

## 学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	執行寛
-------	----	----	-----

### 学位論文題目

#### **Inducible nitric oxide synthase expression in various laryngeal lesions in relation to carcinogenesis, angiogenesis, and patients' prognosis**

(邦題：様々な喉頭病変における誘導型一酸化窒素合成酵素の発現と癌化、血管新生、及び予後への関与)

共著者名

野中 聡、片田 彰博、坂東 伸幸、荻野 武、片山 昭公、高原 幹  
林 達哉、原渕 保明

(Acta Oto-Laryngologica, 2007; 127: 970-979 掲載)

#### I. 研究目的

誘導型一酸化窒素合成酵素 (induced Nitric Oxide Synthase: iNOS) の発現誘導に伴い過剰に生成された NO は生体自らの DNA を障害し、突然変異を誘発するなど、癌発生に強く関与すると考えられている。近年、大腸癌、胃癌などの固形癌において iNOS が癌細胞周囲の血管内皮細胞、癌細胞自体に過剰発現している報告例が散見され、悪性腫瘍の臨床像および予後などと iNOS 発現との関係が検討されている。しかし、頭頸部悪性腫瘍を対象とした検討はほとんどおこなわれていない。一方、腫瘍の増殖、進展には血管新生が必要不可欠であるが、この血管新生に関与する重要な因子として p53 癌抑制遺伝子や腫瘍細胞からも分泌される血管内皮増殖因子 (Vascular Endothelial Growth Factor : VEGF) があげられる。p53 癌抑制遺伝子は血管新生を強力に抑制し、同時に VEGF の発現も抑制するといわれている。さらに、p53 癌抑制遺伝子の別の機能として iNOS mRNA の転写抑制があるが、変異型 p53 はこの抑制作用を持たないため iNOS 誘導亢進に伴う過剰な NO 産生が恒常的に持続することが知られている。また NO は VEGF 発現の上流のシグナルであると推測され、腫瘍組織の血管新生を促進させることで腫瘍の増殖、進展を誘発することが示唆される。

したがって、腫瘍組織の血管新生には p53 癌抑制遺伝子、VEGF、および NO の相互が密接に関与する可能性が推測される。

本研究では様々な喉頭病変における iNOS の発現の有無を検討し、その癌化過程や血管新生においてどのように関与しているか免疫組織学的手法を用いて解析した。さらに臨床因子、予後との関係についても検討した。

## II. 材料・方法

### 1. 患者検体

1990 年から 2001 年までに旭川医大耳鼻咽喉科・頭頸部外科にて治療を行ない、追跡可能であった喉頭扁平上皮癌（喉頭 SCC 群）63 例（男性 58 例、女性 5 例、中央値 67 歳）を対象とした。原発部位別分類では声門上が 30 例（48%）、声門が（41%）、声門下が（11%）であった。TN 分類では T1 が 20 例（32%）、T2 が 29 例（46%）、T3 が 6 例（10%）、T4 が 8 例（12%）であり、N(-) が 47 例（75%）、N(+) が 16 例（25%）であった。治療方法は 63 例中 25 例（40%）に放射線単独療法を施行した。38 例（60%）は喉頭全摘術を行ない、N(+) の症例については頸部郭清術を合わせて施行した。全症例の平均観察期間は 31 か月（2-135 か月）であった。さらに 5 例の正常喉頭上皮、7 例の喉頭ポリープ、20 例の喉頭異形成（9 例が mild/moderately dysplasia、11 例が severe dysplasia）も本検討の対象とした。研究使用にあたっては患者より十分な説明をおこない同意を得た。

### 2. 免疫組織学的解析

治療前の生検時もしくは初期治療時に採取された組織のホルマリン固定パラフィン包埋切片を材料にして iNOS、p53、VEGF、及び血管新生の程度を表す微小血管密度（Micro Vessel Density : MVD）の指標として CD31 を免疫組織学的に検討した。まず脱パラフィン後、内因性ペルオキシダーゼのブロッキングを行った。次に iNOS、p53、VEGF、CD31 に対する抗体を 4℃で一晩反応させた。さらにペルオキシダーゼ標識ポリマーで反応させ、DAB にて発色した。免疫組織の結果判定は以下の基準にしたがった。iNOS は染色強度（200 倍で検鏡）をスコア 0:染色なし、スコア 1:弱陽性、スコア 2:中等度陽性、スコア 3:強陽性の 4 段階にスコア化し、さらに領域（40 倍で検鏡）をスコア 0:染色陽性なし、スコア 1:染色陽性の腫瘍細胞が 25%未満、スコア 2:25%以上 50%未満、スコア 3:50%以上 75%未満、スコア 4:75%以上の 5 段階に分類した。染色強度と領域の和を iNOS スコア（0-7）として算出し、iNOS スコア 3 以上を iNOS 発現陽性とした。p53 は腫瘍細胞の 10%以上の核が濃染し過剰発現していたものを陽性とした。VEGF は腫瘍細胞の 25%以上の細胞質が濃染し過剰発現していたものを陽性とした。MVD は 40 倍検鏡下で血管新生の最も盛んな部位を同定したのち、200 倍検鏡下で一視野中の微小血管数を算定した。これを各部位について 3 回行ない、その平均数を微小血管密度とした。

### 3. 統計解析

2 因子間の検定には Mann-Whitney の U 検定、カイ 2 乗検定または Fisher exact test を用いた。iNOS スコアと微小血管密度 (MVD) との相関は Spearman の順位相関検定を用いた。無病生存率については Kaplan-Meier 法による解析と Cox 比例ハザードモデルによる単変量解析と多変量解析をおこなった。いずれも  $p < 0.05$  を有意とした。

### III. 成績

#### 1. iNOS、p53 および VEGF の発現

正常喉頭上皮 (5 例)、声帯ポリープ (7 例) では iNOS、p53 および VEGF の発現をいずれも認めなかった。しかし、mild/moderately dysplasia (9 例) では、iNOS の発現は 2 例 (22%)、p53 の発現は 2 例 (22%)、VEGF の発現は 2 例 (22%) に認めた。severe dysplasia (11 例) では、iNOS の発現は 4 例 (36%)、p53 の発現は 3 例 (27%)、VEGF の発現は 4 例 (36%) に認めた。喉頭扁平上皮癌では 63 例中、iNOS の発現は 36 例 (57%)、p53 の発現は 28 例 (44%)、VEGF の発現は 30 例 (48%) に認めた。iNOS、p53 および VEGF の発現陽性率はいずれも喉頭病変が mild/moderately, severe dysplasia, 扁平上皮癌と重症化するに伴って増加していた ( $p=0.0012$ ,  $p=0.042$ ,  $p=0.029$ )。

#### 2. 喉頭粘膜異形成と喉頭扁平上皮癌における iNOS、p53、VEGF、MVD の発現の関与

喉頭粘膜異形成において p53 陽性例は p53 陰性例に比較して iNOS スコアが有意に高かった (iNOS score= 3.00: 3.00-4.50 vs 0.00: 0.00-2.00,  $p=0.0007$ )。また、VEGF 発現も p53 陽性例では p53 陰性例に比較して有意に高かった ( $p=0.0004$ )。一方、喉頭 SCC 症例では VEGF 陽性例は VEGF 陰性例に比較して iNOS スコアや MVD が有意に高かった (iNOS score= 4.00: 0.00-6.00 vs 0.00: 0.00-3.00,  $p < 0.0001$ ; MVD= 48.0: 34.0-60.0 vs 24.0: 19.8-30.3,  $p < 0.0001$ )。さらに、iNOS スコアと MVD との間に有意な正の相関を認めた ( $r=0.869$ ,  $p < 0.0001$ )。しかし、p53 の発現と VEGF、iNOS スコアおよび MVD との間に相関は認められなかった。

#### 3. 予後

年齢、性別、TN 分類、stage 分類はいずれも局所再発および遠隔転移に何ら関連を認めなかった。組織学的分化度、初回治療、p53 発現も局所再発および遠隔転移に関連を認めなかった。しかし、初回治療後の局所再発および遠隔転移を生じた症例は、局所再発および遠隔転移を生じなかった症例に対し iNOS スコアや MVD や VEGF 発現が有意に高かった (iNOS score= 4.00: 3.00-6.00 vs 2.00: 0.00-4.00,  $p=0.001$ ; MVD= 49.0: 35.0-56.8 vs 27.5: 22.0-45.0,  $p=0.003$ ; VEGF= 82.4% vs 34.8%,  $p=0.001$ )。Kaplan-Meier 法による解析を行なったところ、iNOS 発現陽性群 ( $p=0.01$ )、VEGF 発現陽性群 ( $p=0.003$ )、高 MVD ( $\geq 50$ ) ( $p=0.035$ ) ではそれぞれ iNOS 発現陰性群、VEGF 発現陰性群、低 MVD ( $< 50$ ) に比較して有意に 5 年無病生存率が低下していた。また、単変量解析の結果、これらの iNOS 発現陽性群 (ハザード比 5.571, 95%信頼区間 1.273-24.383,  $p=0.0226$ )、VEGF 発現陽性群 (ハザード比 5.312, 95%信頼区間 1.525-18.502,  $p=0.0087$ )、高 MVD ( $\geq 50$ ) (ハ

ザード比 2.706, 95%信頼区間 1.036-7.070,  $p=0.042$ ) は有意に無病生存率の低下と関連していた。さらに多変量解析で iNOS 発現陽性群 (ハザード比 6.668, 95%信頼区間 1.126-39.476,  $p=0.0364$ ) と VEGF 発現陽性群 (ハザード比 4.953, 95%信頼区間 1.124-21.827,  $p=0.0345$ ) が無病生存率を規定する独立した予後因子であることが判明した。

#### IV. 考案

本研究においては iNOS、p53、および VEGF の発現が正常喉頭組織や喉頭ポリープでは認められず、mild/moderately dysplasia から severe dysplasia、癌組織へと病変が重症化するにつれて発現が上昇し、癌組織で最も発現が高いことが明らかとなった。このことは以前に報告された胃粘膜組織での検討 (1) と同様のものであり、iNOS、p53、および VEGF の発現増強が喉頭組織の癌化を促進させる早期の重要な役割を果たすことを示唆するものであった。また、iNOS、p53、および VEGF の発現がどのように血管新生に関与しているか検討したところ、喉頭癌組織において iNOS と VEGF の発現の間に有意な相関が認められた。NO は VEGF の上流のシグナルと言われ癌組織において血管新生を促進させることで癌の増殖を引き起こすとの報告がある (2)。本研究の結果を考慮すると喉頭扁平上皮癌組織において iNOS の発現増強は VEGF の発現増加を来らし、その結果として血管新生が誘発されることが示唆された。一方、喉頭扁平上皮癌組織において p53 の発現は iNOS 発現や血管新生のいずれにも関連がなかった。本研究において予後因子について検討したが、p53 過剰発現は予後と関連性を認めなかった。p53 遺伝子変異の検索には免疫組織学的に p53 過剰発現を指標とするより遺伝子変異を直接シーケンスの方が正確であると言われており (3) 今後の検討課題であると考えられた。iNOS 発現の予後的価値は十分に検討されておらず、特に頭頸部領域においては報告も少ない。本研究では iNOS 発現が喉頭扁平上皮癌における無病生存率に対する独立した予後因子であることを示したものである。今回の成績は治療前の喉頭癌組織における iNOS の発現を解析することで、予後の推測や症例によっては喉頭を温存できる否かを予見できる可能性を示唆するものであった。加えて治療前における iNOS 発現の解析することで、癌再発の高リスク群を抽出したり、術後の補助療法を必要とする症例を探る上での有益な情報を得る可能性が示唆された。

#### V. 結論

1. iNOS、p53、および VEGF の発現が正常喉頭組織や喉頭ポリープでは認められず、mild-moderately dysplasia, severe dysplasia, 癌組織 の順に発現は高くなっていた。
2. 喉頭粘膜異形成において p53 陽性例と iNOS スコア、VEGF 発現に有意な関連を認めた。
3. 喉頭扁平上皮癌では VEGF 陽性例と iNOS スコアや MVD に有意な関連を認めた。さらに、iNOS スコアと MVD との間に有意な正の相関を認めた。
4. 初回治療後の局所再発および遠隔転移を生じた症例は、iNOS スコア、VEGF、MVD が有意に高値であつ

た。

5. 予後因子を解析したところ、iNOS 発現陽性群、VEGF 発現陽性群、高 MVD ( $\geq 50$ ) 群において有意に 5 年無病生存率が低下していた。多変量解析で iNOS 発現陽性群と VEGF 発現陽性群が無病生存率を規定する独立した予後因子であることが判明した。
6. 以上の結果より iNOS 発現が喉頭癌組織における血管新生、予後に重要な役割を果たしていると考えられた。喉頭癌組織の iNOS 発現を治療前に解析することは、癌再発の可能性を予測したり、術後に補助療法を必要とするのかを判断するうえで有用であることが示唆された。

## VI. 引用文献

1. Feng, C., Wang, L., Jiao, L., Liu, B., Zheng, S., Xie, X. Expression of p53, inducible nitric oxide synthase and vascular endothelial growth factor in gastric precancerous and cancerous lesions: correlation with clinical features. *BMC Cancer*, 2:8, 2002
2. Chiarugi, V., Magnelli, L., Gallo, O. Cox-2, iNOS and p53 as play-makers of tumor angiogenesis. *Int J Mol Med*, 2: 715-719, 1998
3. Kropveld, A., Slootweg, P. J., van Mansfeld, A. D., Blankenstein, M. A., Hordijk, G. J. Radioresistance and p53 status of T2 laryngeal carcinoma. Analysis by immunohistochemistry and denaturing gradient gel electrophoresis. *Cancer*, 78:991-997, 1996

## V. 参考文献

1. 執行 寛、野中 聡、片山昭公、高原 幹、荻野 武、今田正信、林 達哉、原渕保明. ヒト喉頭癌における誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) 発現の検討. *頭頸部腫瘍* 29(1), 230-234, 2003
2. 執行 寛、斎藤 滋、高橋光明、原渕保明. KTPレーザー治療を行なった口腔内多発性血管腫症例. *耳鼻* 46(5), 396-398, 2000

## 学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏 名	執 行 寛
審査委員長 <u>奥村利勝</u> ㊟  審査委員 <u>河野透</u> ㊟  審査委員 <u>平田哲</u> ㊟  審査委員 <u>原淵保明</u> ㊟			
学 位 論 文 題 目  <i>Inducible nitric oxide synthase expression            in various laryngeal lesions in relation to            carcinogenesis, angiogenesis, and patient's            prognosis</i>			

誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) の発現誘導に伴い過剰に生成された NO は生体自らの DNA を障害し、突然変異を誘発するなど、癌発生に強く関与する。近年、大腸癌、胃癌などの固形癌において iNOS が癌細胞周囲の血管内皮細胞、癌細胞自体に過剰発現し、悪性腫瘍の臨床像および予後と iNOS 発現との関係が指摘されている。しかし、喉頭がんにおける報告はなく、本学位論文は自験例の様々な喉頭病変における iNOS の発現を免疫組織学的に検討し、P53 や VEGF 発現との関係、臨床因子、予後との関係について検討して、喉頭癌の発生及び進展における iNOS 発現の意義を明らかにするために行われた。得られた結果は以下の通りである。

1. iNOS, p53, および VEGF の発現が正常喉頭組織や喉頭ポリープでは認められず, mild-moderately dysplasia, severe dysplasia, 癌組織 の順に発現は高くなっていった。
2. 喉頭粘膜異形成において p53 陽性例と iNOS スコア、VEGF 発現に有意な関連を認めた。
3. 喉頭扁平上皮癌では VEGF 陽性例と iNOS スコアや微小血管数に有意な関連を認めた。さらに、iNOS スコアと微小血管数との間に有意な正の相関を認めた。
4. 初回治療後の局所再発および遠隔転移を生じた症例は、iNOS スコア、VEGF、微小血管数が有意に高値であった。
5. 予後因子を解析したところ、iNOS 発現陽性群、VEGF 発現陽性群、高微小血管数群において有意に 5 年無病生存率が低下していた。多変量解析で iNOS 発現陽性群と VEGF 発現陽性群が無病生存率を規定する独立した予後因子であることが判明した。

以上の結果より iNOS 発現が喉頭癌の癌化や喉頭癌組織における血管新生、予後に重要な役割を果たしていることが初めて明らかにされた。これらの研究は

喉頭癌組織の iNOS 発現を治療前に解析することにより、癌再発の可能性を予測したり、術後に補助療法を必要とするのかを判断するうえで有用であることを示す点で極めて臨床的に有意な報告である。論文提出者は関連領域に関する質問にも十分な知識を背景に不足なく返答した。以上総合して、学位論文として必要十分と判断した。