

令和元年6月12日現在

機関番号：32650

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K11271

研究課題名(和文) 口腔癌に対する分子標的抗転移薬の効果

研究課題名(英文) Development of molecular target agents for oral cancer

研究代表者

高野 伸夫 (Takano, Nobuo)

東京歯科大学・歯学部・客員教授

研究者番号：30147219

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：口腔扁平上皮癌において低発現を示す AMBP を候補分子として、口腔癌における AMBP の機能解析と臨床的意義の解明を目的に実験を行った。

まず、口腔扁平上皮癌細胞株に AMBP 遺伝子を導入して AMBP 高発現細胞株を作製し、細胞における AMBP の機能解析を行った。実験結果より、AMBP が癌細胞の浸潤および遊走能に関連する可能性が示唆された。また、舌扁平上皮癌臨床検体 95 例を用いて免疫組織化学染色を行ったところ、AMBP の低発現は頸部リンパ節転移の危険因子であり、予測因子として利用できる可能性が見出された。また AMBP の低発現は 5 年生存率の低下と関連があり、予後因子としても有用である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔がんにおいて、頸部リンパ節転移および遠隔臓器転移は患者の予後に直結する重要な因子である。口腔がんの転移に関連する遺伝子産物は多数報告されているが、未だ一定の見解は得られていない。また、近年、口腔・頭頸部領域においても分子標的治療薬の開発が急速にすすんでおり、ターゲットとなる遺伝子産物の機能解析までが必要とされている。

本研究では、口腔扁平上皮癌において AMBP が高頻度に低発現を示すこと、AMBP の発現低下が癌の浸潤および転移に関連していることを明らかにした。AMBP の周辺分子をさらに検索することで、AMBP が口腔扁平上皮癌の治療ターゲットとして応用できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In order to identify novel diagnostic biomarkers for the malignant behavior of oral squamous cell carcinoma (OSCC), we determined the proteomic profiles of several OSCC cell lines and keratinocytes. The protein expression level of α -1-microglobulin/bikunin precursor (AMBP) was found to be significantly lower in the OSCC cell lines than in the keratinocytes. To investigate the biological function of AMBP in OSCC, the cells were transiently transfected with an AMBP overexpression vector; the AMBP-overexpressing cells exhibited a significantly decreased invasion and migration. Immunohistochemistry revealed that the underexpression of AMBP was significantly associated with a high metastatic potential to lymph nodes and a poor overall survival. Thus, the expression of AMBP is an independent predictive factor of nodal metastasis and a prognostic factor of overall survival, and it is involved in both cell invasion and metastasis in lymph nodes in OSCC.

研究分野：口腔がん

キーワード：口腔癌 扁平上皮癌 AMBP 予後因子 転移

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、これまでに科学研究費(基盤研究(C))研究代表者:高野伸夫:2006-2007年:課題番号:18592203)による研究で口腔扁平上皮癌のプロテオミクス解析を行い、転移関連遺伝子産物候補を多数リストアップすることに成功している。その中から、乳癌において高頻度な発現低下と腫瘍の浸潤・転移への関与が示唆されている Spleen tyrosine kinase(Syk)に着目し、口腔扁平上皮癌における Syk の発現低下と遺伝子機能、転移メカニズムについて解析し報告してきた(International Journal of Cancer. 2009, 1;124(11):2651-7) これ以外の転移関連遺伝子産物候補の中に、口腔癌細胞が高頻度に発現低下を示す AMBP がある。奈良県立医科大学の小林ら(Clin Exp Metastasis 2004, 21:159-1669)は、癌細胞には AMBP の分解産物である Bikunin のレセプターが存在し、MAP kinase のリン酸化抑制を介してウロキナーゼ・マトリックスメタロプロテアーゼの発現を mRNA レベルで抑制することで、癌の浸潤・転移を抑制すると報告している。さらに、動物実験および難治性進行卵巣がん患者への臨床試験の結果、この物質が毒性のない有効ながん転移抑制剤として応用できる可能性が示唆されている。

口腔扁平上皮癌における Bikunin の発現異常や機能についての報告はなく、いまだ明らかになっていない。口腔扁平上皮癌の頸部リンパ節転移や遠隔転移を抑制することができれば、治療成績の向上や生存率の向上、QOL の向上に直結するため、口腔扁平上皮癌における Bikunin の果たす役割は検討する必要がある。また、Bikunin はミラクリッド®として急性膵炎、慢性再発性膵炎の急性増悪期への適応として承認済みの薬剤であり、すでにヒトへの安全性が確立された薬剤である。早期に臨床応用可能なドラッグリポジショニング的な性格を有する薬剤であり、口腔扁平上皮癌への効果が確認できれば非常に有用と考えられる。

2. 研究の目的

口腔癌転移の有無は、癌患者の予後に直結する極めて重要な因子の一つである。研究代表者は、これまでに口腔扁平上皮癌細胞のプロテオーム解析を行い、口腔扁平上皮癌の転移関連遺伝子産物を多数リストアップしてきた。その中の一つに口腔癌細胞で高頻度に発現低下を示す AMBP がある。トリプシンインヒビターである Bikunin は、卵巣がんにおける転移抑制剤として臨床試験が開始され、効果が期待されている分子標的治療薬である。

本研究では *in vitro* および *in vivo* において口腔扁平上皮癌における AMBP および Bikunin の機能解析を試み、口腔扁平上皮癌の新規治療薬として応用できる可能性について検討した。

3. 研究の方法

(1) 2D-DIGE, LC/MS/MS によるタンパク質の網羅的解析

口腔癌細胞と正常細胞の産生するタンパク質の違いについて、2D-DIGE および LC/MS/MS を用いて、網羅的に解析した。口腔扁平上皮癌細胞株として、KON, OSC-20, HSC-3, HSC-4, SAS, Ca9-22 を使用した。コントロールとしてヒト表皮角化細胞株 HaCaT を使用した。

(2) RT-qPCR による mRNA の解析

RT-qPCR を用いて、細胞株の mRNA 発現状態を検証した。口腔扁平上皮癌細胞株として KON, OSC-20, HSC-3, HSC-4, SAS, Ca9-22 を使用し、コントロールとしてヒト表皮角化細胞株 HaCaT を使用した。

(3) AMBP 過剰発現細胞株による AMBP 機能解析

口腔扁平上皮癌細胞株 SAS に AMBP を transfection して AMBP 過剰発現細胞株を作製し、細胞増殖アッセイ、細胞遊走アッセイ、細胞浸潤アッセイにて *in vitro* での機能解析を実施した。DNA transfection は Western blotting によって確認した。

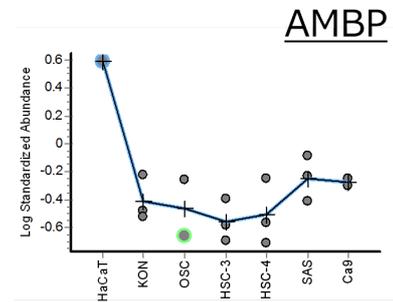
(4) 免疫組織化学染色法による AMBP の発現と臨床病理学的指標との関連性の評価

舌扁平上皮癌 95 検体について、AMBP の免疫組織化学染色を施行し、統計学的手法を用いて臨床病理学的指標および予後との関連を検討した。

4. 研究成果

(1) 2D-DIGE, LC/MS/MS

2D-DIGE によって示された発現異常タンパク質のうち、質量分析によって 92 種のタンパク質が同定された。このうち、AMBP タンパク質は、表皮角化細胞株 HaCaT と比較して、口腔扁平上皮癌細胞 6 株すべてに共通して低発現を示していた。



(2) mRNA の発現状態

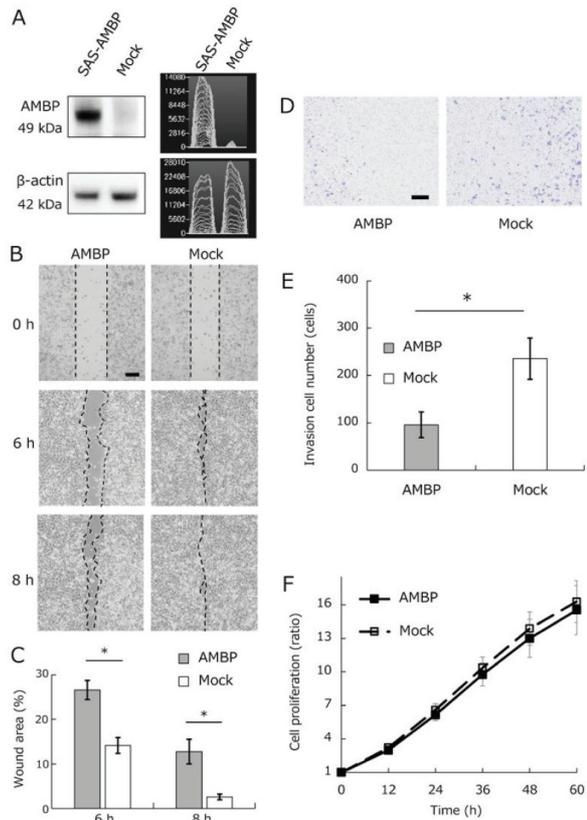
RT-qPCR により、表皮角化細胞株 HaCaT と比較して、口腔扁平上皮癌細胞株 6 株すべてにおいて、AMBP の mRNA の発現量が、タンパク質の発現量と同様に低発現を示していた。

(3) in vitro での AMBP の機能解析

遺伝子導入法を用いて、AMBP 高発現株を作成した。

遺伝子導入法の効果判定は Western blotting により確認した(A)。

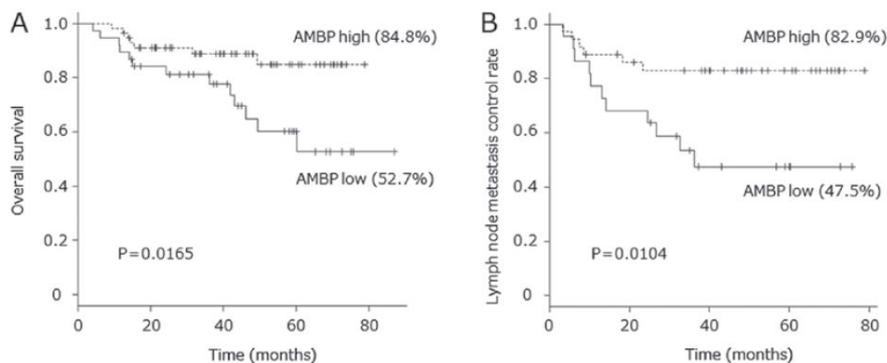
AMBP 高発現株では、細胞の遊走能(B, C)および浸潤能(D, E)ともに表皮角化細胞株 HaCaT と比較して抑制される傾向が認められた。細胞の増殖能(F)と AMBP の発現状態との間には有意な関連は認められなかった。



(4) 免疫組織化学染色による検討

AMBP の発現状態と臨床病理学的因子との関連について統計学的手法を用いて検討した。AMBP の発現は腫瘍の浸潤深度 ($p=0.02$)、頸部リンパ節転移 ($p=0.002$) および死亡 ($p=0.04$) と統計学的に有意な相関を認めた。

Kaplan-Meier 法において、AMBP の低発現は死亡 (A, $p=0.0165$) および頸部リンパ節転移 (B, $p=0.0104$) の危険因子であることが示された。



また、Cox 比例ハザード解析 (単変量および多変量解析) から、N 分類 (HR, 6.55; 95% CI, 1.76-24.40)、腫瘍の組織学的分化度 (HR, 9.68; 95% CI, 3.41-27.64) および AMBP の低発現 (HR, 0.35; 95% CI, 0.13-0.92) が死亡の有意な危険因子であることが示された。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

Shoichi Sekikawa, Takeshi Onda, Nami Miura, Takeshi Nomura, Nobuo Takano, Takahiko Shibahara, Kazufumi Honda: Underexpression of α -1-microglobulin/bikunin precursor predicts a poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. International journal of oncology 53: 2605-2614, 2018.

[学会発表] (計 3 件)

関川翔一, 鬼谷 薫, 松本暢久, 林 宰央, 恩田健志, 野村武史, 高野伸夫, 柴原孝彦, 本田一文: AMBP は口腔扁平上皮癌の細胞浸潤・遊走およびリンパ節転移と関連する. 第 62 回日本口腔外科学会総会・学術大会, 2017 年 10 月 20~23 日, 京都市

関川翔一, 恩田健志, 林 宰央, 渡部幸央, 野村武史, 高野伸夫, 柴原孝彦: 口腔扁平上皮癌における Bikunin 併用療法の抗腫瘍効果. 第 34 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会, 2016 年 1 月 21~22 日, 横浜市

関川翔一, 恩田健志, 林 宰央, 渡部幸央, 野村武史, 高野伸夫, 柴原孝彦: 口腔扁平上皮癌細胞に対する Urinary Trypsin Inhibitor の抗腫瘍効果. 第 69 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会, 2015 年 5 月 13~15 日, 大阪市