するため、CD109 発現と p16 陽性 OPSCC 患者の臨床的特徴との関連性を検討した。CD109 陽性と CD109 陰性の群間では、臨床病期やリンパ節転移に差はなかった。CD109 陽性 p16 陽性 OPSCC の予後不良は治療方法の違

いによるものでないことも示唆された。

CD109 陽性 p16 陽性 OPSCC が予後不良である理由をさらに検討するために、*in vitro* で HPV 陽性頭頸部 SCC 細胞株を用いて CD109 ノックダウンの増殖能と浸潤能への影響を調査した。CD109 siRNA による CD109 ノックダウンにより増殖能は変化しなかったが、浸潤性は低下する傾向があった。そのため、CD109 が HPV 陽性頭頸部 SCC 細胞の浸潤を促進し、予後不良にしていることが示唆された。過去の知見から、CD109 は上皮成長因子受容体のシグナル伝達を介して HPV 陽性頭頸部 SCC の浸潤を促進している可能性が示されている。

卵巣上皮癌や慢性骨髄性白血病の化学療法低反応例における CD109 高発現が報告されているが、p16 陽性 OPSCC における CD109 高発現と治療効果との関連性は報告されていない。もし p16 陽性 OPSCC における CD109 高発現が治療効果の低下と関連していれば、CD109 陽性 p16 陽性 OPSCC の予後が不良であった本研究の結果と一致する。CD109 が治療効果に及ぼす影響について、今後さらなる調査が必要である。

## 5. 結論

CD109 の発現は、p16 陽性 OPSCC の予後不良と関連している。