

別記様式第6号（第16条第3項，第25条第3項関係）

## 論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（歯学）		氏名	林 靖也
学位授与の条件	学位規則第4条第1・2項該当			
論文題目 口腔扁平上皮癌の臨床病態における human papilloma virus (HPV) 16 の関与				
論文審査担当者				
主査	教授	杉山 勝	印	
審査委員	教授	栗原 英見		
審査委員	准教授	虎谷 茂昭		
<p><b>【目的】</b></p> <p>口腔癌は、その組織型の80%以上が扁平上皮癌で、中高年の男性に好発し若年者では少ない。頭頸部癌の発症には、タバコやアルコールが関連していることがよく知られている。米国では、タバコ消費量の減少により、口腔癌、喉頭癌などの頭頸部癌の発生率は減少している。一方、タバコやアルコールへの暴露が少ない若年者、特に男性の中咽頭癌と女性の舌癌の頻度が増加している。Human papilloma virus (HPV) は、子宮頸癌や中咽頭癌においては強い関連性が報告されており、性感染症として位置付けられている。性行為により伝播する HPV の関与が疑われる頭頸部癌は、この16年で225%増加しているとの報告がある。一方、舌癌を含む口腔癌においては、HPV-DNA が数%の頻度で検出されているものの、発癌への関与はまだ明らかにされていない。</p> <p>HPV が上皮細胞に取り込まれ宿主細胞の DNA に組み込まれると、HPV 由来蛋白である E6 蛋白と E7 蛋白が高発現する。E6 蛋白は p53 遺伝子産物を、E7 蛋白は Rb 蛋白(pRb)をそれぞれ不活化することにより細胞の不死化、さらに癌化につながると考えられている。E7 蛋白が pRb と結合して、転写調節因子である E2F を遊離することで促進される細胞周期回転に対する負のフィードバックとして p16 が高発現する。HPV に関連した子宮頸癌や中咽頭癌では p16 の過剰発現が認められることから、p16 免疫染色性が HPV 関連腫瘍の代理マーカーとして用いられている。一方、口腔扁平上皮癌 (OSCC) においては p16 染色性が HPV-DNA の有無と一致しないことが報告され、p16 は HPV 関連腫瘍の代理マーカーとしては評価されていない。</p> <p>HPV の感染を生じてても多くの場合、HPV は上皮基底細胞内でエピゾームの状態で存在していることから、腫瘍細胞内の HPV-DNA の存在が必ずしも発癌に関与するとは限らないとされている。癌化するには、上皮基底細胞の DNA に HPV-DNA が integrate し、がん遺伝子である E6 と E7 が高発現することが必要とされている。従って、E6 や E7 の mRNA あるいは蛋白の発現を検出することは、HPV の感染のみならず発癌への関与が確実に評価できる方法であると考えられる。</p> <p>本研究では、High-risk HPV のうち子宮頸癌や中咽頭癌で最も多く検出されている HPV16 と OSCC への感染、発癌への関与を明らかにすることを目的に以下の検討を行った。OSCC 由来 RNA を用いて HPV16 E6/E7 mRNA の発現を RT-PCR 法にて解析した。p16 免疫染色性と HPV16 E6/E7 mRNA の発現との関連について統計学的に検討した。さらに舌癌患者を対象に p16 の発現と臨床病態、細胞性免疫能の関連性を検討した。</p> <p><b>【対象と方法】</b></p> <p>1998年から2018年の20年間に、広島大学病院 顎・口腔外科を初診した舌癌156名と歯肉癌21名のホルマリン固定パラフィン包埋組織を用いて p16 蛋白の免疫染色を行った。使用した抗体はマウスモノクローナル抗 p16 抗体である。判定は、瀰漫性に細胞質が濃染された癌</p>				

細胞が70%以上の症例を陽性とした。

また、上記対象患者のうち、冷凍保存されていた初診時の生検材料や化学療法・放射線療法を受けていない37名の手術材料から抽出したRNAを用いてHPV16の遺伝子解析を行った。すなわちHPV16のE6とE7のエクソン領域に設定したプライマーを用いてE6/E7 mRNAの発現をRT-PCR法により検討した。PCR産物の遺伝子配列はサンガー法にて解析しHPV16の関与を確認した。さらにp16染色性とHPV16 E6/E7 mRNAの発現の関連を統計学的に検討した。

舌扁平上皮癌患者156名を対象にp16の免疫染色性と臨床病態との関連について統計学的に検討した。さらに、初診時に採取した末梢血を用いて免疫細胞サブセット解析およびNK活性測定を行い、p16発現との関連を検討した。

#### 【結果】

1. 舌癌156名の内、29名(18.6%)でp16の高発現が観察された。
2. OSCC37名の内、17例(45.9%)でHPV16 E6/E7 mRNAの発現を認めた。シーケンス解析でHPV16 E6/E7 mRNAと確認できた。
3. 舌癌において、p16発現とHPV16のE6/E7領域のmRNAの発現との間に関連性が認められた。
4. 舌癌の年齢別のp16陽性率は、40歳未満群の陽性率は47.4%で、40歳以上65歳未満の群(12.2%)および65歳以上の群(17.4%)と比較して有意に高値を示した。
5. 舌癌において、p16発現陽性群と陰性群間の生存率には有意な差を認めなかった。
6. 後方型の舌癌において、p16陽性率が高値を示した。性別、腫瘍の進展度、喫煙の状態、治療法においては、p16染色性との関連は認めなかった。
7. 免疫細胞サブセット解析の結果、舌癌p16陽性群においてhelper-inducer T細胞およびactivated T細胞の比率は、p16陰性群と比較し有意に低値を示した。

#### 【考察】

以上の結果から、OSCCにおいてHPV16 E6/E7 mRNAが確認できたことから、本腫瘍の発癌にもHPV16が関与している可能性が示唆された。口腔癌、特に舌癌におけるp16免疫染色性とHPV16 mRNAの発現との関連性が示された。また、若年者の舌癌においてp16陽性率が高いことから、HPV16の若年者の舌癌への関与が考えられた。

本論文は、口腔外科学をはじめ歯科医学の発展に寄与するところが大きいものと評価される。よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士(歯学)の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。

最終試験の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（歯学）	氏名	林 靖也
学位授与の条件	学位規則第4条第1・2項該当		
論文題目 口腔扁平上皮癌の臨床病態における human papilloma virus (HPV) 16 の関与			
最終試験担当者			
主査	教授	杉山 勝	印
審査委員	教授	栗原 英見	
審査委員	准教授	虎谷 茂昭	
〔最終試験の結果の要旨〕			
判定合格			
上記3名の審査委員会委員全員が出席のうえ、平成30年12月26日の広島大学研究科発表会（歯学）及び平成31年2月7日本委員会において最終試験を行い、主として次の試問を行った。			
<ol style="list-style-type: none"><li>1 HPVの種類とその特徴および発癌性について</li><li>2 舌癌の性差および年代別発症頻度などについて</li><li>3 舌癌における年代別での p16 の染色性の相違について</li><li>4 HPV感染と細胞性免疫能について</li><li>5 若年層で HPV16 陽性が多い理由</li><li>6 免疫組織染色と染色結果の評価における注意点について</li><li>7 本研究で使用した抗 p16 マウスモノクローナル抗体の特性について</li><li>8 スクリーニング検査における感度と特異度について</li></ol>			
これらに対して極めて適切な解答をなし、本委員会が本人の学位申請論文の内容及び関係事項に関する本人の学識について試験した結果、全員一致していずれも学位を授与するに必要な学識を有するものと認めた。			