

## 主論文の要旨

**Lewis y antigen is expressed in oral squamous cell carcinoma cell lines and tissues, but disappears in the invasive regions leading to the enhanced malignant properties irrespective of sialyl-Lewis x**

Lewis y 抗原は口腔扁平上皮癌細胞株及び組織に発現するが、  
浸潤部において消失することにより sialyl-Lewis x 抗原と  
無関係に悪性形質を増強する

名古屋大学大学院医学系研究科 細胞情報医学専攻  
頭頸部・感覚器外科学講座 顎顔面外科学分野

(指導：上田 実 教授)

堀田 宏司

## [緒言]

扁平上皮癌は皮膚、肺、食道及び口腔に頻繁に生じ、化学療法や放射線療法に抵抗性を示す。顎顔面領域における本腫瘍の治療に際しては、機能障害だけでなく審美障害もあるため、最適な治療法が望まれる。ヒトの癌における血液型抗原の発現に関して多く報告がなされているが、口腔扁平上皮癌における血液型抗原の腫瘍表現型への関与や、癌悪性形質の基礎となるシグナル伝達についてはよく知られていない。この研究では、口腔由来の扁平上皮癌細胞株と癌患者の組織を用い、血液型抗原の発現と表現型への関与を検討した。

## [対象及び方法]

- 1.細胞株：口腔扁平上皮癌細胞株 HSC-2, HSC-3, Sa3, HSC-4, SCCKN, HO-1-u-1 Ca9-22 を使用した。
- 2.血液型抗原のスクリーニング：フローサイトメーターを用いて口腔扁平上皮癌細胞株に共通して発現する血液型抗原の検討を、type 2H, Lewis y, Lewis a, sialyl Lewis a, Lewis b, Lewis x, sialyl Lewis x に特異的なモノクローナル抗体を用いて行なった。
- 3.口腔扁平上皮癌患者のホルマリン固定パラフィン包埋病理組織を用い、Strept avidin-Biotin Detection System を使用し、血液型抗原の免疫染色を行なった。
- 4.Lewis y 抗原と腫瘍の悪性度との関連性の解析をするために、病理組織と培養細胞を用いて、Ki-67 と Lewis y の同時免疫染色を行なった。培養細胞を、4% パラホルムアルデヒドで固定し、0.02 % Triton X-100 にて透過処理をした。Lewis y は Alexa Fluor™488 で、type 2H は Alexa Fluor™ 555 で染色した。
- 5.Lewis y 陰性細胞亜株 HSC-3-21 に FUT1 cDNA を導入し Lewis y+細胞とコントロールの Lewis y-細胞を樹立した。また、Lewis y 陽性細胞亜株 HSC-3-34 から miR RNAi を用いて Lewis y- (KD)細胞とコントロール細胞の Lewis y+ (VC)細胞を樹立した。
- 6.細胞増殖能は MTT 法を、細胞浸潤能は Boyden chamber 法により解析を行なった。
- 7.ヌードマウスの腹部に、樹立した腫瘍細胞亜株を移植し、in vivo の腫瘍増殖能と腹膜への浸潤能の比較を行なった。

## [結果]

7 種類の口腔扁平上皮癌細胞株を用いて血液型抗原の発現をフローサイトメーターにて解析したところ、type 2H 抗原と Lewis y 抗原の共通した高発現が認められた (Fig. 1)。65 症例の口腔扁平上皮癌および関連疾患の患者からの病理組織につき type 2H と Lewis y の免疫組織染色を行なったところ、正常組織においては、type 2H や Lewis y の発現は認められなかったが、腫瘍組織においては、type 2H は基底層から有棘細胞層まで陽性であり、Lewis y は有棘層上部から顆粒細胞層まで陽性であった。また、type 2H は異形成や過形成においても陽性であったのに対し、Lewis y は組織

の悪性化に伴って陽性率が増したため、癌特異性が高いことが示唆された (Fig. 2, Table 1)。Lewis y は腫瘍組織の表層で強発現したが、浸潤部位において発現の低下が認められた。そこで Ki-67 との二重染色を行なったところ、それぞれの発現部位が一致しておらず、Lewis y は概して増殖部や浸潤部において消失した (Fig. 3)。HSC-3 細胞株から、Lewis y 陰性細胞(HSC-3-21)、低発現細胞(HSC-3-AA)、中程度発現細胞(HSC-3-34)、高発現細胞(HSC-3-44)を樹立し、それらの細胞を用いて増殖能や浸潤能を解析した結果、Lewis y の発現レベルが上昇するにつれ、増殖能や浸潤能の低下が認められた (Fig. 4a, b)。これらの結果から、Lewis y の発現は悪性形質に抑制的に働くことが示唆された。さらに、HSC-3-21 に Lewis y の合成酵素の 1 つである FUT1 を遺伝子導入し、Lewis y+細胞(L8, L15)と Lewis y-細胞(VC7, VC8)を樹立した。これらの細胞を用いて解析を行なったところ、Lewis y+細胞の増殖能や浸潤能が有意に低下していた (Fig. 4c, e, f)。また、Lewis y+亜株 HSC-3-34 を用い、FUT1 をノックダウンした (Fig. 5a)。Lewis y-細胞では増殖能と浸潤能が亢進した (Fig. 5b, c)。Lewis y 過剰発現細胞とコントロール細胞を用い、Ki-67 との免疫蛍光細胞染色を行なったところ、Lewis y+細胞では Ki-67 はほとんど発現していなかった。それに対し、Lewis-細胞では Ki-67 が強く発現していた (Fig. 6)。ヌードマウスの腹部皮下に、樹立した腫瘍細胞亜株を移植したところ、Lewis y+細胞(L8, L15)は腫瘍塊を形成した後、縮小傾向を認めた。Lewis y-細胞(VC7, VC8)は移植後、腫瘍が増大した。また、Lewis y+細胞では腹膜への浸潤が認められなかったが、Lewis y-細胞では大部分で浸潤が認められた (Fig. 8)。

## [考察]

Lewis y は口腔扁平上皮癌組織において特異的に発現していたため、腫瘍マーカーとなることが示唆された一方、悪性化が高い卵巣癌においても発現増加が報告されているが、今回の研究では、Lewis y を過剰発現させると増殖能、浸潤能が低下した。また、Lewis y のノックダウンやヌードマウスへの腫瘍移植でも同様な結果が得られた。よって、Lewis y の発現が癌の悪性形質に抑制的に働くことが示唆された。Penduram は、様々な癌の浸潤期には、sialyl Lewis a や sialyl Lewis x が増加する一方で、H 抗原、Lewis b, Lewis y 抗原が減少すると報告している。本研究における興味深い点は、口腔扁平上皮癌組織と細胞株では Lewis y が発現するが、浸潤部位では消失する事である。扁平上皮癌細胞株が Lewis y を発現する事実は、培養条件に適応するために Lewis y が必須である可能性を示唆する。肺癌細胞では、EGF 受容体(R)のシアル化やフコシル化により EGFR の 2 量体化や活性化が抑制されるとの報告もあり、Lewis y の消失が癌進展期の特徴を示すと共に、増殖や浸潤能の亢進を招くことが示唆された (Fig. 7)。

## [結語]

この研究によって、口腔扁平上皮癌で Lewis y が発現する事と、Lewis y の消失に

伴って、細胞の増殖能や浸潤能などの悪性形質が増強することが示された。今後、癌悪性形質の増強の分子メカニズムの解明に有用な基礎的な情報が得られた。