

学位論文審査の結果の要旨

審査区分 課・論	第  号	氏名	小山 雄三
審査委員会委員		主査氏名	濱田 文彦 
		副査氏名	三股 浩光 
		副査氏名	北谷 五郎 
<p>論文題目 Difference in transducin-like enhancer of split 1 protein expression between basal cell adenomas and basal cell adenocarcinomas - an immunohistochemical study 基底細胞腺腫、基底細胞腺癌における transducin-like enhancer of split 1 蛋白質の発現の違い：免疫組織学的検討</p> <p>論文掲載雑誌名 Diagnostic pathology</p> <p>背景と目的 唾液腺腫瘍の一つ、基底細胞腺腫および基底細胞腺癌の病理学的鑑別診断は困難であるが、近年 Wnt シグナル伝達経路の構成因子 β-catenin の核内発現、およびこれをコードする <i>CTNNB1</i> 遺伝子の体細胞変異の有無が両者の診断に有用とされている。本研究では、転写レベルにおける Wnt シグナル伝達経路の抑制因子 Transducin-like enhancer of split 1 protein (以下 TLE1) に着目し、両腫瘍におけるその発現の違いについて検討した。</p> <p>研究対象および方法 大分大学医学部附属病院、大分県立病院で 1990 年から 2016 年に診断された基底細胞腺腫 35 例、基底細胞腺癌 4 例のホルマリン固定パラフィン切片を用いて、抗 TLE1 抗体および抗 β-catenin 抗体による免疫組織化学的検査を行った。また、切片から抽出した DNA を鋳型として <i>CTNNB1</i> 遺伝子の exon3 領域を増幅し、Direct-sequencing 法によって変異の有無を検討した。基底細胞腺癌の症例では、Laser microdissection (LMD) を用いることにより、非浸潤部と浸潤部を分けて同遺伝子の変異の有無を検討した。</p> <p>結果および考察 基底細胞腺腫において管腔細胞に TLE1、非管腔細胞に β-catenin が対比して染色された。基底細胞腺癌の浸潤部では TLE1 の染色性に減弱あるいは消失が認められたことから、浸潤部では Wnt シグナルが強く活性化している可能性が示唆された。腺腫、腺癌ともに <i>CTNNB1</i> 遺伝子の変異が認められた。基底細胞腺癌の非浸潤部（腺腫部分）と浸潤部（腺癌部分）で <i>CTNNB1</i> 遺伝子の同じ変異を検出したことから、腺癌が腺腫から発生する可能性が示唆された。</p> <p>結論 基底細胞腺腫、基底細胞腺癌の TLE1 の発現量の差異は両腫瘍の鑑別診断の一助となる可能性が示唆された。</p> <p>本研究は、TLE1 の発現量の違いが基底細胞腺腫と基底細胞腺癌の鑑別診断に有用である可能性を示した意義のある成果である。よって、審査委員会は本論文が学位論文として適切であると判断した。</p>			

最終試験
の結果の要旨
学力の確認

審査区分 課・論	第  号	氏名	小山 雄三
審査委員会委員	主査氏名	濱田 文彦 	
	副査氏名	三股 浩光 	
	副査氏名	北本 正輝 	

学位申請者は本論文の公開発表を行い、各審査委員から研究目的、方法、結果、考察について以下の質問を受けた。

- ① 基底細胞と筋上皮細胞との違いは何か？ α -SMA は基底細胞のマーカーになるか？
- ② 唾液腺腫瘍はなぜ多彩な病理像を示すのか？
- ③ 唾液腺に幹細胞はあるのか？あるとしたらマーカー蛋白質は存在するか？
- ④ TLE-1 が luminal cell で、 β -catenin が abluminal cell で発現することを明確に示すため、TLE-1 と β -catenin、 α -SMA と β -catenin などの組み合わせで2重染色を行ったか？
- ⑤ β -catenin が核に集積するには様々な原因が考えられるが、たとえば APC の変異は調べたか？
- ⑥ β -catenin の exon 3 だけの変異を調べたのはなぜか？
- ⑦ I35T, H36P などの変異は β -catenin の本来の機能にどのような影響を及ぼすか？
- ⑧ 表題に salivary gland を加えたほうがよいのではないか？
- ⑨ abstract の result に laser-captured microdissection の記載があるが、method に記載すべきでは？
- ⑩ 浸潤部の細胞は TLE1 陰性であるが、非管腔細胞由来の細胞と考えてよいのか？
- ⑪ laser microdissection で管腔細胞と非管腔細胞、浸潤細胞を分離採取し、single cell analysis をすれば、細胞の由来を同定できるのではないか？
- ⑫ 唾液腺腫瘍の細胞株はないのか？細胞株があれば、TLE1 の過剰発現や knock down をして、浸潤能や遊走能を調べれば、著者の仮説が証明できるのではないか？
- ⑬ luminal cell と abluminal cell の2相構造を呈する basal cell tumor では、どちらが腫瘍の本体？
- ⑭ 基底細胞腺癌の検体で、浸潤部と非浸潤部の solid パターンを示す部分で TLE1 の発現に違いはあるのか？
- ⑮ β -catenin の変異は luminal cell, abluminal cell の両方に生じるのか？それとも abluminal cell だけか？
- ⑯ abluminal cell で TLE1 の発現が低下する機序は？
- ⑰ adenoma の Ki67 陽性細胞率および細胞分裂数について、同一検体内でも増殖パターンの違い (tubular vs solid) で差はみられたか？
- ⑱ 浸潤部を伴う基底細胞腺癌の症例の非浸潤部は規約上、adenoma とみなすのか？それとも carcinoma とみなすのか？
- ⑲ adenoma-carcinoma sequence 仮説を検証するために今後どのような研究が必要か？

これらの質問に対して、申請者は概ね適切に回答した。審査委員の合議の結果、申請者は学位取得有資格者であると認定した。

(注) 不要の文字は2本線で抹消すること。

学 位 論 文 要 旨

氏名 小山 雄三

論 文 題 目

Difference in transducin-like enhancer of split 1 protein expression between basal cell adenomas and basal cell adenocarcinomas - an immunohistochemical study

(基底細胞腺腫, 基底細胞腺癌における transducin-like enhancer of split 1 蛋白質の発現の違い: 免疫組織学的検討)

要 旨

【緒言】基底細胞腺腫, 基底細胞腺癌はそれぞれ良性, 悪性の唾液腺腫瘍で, いずれも導管上皮細胞/管腔細胞, とその外側の筋上皮細胞/非管腔細胞の2種類の細胞から構成される。基底細胞腺腫と腺癌を鑑別する形態学的・組織学的特徴として周囲組織への浸潤の有無が重要と言われているが, 診断に苦慮することも少なくない。近年, Wnt/ β -catenin シグナルの1つである β -catenin の免疫組織化学検査による核内発現, *CTNNB1* 遺伝子の体細胞変異は基底細胞腺腫, 基底細胞腺癌の診断に有用と言われている。ところで近年, Transducin-like enhancer of split 1 protein (以下 TLE1)の機能の一つとして Wnt/ β -catenin シグナルの転写の抑制が挙げられている。そこで今回我々は Wnt/ β -catenin シグナルにおいて“Off”として機能する TLE1 に着目し, 基底細胞腺腫, 基底細胞腺癌の腫瘍形成に Wnt/ β -catenin

シグナルが重要であるならば発現に違いがみられるのではないかと仮定した。[研究対象及び方法] 対象：大分大学医学部附属病院，大分県立病院で1990年から2016年に診断された基底細胞腺腫35例，基底細胞腺癌4例のホルマリン固定されたパラフィン切片を対象とした。免疫組織化学的検査：通常の臨床診断業務で行われている染色法にて抗TLE1抗体，抗 β -catenin抗体の免疫組織化学的検査を行った。TLE1は核内発現を陽性所見とし，正常部の腺房細胞，介在部導管細胞と同程度染色される場合1+，それ以上に染色される場合2+と判定し，腫瘍の30%以上に染色される場合を陽性と判定した。CTNNB1遺伝子変異の検索：パラフィン切片からDNAを抽出し，CTNNB1遺伝子の体細胞変異のhot spotであるexon3領域をPCR法にて増幅した。Direct-sequencing法にて塩基配列の解析を行い，変異の有無を検討した。基底細胞腺癌の症例に対してはLaser microdissection(LMD)を行い，非浸潤部と浸潤部を分けてDNAを抽出し，同様にCTNNB1遺伝子の体細胞変異の有無について検討した。

[結果] 基底細胞腺腫ではTLE1は35例中33例(94%)において内側の管腔細胞の核に陽性， β -cateninは35例中26例(74%)において外側の非管腔細胞の核に陽性であった。基底細胞腺癌の非浸潤部では基底細胞腺腫同様，TLE1は内側の管腔細胞， β -cateninは外側の非管腔細胞に陽性であった。基底細胞腺癌の浸潤部におけるTLE1の染色性は減弱あるいは消失し， β -cateninの非管腔細胞の染色性はいずれも同様であった。CTNNB1遺伝子変異の解析では基底細胞腺腫の35例中12例(34%)，基底細胞腺癌4例中2例(50%)に変異が認められ，非浸潤部，浸潤部については別々に遺伝子解析を行い，同じ変異が検出された。[考察] 基底細胞腺腫において管腔細胞にTLE1，非管腔細胞に β -cateninが対比して染色され，基底細胞腺癌の非浸潤部，浸潤部においてTLE1の染色性に減弱あるいは消失がみられ，差異が認められたことは，癌における浸潤部ではWnt/ β -cateninシグナルが“On”のシグナルに傾くことによって浸潤に至っている可能性が示唆された。CTNNB1遺伝子の変異検出率は過去の報告よりも若干少ないものの，遜色ない結果であった。従来，基底細胞腺癌は“de novo”に発症するといわれているが，報告の中には基底細胞腺腫から2次性に発症する症例の存在も示唆されていた。LMDにて基底細胞腺癌の非浸潤部と浸潤部でCTNNB1遺伝子の同じ変異を検出したことは，2次性発症の仮説を支持するものである。結語(まとめ) 基底細胞腺腫、基底細胞腺癌のTLE1タンパクの管腔細胞の発現の差異は両腫瘍の診断の一助となる可能性があり，さらにTLE1は唾液腺腫瘍における管腔細胞の有用なマーカーとなる可能性がある。

