

## 論文の内容の要旨

氏名：山口 桜子

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Analysis for predictor of cervical lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma

（口腔扁平上皮癌における頸部リンパ節転移予測因子の解析）

口腔領域に発生する扁平上皮癌（SCC）の中で、舌に発生するものが最も多く、比較的早期に頸部リンパ節転移をきたすことが指摘されている。頸部リンパ節転移は治療成績に影響を与える重要な因子の一つである。頸部リンパ節転移の予測が治療成績の向上に寄与すると考えられる。

OSCC の頸部リンパ節転移の予測因子は、現状では明確化されていない。本研究では舌に発生した SCC を頸部リンパ節転移群と非転移群にわけて、腫瘍占拠部での腫瘍浸潤先端部に注目し、腫瘍細胞の特性や腫瘍間質の脈管密度について、頸部リンパ節転移の予測因子として関連性が高い因子を検索することを目的とした。

対象は 2003 年から 2016 年の 13 年間に、日本大学松戸歯学部付属病院で病理組織学的に SCC と診断された舌癌のうち、一次治療症例で舌部分切除術と頸部郭清術を実施した 13 症例を対象とした。13 症例は病理組織学的に頸部リンパ節転移が認められる 7 例と頸部リンパ節転移のない 6 例の 2 群に分類した。口腔癌取扱い規約に従い臨床病理学的項目（占拠部位、原発巣の大きさ、肉眼分類、cTNM、cStage、組織学的悪性度（Grade）、浸潤様式（YK 分類）、脈管侵襲（リンパ管侵襲：Ly、静脈侵襲：V）および神経周囲浸潤（Pn））について検索をした。また光学顕微鏡下で腫瘍深達度（Depth of Invasion：DOI）の測定を行った。さらに頸部リンパ節転移の予測因子として考えられる因子について免疫組織化学的染色を行った。

腫瘍間質の脈管密度の測定を行い、リンパ管は Podoplanin で染色したスライドを観察し、血管は CD34 で染色したスライドを観察した。腫瘍浸潤先端部のホットスポットを光学顕微鏡 20 倍で観察し、2 視野選定した。画像ソフト Image J（NIH, Bethesda, MD）を使用し定量化した。Podoplanin 陽性のリンパ管、CD34 陽性の血管の内腔領域と腫瘍間質領域に分割し、手動トレースで二値化した。それぞれの画像を腫瘍間質の面積に対するリンパ管・血管面積の割合を脈管密度とし、2 視野の平均値を比較した。次に腫瘍細胞の評価を行った。Actin, Cytokeratin（AE1/AE3）、E-cadherin, Ki-67（MIB-1）および SOX2 で染色した各スライドを光学顕微鏡 20 倍で観察し、染色状態を判定をした。Actin は腫瘍陽性細胞が全く認められないものを 0、認めたものを 1 とした。Cytokeratin では簇出（腫瘍浸潤先端部間質に存在する単個または 5 個未満の腫瘍細胞からなる癌胞巣）を大腸癌取扱い規約に準じ 3 段階（Grade1 0~4 個、Grade2 5~9 個、Grade3 10 個以上）にグレード分けをした。E-cadherin は腫瘍陽性細胞が腫瘍全体の 25%未満のものを 0、25%以上のものを 1 とした。Ki-67 は腫瘍陽性細胞をカウントし、腫瘍細胞の総数に対する Ki-67 陽性細胞の割合を計算した。2 視野の平均値を Ki-67 陽性率とした。SOX2 は腫瘍陽性細胞が全く認められないものを 0、認めたものを 1 とした。

続いて統計学的検索を行った。DOI、脈管密度、および Ki-67 陽性率について、Mann-Whitney U 検定を用いて比較検討を行った。次に肉眼分類、Grade、YK、budding および SOX2、E-Cadherin、Actin と頸部リンパ節転移の有無の相関について Cramér の連関係数を求めた。さらに有意性の示された DOI および Ki-67 陽性率ならびに関連の強かった肉眼分類、E-cadherin を説明変数とし、頸部リンパ節転移を独立変数とした多変量解析（拡張型数量化 II 類）を行い、リンパ節転移群と非転移群に影響をおよぼす因子について検討した。統計学的有意水準は 5%未満とした。統計処理は、SPSS Statistics 20.0（IBM, Tokyo, Japan）およびマルチ変量ソフトウェア（アイスタット, Tokyo, Japan）を使用した。

結果は、対象症例の性別は転移群では男性 4 例、女性 3 例、非転移群では男性 4 例、女性 2 例であった。年齢は、転移群では 56 歳~74 歳（平均  $68 \pm 6.6$  歳）、非転移群では 52 歳から 71 歳（平均  $62.5 \pm 6.3$  歳）であった。占拠部位は、転移群では舌縁 6 例、舌下 1 例、非転移群では舌縁 5 例、舌下 1 例であった。腫瘍の大きさは、転移群では長径 14~40mm（平均  $24.1 \pm 10.0$ mm）、短径 10~30mm（平均  $18.4 \pm 6.5$ mm）、非転移群では長径 10~50mm（平均  $24.5 \pm 13.7$ mm）、短径 10~30mm（平均  $16 \pm 8.0$ mm）であった。肉眼分類は、転移群では表在型 2 例、外向型 1 例、内向型 4 例、非転移群では表在型 1 例、外向型 3 例、内向型 2 例で

あった。浸潤先端部の Grade は転移群では G1 2 例, G2 3 例, G3 2 例, 非転移群では G1 5 例, G2 1 例であった。YK 分類は転移群では YK-3 4 例, YK-4C 3 例, 非転移群では YK-3 5 例, YK-4C 1 例であった。リンパ管侵襲は転移群では Ly0 1 例, Ly1 4 例, Ly2 2 例, 非転移群では Ly0 6 例であった。静脈侵襲は転移群では V0 4 例, V1 1 例, V2 2 例, 非転移群では V0 5 例, V1 1 例であった。神経周囲浸潤は転移群では Pn0 6 例, Pn2 1 例, 非転移群では Pn0 6 例であった。さらに DOI は転移群では 2.9~16.0mm (平均 7.7±4.5mm), 非転移群では 1.5~5.3mm (平均 3.6±1.5mm) であった。

リンパ管密度は平均値が転移群で 5.9±1.8%, 非転移群で 3.0±1.8% であった。血管密度は平均値が転移群で 15.3±5.1%, 非転移群で 9.2±5.2% であった。Actin 陽性腫瘍細胞は, 転移群では 0 が 1 例, 1 が 6 例, 非転移群では 0 が 4 例, 1 が 2 例であった。budding は転移群では Grade2 3 例, Grade3 4 例, 非転移群では Grade1 5 例, Grade3 1 例であった。E-cadherin 陽性腫瘍細胞は, 転移群では 0 が 4 例, 1 が 3 例, 非転移群では 0 が 1 例, 1 が 5 例であった。Ki-67 陽性率は転移群で 30.8±12.7%, 非転移群で 13.8±5.0% であった。SOX2 陽性腫瘍細胞は転移群では 1 が 7 例, 非転移群で 0 が 4 例, 1 が 2 例であった。

DOI (P=0.035), リンパ管密度 (P=0.003), Ki-67 陽性率 (P=0.035) の 3 因子に有意差を認めた。脈管密度 (P=0.051) は有意差を認めなかった。

相関の高い順に budding (V=0.87), SOX2 (V=0.85), 組織学的 Grade (V=0.55), Actin (V=0.54), E-Cadherin (V=0.41), 臨床型 (V=0.39), YK 分類 (V=0.28) であった。

拡張型数量化 II 類より判別に及ぼす影響を検討した結果, Ki-67, E-Cadherin, DOI, 肉眼分類の順に頸部リンパ節転移への寄与を認めた。相関比は 0.745 と高く, 判別的中率は 100% となった。

本研究では計測可能な DOI, 脈管密度, リンパ管密度, Ki-67 陽性率について判別分析を行った。DOI については平均値を見るとリンパ節転移群 7.7±4.2mm, 非転移群 3.6±1.4mm であり, DOI 4mm 以上の N0 口腔癌について予防的頸部郭清を考慮されており, 4 mm 以上でリンパ節転移の可能性を示唆するものであり, 本研究でもその可能性が示唆された。血管密度はリンパ節転移の有無に有意差を認めなかったが, リンパ管密度では有意差を認めた。Ki-67 は腫瘍細胞の増殖能を評価するのに適しており, 本研究において腫瘍浸潤先端部の Ki-67 陽性率はリンパ節転移群で有意に高値を示して, 関連性の高さが示唆された。その他の関連因子を数量化し比較した結果, 腫瘍浸潤先端部の budding が最も相関が高かった。固形癌のリンパ節転移の初期段階を評価しており, 上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition : EMT) の途上の腫瘍細胞をみているものと考えられ, リンパ節転移との強い相関を示した。SOX2 は幹細胞マーカーの一つで多分化能を維持するために重要な因子であり, 悪性組織の細胞に発現していることが発見されている。本研究で SOX2 は budding と同程度のリンパ節転移との強い相関を認めた。平滑筋マーカーである Actin は上皮内病変 (SIL) が SCC への形質転換に関連していることが示唆されており, 腫瘍細胞がアクチン繊維を中心構造とする浸潤突起を形成し細胞外基質を破壊し, 浸潤・転移することが明らかになっている。本研究でも Actin と頸部リンパ節転移に相関を認める結果となった。本研究では相関はやや弱かったが E-Cadherin は, 上皮細胞間の結合や組織の形態維持に深く関与しており EMT に関連する因子と考えられる。E-Cadherin と DOI, Ki-67 陽性率および肉眼分類について頸部リンパ節転移との関係性を検索した結果, いずれも寄与を認めた。

本研究では舌 SCC の腫瘍浸潤先端部の生物学的特性に注目しリンパ節転移関連因子の検索を行った。他領域 SCC と同様, budding や SOX2 はリンパ節転移や予後予測に有用であるように, 舌でも関連性が高かった。また肉眼所見が内向型, DOI が 4mm 以上で, 腫瘍細胞が増殖能を有し, EMT が促進している症例はリンパ節転移の可能性が高いことが示唆された。以上のことより, budding, SOX2, 肉眼分類, DOI, Ki-67 および E-cadherin は, 頸部リンパ節転移の予後を予測する因子として有用であると考えられる。