

氏 名	はせがわ とも のり 長谷川 智 則
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第785号
学位授与の日付	令和3年3月3日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項 (口腔外科学)
学位論文題目	Oral squamous cell carcinoma may originate from bone marrow-derived stem cells (口腔扁平上皮癌は骨髄由来幹細胞から発生しうる)
論文審査委員	(主査) 教授 三 谷 絹 子 (副査) 教授 吉 原 重 美 教授 菱 沼 昭

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 【背 景】

最近の再生医学の進歩により、多くの体細胞性幹細胞が同定され、従来考えられていた幹細胞の明確な区別はなくなりつつある。肝細胞や血管内皮細胞の幹細胞は骨髄由来で循環血液中に存在することが証明され、骨髄由来細胞から胃がんが発生しうることも証明された。見かけの像や少数の遺伝子異常にとらわれない本質的な癌悪性度の診断方法を確立する試みを続けており、その過程で、口腔扁平上皮癌（oral squamous cell carcinoma：OSCC）の発生母細胞は少なくとも3種類存在し、①上皮幹細胞、②唾液腺と共通の口腔組織幹細胞、③骨髄幹細胞であり、未分化な母細胞由来の癌ほど生物学的悪性度が高いであろうという仮説を立て研究を進めている。

#### 【目 的】

本研究は、異性間造血幹細胞移植後に発症したOSCCや口腔潜在的悪性疾患症例（oral potentially malignant disorder：OPMD）を蓄積し、免疫染色や遺伝子発現解析を行うことで、生物学的悪性度と予後を解析することにより、発生母細胞を同定することが治療方針の決定に有用か否かを検討することを目的とする。さらに、骨髄由来幹細胞から発生したと考えられたOSCC症例と通常の口腔上皮幹細胞から発生したOSCC症例の遺伝子発現のパターンをマイクロアレイで解析し、骨髄由来幹細胞と考えられるOSCCで発現が高い遺伝子群でクラスタリングが可能か否かを検索し、発現遺伝子の種類によって治療法選択のマーカーとなりうるか検討した。

## 【対象と方法】

本研究の施行においては、患者からインフォームド・コンセントを取得し、獨協医科大学生命倫理審査委員会（生命倫理申請番号：R-25-16J）および愛媛大学臨床研究倫理審査委員会（生命倫理申請番号：2007024）の承認を得て指針に従って行った。方法は以下の1、2）の通りである。

### 1）性染色体の解析により発生母細胞の推定を行った症例

異性間での造血幹細胞移植後に口腔粘膜移植片体宿主病（graft versus host disease：GVHD）を生じ、のちにOSCCが発生した6例およびOPMD3例の性染色体解析（fluorescence in situ hybridization [FISH]とGバンド染色）を行った。また、コントロール群として移植を行っていないOSCC1例および口唇正常粘膜2例のFISHを行った。

### 2）マイクロアレイ解析に用いた症例

OSCC14例（異性間造血幹細胞移植後、骨髓由来幹細胞から発生した2例、通常の口腔上皮幹細胞から発生した12例）の遺伝子発現のパターンをマイクロアレイで解析を行い、ドナー由来と考えられた症例で発現量が3倍以上の遺伝子でクラスタリングを行った。

データ分析はBenjamini-Hochberg法を使用したt検定を用いて、 $P < 0.05$ を有意とした。

## 【結 果】

FISHにてOSCC6例中3例（男性）は、X onlyの占める割合がY containedよりも高く、ドナー由来が示唆された。これら3症例のうち2症例は遠隔転移を示し予後不良であった。移植を行っていない症例（男性）でもX onlyが13%認められた。移植を行った女性で、扁平苔癬様病変からY containedが10.7%認められた。なお、移植を行っていない男性正常口唇粘膜のY containedは99.1%、100%であった。マイクロダイセクションPCRによる口腔癌組織におけるXY染色体分析では、Xパターン優位でドナー由来の細胞と考えられた。

FISH性染色体解析でドナー骨髓幹細胞由来であると考えられた2症例（3サンプル）と、移植後の発癌であるがレシピエント由来口腔扁平上皮癌と考えられた症例の遺伝子発現パターンを比較したところ、明らかに発現パターンが異なっていた。ドナー由来と考えられた3サンプルで発現量が3倍以上異なっていた遺伝子を用いて、別コホートの通常発癌12症例（13サンプル）（移植後発癌でない症例）でクラスタリングを行ったところ、ドナー骨髓幹細胞由来であると考えられた2症例（3サンプル）と同じクラスターに含まれた症例が2症例あり、2症例とも生物学的悪性度が高く、予後が極めて不良であった。

## 【考 察】

造血幹細胞移植を行った症例は少なからず、骨髓由来幹細胞で口腔粘膜上皮が修復されており、その細胞が癌化し、OSCCが発生することが示唆された。

ドナー骨髓由来幹細胞由来と考えられた3症例中2例は、上部消化管に多発癌を発症しており、この領域に慢性GVHDが発生し、遺伝子的に脆弱な幹細胞で上皮が修復されている部位があり、フィールドキャンサーライゼーションによる発癌と考えられた。また、より未分化な幹細胞より発生した扁平上皮癌は、体性幹細胞の特性（ステムネス：周囲組織への侵入能、血管内や異所環境での生存能と適

応能、自己複製能など)をより強く保持しており、結果として生物学的悪性度が高く、臨床的には予後不良になりうるということが考えられた。

これまでは、口腔癌においては、発生母細胞が異なる癌をひとくくりにして診断を行い、同一のプロトコールで治療を行っていた。OSCCにおいても、粘膜重層扁平上皮由来癌、唾液腺由来癌、骨髄幹細胞由来癌が存在していると考えられ、それらを識別できる遺伝子候補が同定できれば、OSCCを生物学的に悪性度が異なる3つのカテゴリーに分類することができる。その診断に基づき、より良い予後が期待できる治療方針が決定できる。現在の臓器腫瘍、組織腫瘍という考え方に基づいた診断・治療態度を、発生母細胞別(発生体細胞性幹細胞別)腫瘍という概念で診断・治療をするという態度に変える、パラダイムシフトが可能であると考えている。

#### 【結 論】

OSCCは骨髄由来幹細胞から発生しうることが示唆された。

### 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

#### 【論文概要】

癌診断において、見かけの像や少数の遺伝子異常にとらわれない本質的な悪性度の診断方法を確立する試みを続けており、その過程で、口腔扁平上皮癌(oral squamous cell carcinoma: OSCC)の発生母細胞は少なくとも3種類存在し、①上皮幹細胞、②唾液腺と共通の口腔組織幹細胞、③骨髄幹細胞があり、未分化な母細胞由来の癌ほど生物学的悪性度が高いであろうという仮説を立て研究を進めている。申請論文では、OSCCが骨髄由来幹細胞から発生しうるか、骨髄由来幹細胞から発生したOSCCの予後は不良であるかを解析することを目的として、異性間での造血幹細胞移植後に発生した扁平苔癬様病変、OSCCの性染色体解析(fluorescence in situ hybridization: FISH、マイクロダイセクションPCR)を行い、未治療のOSCC(造血幹細胞移植後に発生したOSCCを含む)のマイクロアレイによる全遺伝子発現検索を行い、造血幹細胞移植後に発生したOSCCにおける発現パターンを同定し、クラスタリングを行い、予後を検討している。結果、性染色体解析よりドナー由来の骨髄由来幹細胞よりOSCCが発生しうること、マイクロアレイにて骨髄由来幹細胞から発生したOSCCと移植を行っていないOSCCでは遺伝子発現パターンが異なることが明らかになった。同定した遺伝子にてクラスタリングを行うと移植を行っていないOSCCも骨髄由来幹細胞のクラスターに含まれるものが2症例同定された。症例数が少なく、統計学的な検討はできなかったが、骨髄由来幹細胞から発生したと考えられたOSCCの予後は不良であったことを明らかにしている。これらの結果からOSCCは骨髄由来幹細胞から発生しうるということが示され、予後が不良である可能性がある結論づけている。

#### 【研究方法の妥当性】

申請論文では、獨協医科大学病院および愛媛大学にて異性間の造血幹細胞移植後に発生したOSCC、あるいは扁平苔癬様病変に対し、性染色体解析を行い、移植を行っていないOSCCを加えて、マイクロアレイによるクラスタリングを行い、予後を検討している。対象設定、性染色体解析の評価方法、マイクロアレイの方法およびクラスタリングの評価方法はいずれも妥当である。さらに、

申請者は人を対象とした研究の倫理性についてもよく理解しており、複数の施設において適切な倫理申請し、それに従った患者からのインフォームドコンセントも適切に取得して研究を行っている。患者情報の記録、保管についても適切になされている。

#### **【研究結果の新奇性・独創性】**

申請者らのグループは世界に先駆けて、本研究における仮説を提唱し長年検証を進めている。口腔領域で骨髄由来幹細胞からOSCCが発生する報告は少なく、申請論文では、豊富な症例を用いて、骨髄由来幹細胞からOSCCが発生しうることを明らかにしている。より未分化な幹細胞から発生したOSCCは予後が不良である可能性に着目し、臨床的な意義も証明したことにおいても、新奇性・独創性に優れた研究と評価できる。

#### **【結論の妥当性】**

申請論文では、適切な対象群の設定の下、確立された実験手法を用いて、骨髄由来幹細胞から口腔扁平上皮癌が発生することを明らかにしている。結果の解釈も適切であり、それより導かれる結論は論理的に矛盾するものではなく、関連領域における知見を踏まえても妥当なものである。

#### **【当該分野における位置付け】**

申請論文では、骨髄由来幹細胞からOSCCが発生する可能性があることを証明し、予後が極めて不良であることを検証している。口腔癌診断、治療方法の選択においても極めて重要な情報を与えることになり、患者の予後改善も大いに期待できる。その点においても、申請論文は大変意義深い研究と評価できる。

#### **【申請者の研究能力】**

申請者は、口腔癌の診断治療の経験に基づいて、口腔癌の分子メカニズム、体性幹細胞や発生母細胞に関する知識を得たうえで、作業仮説を立て、それを証明できる研究計画を立案した後、適切に本研究を遂行し、貴重な知見を得ている。その研究結果は当該領域の国際誌へ掲載されており、申請者の研究能力は高いと評価できる。さらに、本研究で得られた結果、結論を基に次の研究への新たな仮説、それを証明するための方法についての検討も行っており、継続性という観点からも研究能力は高いと考える。

#### **【学位授与の可否】**

本論文は独創的で質の高い研究内容を有しており、当該分野における貢献度も高い。よって、申請者は、博士（医学）の学位授与に相応しいと判定した。

#### **（主論文公表誌）**

Oncology Letters

(21 : 170, 2021)