

氏名	藤井 昌江	
学位	博士	
専門分野の名称	歯学	
学位授与番号	博甲第4517号	
学位授与の日付	平成24年3月23日	
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻 (学位規則(文部省令)第4条第1項該当)	
学位論文題目	Dickkopf (Dkk)-3 and $\beta$ -catenin expressions increased in the transition from normal oral mucosal to oral squamous cell carcinoma 「口腔粘膜上皮の癌化過程における Dkk-3 と $\beta$ -catenin 発現増加と局在変化」	
学位論文審査委員	教授 滝川 正春	教授 長塚 仁
	教授 浅海 淳一	

### 学位論文内容の要旨

#### 【目的】

口腔扁平上皮癌におけるヘテロ接合性消失 (LOH) 解析から、重要な癌関連遺伝子として Dkk-3 が注目された。Dkk-3 は分泌型タンパクをコードし、細胞の癌化に関与する Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルを負に制御する癌抑制遺伝子として機能すると考えられている。

しかし LOH 解析と臨床データとの相関からは、Dkk-3 が口腔扁平上皮癌では癌抑制遺伝子としての機能を有すると同時に、リンパ節転移を促進する可能性も示唆されており、その役割については不明な点が多い。

そこで本研究では、口腔扁平上皮癌および上皮異形成における Dkk-3 タンパクの局在を免疫組織化学的に観察し、Dkk-3 の発癌における役割について検討した。

#### 【方法】

口腔扁平上皮癌組織 65 症例 (高分化型 42 例、中分化-低分化型 18 例、上皮内癌 5 例)、正常口腔粘膜上皮 20 例、軽度上皮異形成 19 例、中等度-高度上皮異形成 15 例を用いた。組織は 10% 中性緩衝ホルマリンにて固定後、常法に従いパラフィン包埋を行った。パラフィン包埋後の組織は 4 $\mu$ m に薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色および、Dkk-3 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) および Wnt シグナルのターゲットである  $\beta$ -catenin (DAKO, Carpinteria, CA, USA) また、細胞増殖のマーカーとして Ki-67 (DAKO, Carpinteria, CA, USA) について免疫組織化学的染色を施した。

Dkk-3 の免疫組織化学染色の評価は、標本を対物 40 倍で鏡検し、ランダムに 5 視野、1 視野あたり細胞 200 個ずつカウントし、その陽性細胞数を平均%で表した。Dkk-3 陽性例では局在を細胞膜と細胞質に分けて評価し、細胞膜に線状の局在を示す症例を細胞膜陽性、細胞膜に加えて細胞質にも局在が認められる症例を細胞質陽性と表現した。

関連するシグナル分子である  $\beta$ -catenin についても同様に評価した。細胞増殖マーカーである Ki-67 については陽性細胞率を%で算出した。

#### 【結果】

正常口腔粘膜上皮における Dkk-3 の局在は、傍基底細胞層から棘細胞層の細胞膜が陽性であり、基底細胞には陽性像は認められなかった。軽度上皮異形成、中等度-高度上皮異形成では、棘細胞層の深部から中間層にまで陽性像が認められ、異形成の程度が上昇するに従い細胞膜陽性の領域が増加した。また、正常部では陰性であった基底細胞の細胞質が陽性であった。

上皮内癌や扁平上皮癌（高分化型・低分化型）では細胞膜の陽性所見は減少し、細胞質が陽性になる傾向を認めた。扁平上皮癌全体での Dkk-3 陽性例は 89.2% (58/65 例)、陰性例は 10.8% (7/65 例) であった。Dkk-3 の局在は、高分化型扁平上皮癌では癌巣の辺縁に位置する基底細胞様細胞から棘細胞様細胞の細胞膜および細胞質内に認められた。特に浸潤先端部で Dkk-3 陽性細胞が多い傾向を認めた。低分化型では高分化型同様に基底細胞様細胞に Dkk-3 陽性像を認め、浸潤先端部で陽性細胞が多かった。

$\beta$ -catenin は、正常粘膜上皮では基底細胞から棘細胞の細胞質が陽性であった。上皮異形成では、異形成の程度が上昇するに従い細胞膜陽性の領域が増加し、癌では細胞質が陽性を示し、Dkk-3 と類似した傾向を示した。Ki-67 陽性率は上皮異形成の程度に比例して陽性率が増加し、癌でさらに高値を示した。

#### 【考察】

Dkk-3 タンパク発現は、正常口腔粘膜上皮、上皮異形成、上皮内癌、扁平上皮癌のいずれにおいても認められた。Dkk-3 は、正常粘膜上皮では細胞膜に局在するが、上皮内癌、浸潤癌では細胞質へとその局在が変化した。口腔扁平上皮では、Dkk-3 の発現が癌化の進行とともに増加し、その局在が細胞膜から細胞質に変化することから、その詳細な機能は不明であるものの、Dkk-3 が発癌に重要である可能性が考えられた。

これまでの腺癌、皮膚や肺の扁平上皮癌についての報告では Dkk-3 の発現は癌化に伴い減弱または陰性化するとされていたが、本研究の結果では、癌化に伴い Dkk-3 の発現が増加し、Dkk-3 の役割が腺癌や他臓器の扁平上皮癌と異なる可能性が示され、口腔扁平上皮癌の特異性が示唆された。

$\beta$ -catenin は、正常粘膜上皮では Dkk-3 陰性であった基底細胞の細胞質が陽性である以外は Dkk-3 と同様の局在を示し、癌では細胞質が陽性となるのも Dkk-3 と同様であった。癌において Dkk-3 と  $\beta$ -catenin が細胞質内に共に発現していることは、Dkk-3 による Wnt/ $\beta$ -catenin 経路の抑制に異常が生じ、発癌に関連した可能性が示唆された。

## 学位論文審査結果の要旨

Dkk-3 は癌抑制遺伝子とされ、細胞の癌化に関与する Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルを抑制することが知られている。Dkk-3 は消化管腺癌、前立腺癌などでは癌化に伴いその発現が減弱することが報告されている。しかし、口腔扁平上皮癌ではその局在について不明である。本研究では、口腔扁平上皮癌および上皮異形成における Dkk-3 の局在を免疫組織化学的に観察し、Dkk-3 の発癌における役割について検討した。

口腔扁平上皮癌 65 症例（高分化型 42 例、中分化-低分化型 18 例、上皮内癌 5 例）、正常口腔粘膜上皮 20 例、軽度上皮異形成 19 例、中等度-高度上皮異形成 15 例を用い、Dkk-3 および Wnt シグナルのターゲットである  $\beta$ -catenin、細胞増殖のマーカーとして Ki-67 について免疫組織化学的染色を施した。Dkk-3 と  $\beta$ -catenin 陽性例では局在を細胞膜と細胞質に分けて評価した。

Dkk-3 は、正常口腔粘膜上皮では傍基底細胞層から棘細胞層の細胞膜が陽性であった。上皮異形成では細胞膜陽性の領域が増加し、棘細胞層の深部から中間層にまで陽性像が認められた。上皮内癌や扁平上皮癌では細胞膜陽性は減少し、細胞質が陽性になる傾向を認めた。口腔扁平上皮癌では、Dkk-3 は癌巣の基底細胞様細胞から棘細胞様細胞の細胞膜および細胞質内に局在し、陽性例は 89.2% (58/65 例)、陰性例は 10.8% (7/65 例) であった。 $\beta$ -catenin は Dkk-3 と類似した局在を示し、Ki-67 陽性率は、上皮異形成の程度に比例して上昇し、癌でさらに上昇した。

口腔粘膜上皮の癌化過程において Dkk-3 と  $\beta$ -catenin との発現増加と局在変化が示され、Dkk-3 による Wnt/ $\beta$ -catenin 経路の抑制に異常が生じている可能性が示唆された。このことから、詳細な機能は不明であるものの、Dkk-3 が発癌に重要な役割を果たす可能性が考えられた。

以上に基づき、審査委員会は本申請論文に博士(歯学)の学位論文としての価値があるものと認めた。