

氏 名 ・ (本籍)	木藤 正彦 (秋田県)
専攻分野の名称	博士 (医学)
学 位 記 番 号	医博甲第 918 号
学位授与の日付	平成 28 年 9 月 27 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	医学系研究科医学専攻
学 位 論 文 題 名	Expression of cell competition markers at the interface between p53 signature and normal epithelium in the human fallopian tube (p53 signature とヒト正常卵管上皮細胞の境界面における 細胞競合マーカーの発現)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教授 柴田 浩行 (副査) 教授 大森 泰文 教授 本山 悟

学 位 論 文 内 容 要 旨

論 文 題 目 : **Expression of cell competition markers at the interface between p53 signature and normal epithelium in the human fallopian tube**
(論文題目の和訳) : **p53 signature** とヒト正常卵管上皮細胞との境界面における細胞競合マーカーの発現

申請者氏名 木藤 正彦

研 究 目 的

1970年代にショウジョウバエを用いた実験により、変異細胞と隣接する正常上皮細胞が互いの生存競争のために競合しあう現象が観察されることが報告され、これは細胞競合(現象)と呼ばれており、現在、様々な分子生物学的手法によりこの現象の検証がなされている。近年では上皮における発癌の超早期段階にこの概念が導入され、周囲正常細胞が癌細胞を排除するような細胞競合現象を癌抑制機能として捉えられ、2010年にはRas変異細胞やSrc変異細胞を用いた検証により、周囲正常細胞の変異細胞側におけるビメンチンやフィラミンの発現亢進が報告されている。これらの報告は癌研究にとって新たな視点を与える有用なものであると考えられるが、ヒトの組織内で実際に観察される現象であるかの検証はいまだなされていない。

我々はこれらの細胞競合マーカーとすべきビメンチンやフィラミン A の発現亢進がヒトの組織内で実際に観察されるかどうかの検証を目的として、卵巣漿液性腺癌の前駆病変と推測されている、ヒト卵管上皮に観察される p53 signature や卵管漿液性上皮内病変(STIL)に注目した。p53 signature は異型を示さない卵管上皮細胞として観察される、12個以上のp53変異細胞列と定義され、STILはこれより腫瘍に近いp53陽性上皮内病変とされている。これらは免疫組織学的に同定可能であり、また発癌の超早期段階モデルと考えるため、これらの卵管病変を用いて細胞競合現象の検証を行った。

研 究 方 法

2014年から2015年の間に本学附属病院産婦人科にて婦人科疾患のため卵管を含んだ組織摘出術が施行された約100症例に対して、卵管全割全包埋に準じて切出を行い、既報の卵管早期病変の診断アルゴリズムに従ってHE染色やp53、Ki-67などの免疫組織化学染色を施行した。その過程で同定された17ヶ所のp53 signature、4ヶ所のSTILを対象に細胞競合マーカー発現の検討を行った。具体的にはビメンチン、フィラミンの免疫組織化学を施行した。また、2014年に卵管発

癌モデルマウス(mogp-Tag mouse)が報告されており、このマウスの卵管早期病変に対する検討もおこなっている。

細胞競合マーカーの発現を観察するため、各々のヒト卵管早期病変に対し、免疫組織学的蛍光二重染色を施行した。観察は共焦点顕微鏡を使用し、得られた各画像の細胞接合面における細胞競合マーカーの最高発現強度を測定した。測定の対象は、p53変異細胞と非変異細胞間、また背景に観察される非変異細胞同士の間接合面とし、背景におけるマーカーの発現強度の平均値から、細胞競合面とすべき細胞接合面の発現強度を相対的に算出した。次に、各画像から得られたマーカーの相対的な発現強度を統計的に解析した。

研 究 成 績

免疫組織学的に、各卵管早期病変を含んだ上皮細胞において、ビメンチンの発現は観察されたが、フィラミンの発現はほぼ観察されなかったため、p53、ビメンチンを蛍光二重染色の対象とした。

p53 signature において明瞭に観察された非変異細胞との接合面は48個、STILの接合面は8個あった。得られた各画像における、背景の非変異上皮細胞間の平均個数はp53 signature では26.0個、STILでは20.2個であった。各接合面と、その背景にみられる非変異細胞間の接合面におけるビメンチン強度を測定し統計処理、p53 signature における非変異細胞との接合面での相対的なビメンチン発現強度は1.076(95%信頼区間0.9412-1.211)、STILでは0.9790(95%信頼区間0.7206-1.237)であった。

mogp-Tag マウスの卵管病変については、p53変異細胞においてKi-67の発現上昇が観察され、ヒトにおけるSTIL相当の病変と考えられた。ビメンチン、フィラミンの発現についても観察したが、卵管上皮組織における発現は部分的であった。

結 論

本研究では卵巣癌における前駆病変とされるp53 signature やSTILを対象として、p53異常を示す病変部の細胞と正常細胞との境界部における細胞競合マーカーの発現を検討したが、背景の正常卵管上皮細胞間の発現と比較して有意な強度の上昇は見られなかった。すなわち、ヒト病理組織検体において細胞競合現象の実証ができなかった。しかし、これは対象とした病変がp53異常を示す病変であって、既報にあるようなSrc異常病変やRas異常病変ではなかったためかもしれない。また、ホルマリン固定による影響で、生体内で起きている細胞競合現象を再現できなかった可能性もある。

学位（博士一甲）論文審査結果の要旨

主 査：柴田浩行

申請者：木藤正彦

論文題名：Expression of cell competition markers at the interface between p53 signature and normal epithelium in the human fallopian tube（p53 signature とヒト正常卵管上皮細胞との境界面における細胞競合マーカーの発現）

要旨

近年、変異細胞と正常上皮細胞とが生存競争を行う「細胞競合現象」は発癌の超早期にも見られ、癌細胞を生体から排除する癌抑制機能であると理解されている。In vitro の実験系で Ras や Src 癌遺伝子に変異のある癌細胞周囲の正常細胞においてはビメンチンやフィラミンといった中間径線維蛋白質やアクチン結合蛋白質の発現が増加している。特にビメンチンの発現誘導は、この「細胞競合現象」に必須であるとされている。本研究では「細胞競合現象」がヒトの臨床的な腫瘍においても起きているかを確認する目的で手術的に切除された卵管を用いてビメンチンによる「細胞競合現象」を分子病理学的に解析した。

秋田大学婦人科において手術により卵管を含む組織摘出を受けた 100 例の患者に由来する卵管全割全埋標本を用いて調査を行った。12 個以上の変異 p53 を有する上皮細胞の列からなる p53 signature と呼ばれる病変は、ごく早期の卵巣癌の前癌病変であると考えられている。また、卵管漿液性上皮内病変（STIL）はさらに進んだ状態の病変である。100 例の検体のうち、17 カ所から p53 signature が見出され、4 カ所に STIL が見出された。

この p53 signature や STIL と、その周辺の正常細胞との境界面においてビメンチンやフィラミンの発現を調査した。臨床検体ではフィラミンの発現は観察されなかったが、ビメンチンの発現が確認された。p53 signature と正常細胞との境界面と正常細胞間の境界面におけるビメンチンの相対発現強度は 1.07（95%信頼区間：0.9412 - 1.211）であった。また、STIL の場合は、正常細胞間のビメンチンの相対発現強度は 0.979（95%信頼区間：0.7206 - 1.237）であった。さらに、卵管癌モデルマウスを用いた実験からは STIL 相当病変と正常細胞との境界面ではビメンチンやフィラミンの発現は部分的にしか認められなかった。卵管癌の早期病変の p53 signature や STIL においてはビメンチンが関与する「細胞競合現象」は認められなかった。

1) 研究の斬新性

ショウジョウバエや *in vitro* の細胞実験で示されている「細胞競合」という現象は生体から特定の細胞群を駆逐するメカニズムであるが、これが実際のヒトの癌で起きているのか？この検証を試みたという点は極めてユニークである。生体では、かなりの頻度で癌細胞が誕生している。しかし、それらは主として免疫担当細胞で除去されていると考えられているが、本当にそれだけだろうか？本研究は免疫担当細胞以外の癌からの防衛システムについて検討したという点において十分な斬新性が認められる。

2) 研究の重要性

本研究は卵管癌の極早期における「細胞競合」をビメンチンの発現から解析しようと試みた。結果はネガティブであったが、卵管癌の極早期における「細胞競合」はビメンチン非依存性である可能性が示唆された。また、p53 signature というような極早期がんが意外に高頻度に認められることも同時に明らかになった。しかし、ヒトの検体で、経時的な観察が必要な「細胞競合」や駆逐される癌細胞のような対象を追うのは極めて難しい。そこに敢えて挑戦したことは高く評価される。

3) 研究方法の正確性

本研究では各種抗体を用いた免疫組織化学で多数の臨床検体を解析している。また、卵管癌マウスモデルを用いた実験、データの統計学的処理などは正確に行われたと評価される。また、臨床検体の解析はガイドラインや倫理指針に則って実施された。

4) 論旨の明瞭性

本論文「Expression of cell competition markers at the interface between p53 signature and normal epithelium in the human fallopian tube」は論旨に矛盾や錯誤、また結果解釈の誇張はなく、データに沿って明瞭に記載されている。本論文は PlosONE 誌に投稿、受理されるなど外部査読においても十分な評価を得ている。

以上の観点から、本論文は学位を授与するに十分な条件を備えているものと判定された。