

令和 3 年 10 月 21 日現在

機関番号：83901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K20513

研究課題名(和文) TGF シグナル制御因子を応用した口腔癌低侵襲診断システムの開発

研究課題名(英文) A study for the development of minimally invasive diagnosis system in oral cancer with TGFbeta-signal regulatory molecules

研究代表者

萩原 純孝 (HAGIWARA, Sumitaka)

愛知県がんセンター(研究所)・共通機器室・研究員

研究者番号：40547551

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：頭頸部扁平上皮癌患者56例の術前後での血清CD109および血清CD44-variant6をELISA法で測定し、各臨床因子との関連を検討した。血清CD109値は、各臨床因子の2群間比較でT3+T4群(腫瘍径が大きいもの)やN1+N2群(リンパ節転移あり)の進行病態で高値を呈し、腫瘍切除やリンパ節郭清により有意に減少した。また、術前血清CD109値の各臨床因子を独立変数とした多変量解析では、「リンパ節転移の有無」が最も影響ある因子として同定された。CD44v6でも同様の解析を行ったところ、Stageの進行と共に有意に減少したものの、術前後の比較や多変量解析では有意な臨床因子は同定されなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果、術前血清CD109値を測定することにより頸部リンパ節転移の有無を診断したり、治療前後での相対的变化を解析することにより予後不良症例を予測することなどが可能になると思われた。頭頸部扁平上皮癌患者において血清CD109値を解析する方法は、一臨床検査として悪性度や予後予測の客観的評価のための新たな診断ツールになり得ると期待される。

研究成果の概要(英文)：We investigate the concentration of serum CD109 (sCD109) and serum CD44-variant 6 (sCD44v6) with ELISA from 56 head and neck squamous cell carcinoma patients before and after surgery. Upregulation of sCD109 concentration was found in the patients with T3 or T4 tumor size, with positive lymph node, and with stage IV, in comparison to the patients with T1 or T2 tumor size, with negative lymph node, and with stage I~ III respectively. Multiple liner regression analysis about preoperative sCD109 indicated the status of lymph node metastasis as the significantly related clinical factor. No significant relationship was detected between sCD44v6 concentration and each clinical factor, except for pathological stage comparison in preoperative period.

研究分野：口腔腫瘍学

キーワード：頭頸部扁平上皮癌 血液腫瘍マーカー 血清CD109 血清CD44 TGF シグナル エクソソーム 細胞外分泌

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

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

## 1. 研究開始当初の背景

CD109 は分子量約 205kDa の GPI アンカー型細胞表面糖タンパク質で、過去に行った自己の研究で、CD109 が 口腔悪性腫瘍のなかでも扁平上皮癌組織に高発現していること、 TGF- $\beta$ 1 シグナルを負に制御することにより細胞増殖を促進させること、 Furinase による分子内切断を受け N 末端フラグメント(180kDa)が細胞外に分泌されること、などを報告した。また、われわれのグループが行った *in vivo* study では、CD109 高発現細胞を皮下移植したマウスの血液より、移植細胞由来の CD109 を検出することが可能であった。これらの結果より、扁平上皮癌患者の血液中には腫瘍由来の CD109 が存在している可能性が極めて高いと推測された。

2013 年度～2014 年度に行った自己の研究課題 ( 科研費若手研究 B ): 「 TGF $\beta$  関連細胞外分泌タンパク質を応用した新規扁平上皮癌マーカーの開発」において、口腔前癌病変を含む口腔腫瘍患者約 40 例の血清 CD109 濃度を ELISA 法で解析したところ、( 非扁平上皮癌 vs 早期扁平上皮癌 ) の 2 群間比較では扁平上皮癌患者群が低値であり、( リンパ節転移なし vs リンパ節転移あり ) の 2 群間比較では有意差を認めなかった。非担癌状態での内因性 CD109 との関連や、検体の保存条件の違いによる影響、使用した ELISA キットの血清解析における信頼性等、再検討が必要と思われる結果であった。

2014 年 9 月、本研究課題申請時は、当方がこれまで研究を積みあげてきた名古屋大学で研究することを前提に計画を立案したが、課題採択通知時 ( 2015 年 4 月 1 日 ) には愛知県がんセンターへ異動となり、既存の実験システムや研究協力体制の維持が困難な状況であった。本研究をスタートするにあたり、当センター倫理審査委員会への申請手続きや研究環境の整備に半年以上の時間を費やした。一方、所属研究機関の変更に伴い、臨床研究の対象疾患を口腔扁平上皮癌から頭頸部扁平上皮癌(HNSCC)へ拡張し、血清検体の解析を進めるようにした。

## 2. 研究の目的

HNSCC 患者の血清検体を用いて CD109 をはじめ TGF $\beta$  関連因子を定量解析し、扁平上皮癌の診断に有用な新規血清マーカーを探求することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### ( 1 ) 血清検体を使用した pilot study

まずは、2015 年度を中心に当院頭頸部外科において一次治療として手術を施行した HNSCC 症例で、術前 1 か月以内 ( 手術前スクリーニング検査として実施 ) および術後 1 年以内 ( 術後の補助療法施行後を含む、臨床的に Cancer-free とと思われる状態で実施 ) の血液検査で、その余剰血清検体が当院中央検査部で 80 保存されている 20 例を抽出した。解析対象分子として、CD109、HSP70 ( CD109 の結合蛋白として同定され癌との関連が報告されている )、CD44-standard(std) /-variant 5(v5) /-variant 6(v6) ( CD109 同様、血中に分泌され、発癌や TGF $\beta$  シグナルとの関連が報告されている ) の 5 種類をターゲットとして、ELISA 法による濃度解析を行った。ELISA キットはそれぞれ、Cloud-Clone 社 human CD109 ELISA Kit (SEB458Hu)、RAYBIOTECH 社 HSP70 ELISA, Human (ELH-HSP70-1)、Promokine 社 human sCD44 ELISA Kit (PK-EL-63349・PK-EL-63350-5・PK-EL-63350-6) を使用し、外部研究機関に解析を委託した。その結果、HSP70 は概ね検出限界以下で、CD109、CD44std、CD44v5、CD44v6 は全検体で ng/mL の単位で検出可能であった。性別・年齢・pT/pN 分類 ( UICC 第 7 版 ) ・pStage・組織学的分化度の各臨床因子において 2 群間の平均血清濃度を比較 ( t 検定 ) したところ、CD109 の pStage ( I+II+III vs IV ) と組織学的分化度 ( 高分化 vs 中低分化 ) および CD44v6 の pT 分類 ( T1+T2 vs T3+T4 ) において有意傾向 (  $P < 0.1$  ) であった。一方 CD44std および CD44v5 は、いずれの臨床因子においても 2 群間の平均血清濃度に有意傾向を認めなかったことより、以後 ELISA 解析のターゲットを CD109 および CD44v6 の 2 種類に絞り込む方針とした。

### ( 2 ) HNSCC56 症例における CD109 および CD44v6 の血清濃度解析

前述の 20 例と同様に、2014 年 9 月から 2016 年 12 月までに当院頭頸部外科において手術を施行した HNSCC 一次症例で、術前 1 か月以内および術後 1 年以内に血液検査が施行され、その余剰血清検体が当院中央検査部で 80 保存されている 36 例を追加抽出した。血清 CD109 (sCD109) および血清 CD44v6 (sCD44v6) の濃度を ELISA 法で測定し、合計 56 症例を母集団として、性別・年齢・部位・pT/pN 分類 ( UICC 第 7 版 ) ・pStage・組織学的分化度・飲酒歴・喫煙歴の各臨床因子において、2 群間の平均血清濃度を t 検定により比較した。また、各群において同一患者の術前術後の血清濃度変化を、対応ある 2 標本の t 検定により検討した。さらに術前の sCD109 値・sCD44v6 値を従属変数とした多変量解析を行い、最も影響のある臨床因子を同定することを試みた。最後に sCD109・sCD44v6 両者の濃度に相関性があるかどうか、線形回帰分析を行い検討した。いずれも  $P < 0.05$  をもって統計学的に有意差ありと判定した。本研究は愛知県がんセンター倫理審査委員会承認のもと実施した。

#### 4 . 研究成果

( 1 ) HNSCC56 症例の各臨床因子における 2 群の内訳は、性別 < 男性 : 35 例 / 女性 : 21 例 >、年齢 < 66 歳以上 : 31 例 / 66 歳未満 : 25 例 >、部位 < 口腔 : 37 例 / 咽頭+その他 : 19 例 >、pT 分類 < T1+T2 : 40 例 / T3+T4 : 16 例 >、pN 分類 < 原発切除単独+N0 : 40 例 / N1+N2 : 16 例 >、pStage ( 原発切除単独群 20 例を除く ) < I+II+III : 20 例 / IV : 16 例 >、組織学的分化度 < 高分化 : 29 例 / 中低分化 : 27 例 >、飲酒歴 < なし : 22 例 / あり : 34 例 >、喫煙歴 < なし : 22 例 / あり : 34 例 > であった。

( 2 ) 術前 sCD109 値は、平均 32.24ng/mL で、pT 分類において T3+T4 群(43.03ng/mL)が T1+T2 群(27.93ng/mL)に対し有意に高値であった ( P=0.021 )。pN 分類と pStage においても N1+N2 群 (43.70ng/mL)および StageIV 群(46.26ng/mL)が、それぞれ、原発切除単独+N0 群(27.66ng/mL)および StageI+II+III 群(27.32ng/mL)に対し有意に高値であった。

( 3 ) 術前術後の sCD109 値の変化を検討したところ、T3+T4 群、N1+N2 群、および StageIV 群において術後の有意な減少を認め、それらは各臨床因子の比較対象である T1+T2 群、原発切除単独群+N0 群、および StageI+II+III 群と同等な値であった。つまり sCD109 値は、T3+T4 群や N1+N2 群の進行病態で高値を呈し、腫瘍本体の切除や転移リンパ節の郭清により減少する結果であった。

( 4 ) sCD109 値に影響を及ぼす臨床的要因を明らかにするため、2 群間に有意差を認めなかった ( P>0.5 であった ) 性別・年齢・喫煙歴・禁煙歴および交絡因子としての pStage を除いた、部位(口腔 / 咽頭+その他)、pT(T1 / T2 / T3 / T4)、pN(原発切除単独+N0 / N1+N2)、組織学的分化度(高分化 / 中低分化)の 4 因子を独立変数に選択し、術前 sCD109 値を従属変数とした多変量解析を行ったところ、pN のみが有意に影響のある臨床因子として同定された ( P=0.037 )。つまり、術前 sCD109 値は頸部リンパ節転移の有無を最も強く反映している可能性が明らかとなった。

( 5 ) sCD44v6 に関しても sCD109 同様の濃度解析を行った。術前 sCD44v6 値は平均 115.32ng/mL で、各臨床因子における 2 群比較の結果、StageIV 群(106.72ng/mL)が、StageI+II+III 群 (126.57ng/mL)に対し有意に低値であり ( P=0.029 ) Stage の進行と共に減少していた。各群の術前術後における平均値の比較では、有意な変化を示す臨床因子は同定されなかった。また、術前 sCD44v6 値において、部位(口腔 / 咽頭+その他)、pT(T1 / T2 / T3 / T4)、pN(原発切除単独+N0 / N1+N2)、組織学的分化度(高分化 / 中低分化)の 4 因子を独立変数とした多変量解析を行ったが、有意に影響のある臨床因子は同定されなかった。

( 6 ) 術前の sCD109 値 と sCD44v6 値は、pStage においてそれらの動態が相反する傾向があったが、両者の相関性を線形回帰分析にて検討したところ、有意な相関関係は認めなかった。

【結論】 CD109 および CD44(std・v5・v6)は、HNSCC 患者の血清検体を用いた定量化が可能であった。特に血清 CD109 は、HNSCC のリンパ節転移に関する術前診断マーカーとなり得る可能性が示された。

#### 5 . 主な発表論文等

[ 雑誌論文 ] ( 計 2 件 )

CD109 is a component of exosome secreted from cultured cells.

Hiroki Sakakura, Shinji Mii, Sumitaka Hagiwara, Takuya Kato, Noriyuki Yamamoto, Hideharu Hibi, Masahide Takahashi, Yoshiki Murakumo.

Biochemical and Biophysical Research Communications 2016; 469: 816-822.

DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.12.063

査読 ; 有り

Serum CD109 levels reflect the node metastasis status in head and neck squamous cell carcinoma

Sumitaka Hagiwara, Eiichi Sasaki, Yasuhisa Hasegawa, Hidenori Suzuki, Daisuke Nishikawa, Shintaro Beppu, Hoshino Terada, Michi Sawabe, Masahide Takahashi, Nobuhiro Hanai,

Cancer Medicine; 2021; 10: 1335-1346.

doi: 10.1002/cam4.3737. Epub 2021 Feb 9.

査読 ; 有り

〔学会発表〕(計 2 件)

「口腔扁平上皮癌患者における血清 CD109 の定量解析と臨床的意義に関する検討」  
萩原純孝，花井信広，鈴木秀典，西川大輔，小出悠介，別府慎太郎，日比英晴  
第 37 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会 2019.1.24~25 (長崎ブリックホール、長崎県長崎市)

「頭頸部扁平上皮癌患者における血清 CD109 の検討～新規血清診断マーカーの可能性について～」  
萩原純孝・佐々木英一・鈴木秀典・西川大輔・別府慎太郎・寺田星乃・澤部 倫・花井信広  
第 53 回日本臨床分子形態学会総会・学術集会 2021.10.22~24 (オンライン開催)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究分担者 なし

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

(2)研究協力者 なし

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。