

令和 2 年 7 月 3 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17106

研究課題名(和文) 頭頸部癌の発癌・進展におけるPRMT5の機能解析

研究課題名(英文) Analysis of PRMT5 in head and neck cancer progression

研究代表者

天野 雄介 (Amano, Yusuke)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：70571587

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質アルギニンメチル基転移酵素(Protein arginine methyltransferases; PRMT)5の口腔扁平上皮癌(OSCC)における役割を、上皮異形成、上皮内癌症例を含めて免疫組織学的に検討した。上皮異形成では、異型細胞の細胞質主体に正常上皮に比して強く染色される陽性細胞を認めた。OSCCの胞巣中心部では、細胞質に局在するのに対して、浸潤先進部では核と細胞質に局在していた。また、先進部が胞巣状の症例では、細胞質に局在する一方で、紡錘形ないしびまん性の症例では、核と細胞質に局在し、上皮間葉移行(EMT)マーカーの発現とも関連した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PRMT5は上皮異形成の段階から発現が正常組織に比して増加し、OSCCの浸潤先進部における細胞質から核と細胞質への局在の変化には、EMTが関与することが示唆された。すなわち、PRMT5はOSCCにおける病態形成初期から関与し、局在の相違は悪性度や浸潤様式に関与することが明らかにされ、その機構の解析が今後の検討課題とされた。

研究成果の概要(英文)：In the present study, I immunohistochemically examined the expression of Protein arginine methyltransferases (PRMT) 5 in surgically resected oral epithelial dysplasia (OED, n=8), carcinoma in situ (CIS) (n=11) and OSCC (n=52) with or without contiguous OED lesions. In the normal epithelium, PRMT5 was weakly expressed in the cytoplasm of basal layer cells. In OED, CIS, and OSCC, its expression consistently and uniformly increased in the cytoplasm of dysplastic and cancer cells. Moreover, nuclear and cytoplasmic localization was detected in the invasive front of cancer cells, particularly in cases showing poor differentiation or aggressive invasion patterns. The concomitant nuclear and cytoplasmic expression of PRMT5 correlated with the loss of E-cadherin and cytokeratin 17, and the upregulation of vimentin, features that are both indicative of epithelial-to-mesenchymal transition.

研究分野：口腔病理学

キーワード：口腔病理 口腔扁平上皮癌 PRMT5 EMT

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

癌治療の代表的な分子標的である EGFR, HER2, FGFR1-3 の遺伝子変異・増幅は、頭頸部癌の 20%前後にしかみられないことが明らかになっている (The Cancer Genome Atlas Network. Nature 2015). 現在、頭頸部癌に対して保険承認されている化学療法薬は、シスプラチン、カルボプラチン、フルオロウラシルなどの殺細胞性抗がん剤が主体で、分子標的薬としては抗 EGFR 抗体であるセツキシマブがある。それらを適宜、単剤あるいは併用することにより長年治療に供されてきたが、副作用の出現や薬剤耐性などの問題点も多く、これらの解決と治療効果の向上が求められており、新たな標的因子の検索が必要であった。

そこで申請者は、タンパク質アルギニンメチル基転移酵素(PRMTs)に注目した。PRMT の一つである PRMT5 は、組織再生・発生の領域で機能する分子として報告されていたが、最近では多種の癌でも遺伝子・タンパクの発現が認められ、oncogenic な性格を有することが明らかになってきた。米国癌学会の special conference (AACR Special Conference: Chromatin and Epigenetics in Cancer, September 24-27, 2015; Atlanta)においても PRMT5 阻害剤が HDAC, Histone methylase, Demethylase などと共に新規の Epigenetic drug として、Triple negative 乳癌の治療標的になる可能性が報告されていたが、頭頸部癌での検索は皆無であった。

### 2. 研究の目的

PRMT5 と頭頸部癌、特に口腔扁平上皮癌(OSCC)の関連を明らかにすることである。

### 3. 研究の方法

2010 年から 2015 年の間に、自治医科大学附属病院で術前治療なく外科的に切除された口腔上皮異形成(OED)8 症例、上皮内癌(CIS)11 症例、OSCC 52 症例を用いて、免疫組織化学的に PRMT5 の発現を、臨床病理学的因子との相関を検討した。また、腫瘍性病変で陰性を示す Cytokeratin (CK)13, 腫瘍性病変で陽性を示す CK17 や、上皮間葉移行(EMT)マーカー(E-cadherin, Vimentin)の発現との相関も検討した。

### 4. 研究成果

(1) PRMT5 の発現は正常上皮に比して OED, CIS, OSCC で細胞質における発現が増加した(Figure 1, bar: 100  $\mu$ m).

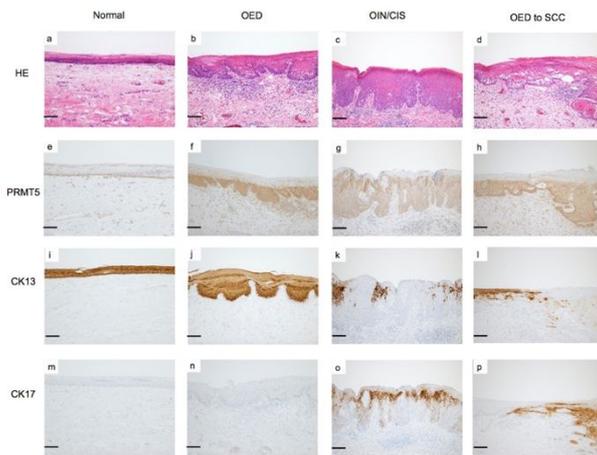


Figure 1

正常上皮において PRMT5 は、基底細胞層に淡陽性を示した(e).

OED において PRMT5 は、異型細胞の細胞質に陽性を示した(f).

CIS において PRMT5 は、腫瘍細胞の細胞質に陽性を示した(g).

OED から OSCC の移行像において PRMT5 は、異型細胞と腫瘍細胞の細胞質に陽性を示した(h).

CK13 は正常上皮と OED の異型細胞の細胞質に陽性を示した(i, j).

CK13 は CIS と OSCC の腫瘍細胞の細胞質に陽性を示した(k, l).

CK17 は正常上皮と OED の異型細胞に陰性だった(m, n).

CK17 は CIS と OSCC の腫瘍細胞の細胞質に陽性を示した(o, p).

OED, CIS および OSCC の病変間で PRMT5 の染色強度に、顕著な差は認められなかった。

(2) PRMT5 は OSCC の腫瘍先進部では、核と細胞質に局在する(Figure 2, bar a: 500  $\mu$ m b, c: 25  $\mu$ m).

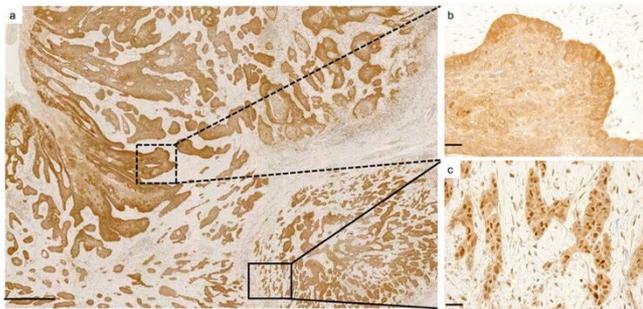


Figure 2

腫瘍中心部の細胞は、細胞質に陽性を示した(b).

腫瘍先進部の細胞は、核と細胞質に陽性を示した(c).

上記の連続切片を作製し、E-cadherin の発現を評価した(Figure 3, bar: a: 500  $\mu$ m b, c: 25  $\mu$ m).

腫瘍中心部の細胞は、概ね細胞膜に

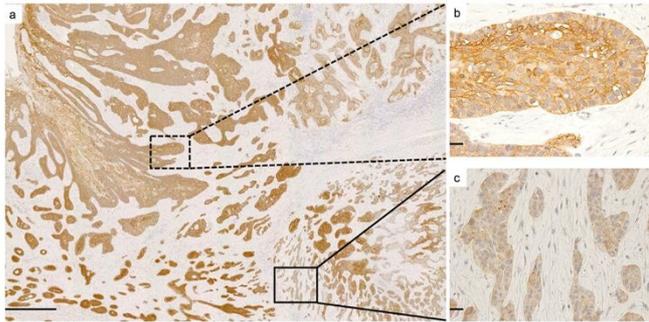


Figure 3

陽性を示した(b).

腫瘍先進部の細胞における細胞膜の発現は減弱した(c).

(3) PRMT5 の局在と OSCC の臨床病理学的因子との比較

OED(8 例), CIS(11 例)は全例細胞質に陽性を示した.

分化度が低い OSCC では, 有意に核と細胞質に陽性であった [Grade 3 (4/7 症例) vs. Grade 1/2 cases (7/45 症例,  $p=0.0122$ )].

腫瘍先進部の形態分類である山本・

小浜(YK)分類との相関を検討したところ, 主に胞巣状の形態を示す YK-1,2,3 の症例では, 多くは細胞質に陽性であった(18/19 症例). 一方で, 主に紡錘状の形態を示す YK-4C,4D の症例では, 多くは核と細胞質に陽性であった(20/33 症例,  $p=0.0333$ ).

(4)YK 分類, PRMT5 の局在および EMT マーカー発現との検討(Figure 4, bar: 50  $\mu$ m)

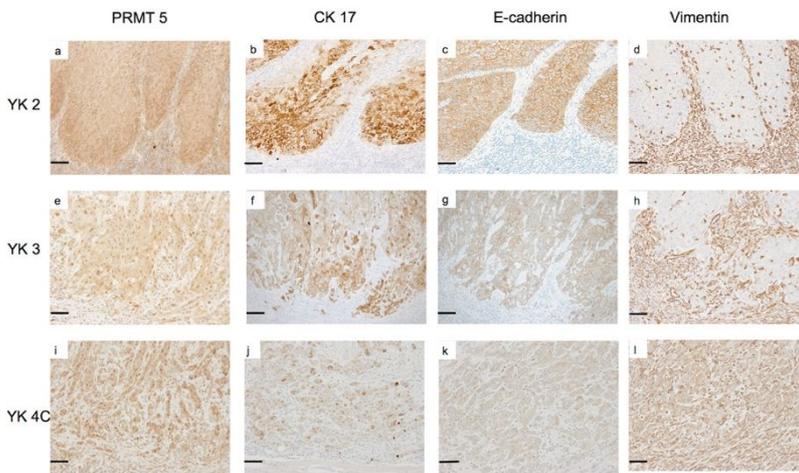


Figure 4

PRMT5 の発現

胞巣状の形態を示す YK-2,3 症例では, 細胞質に陽性であった(a,e).紡錘状の形態を示す YK-4C 症例では, 核と細胞質に陽性であった(i).

CK17 の発現

YK-2 症例では,細胞質に陽性であった(b).YK-3 症例では, 細胞質における発現が軽度減弱した(f). YK-4C 症例では, 細胞質における発現が減弱した(j).

E-cadherin の発現

YK-2 症例では,細胞膜に陽性であった(b).YK-3 症例では, 細胞膜における発現が軽度減弱した(f). YK-4C 症例では, 細胞膜における発現が減弱した(k).

Vimentin の発現

YK-2 症例では, 間質細胞の細胞質に陽性であった(d).YK-3 症例では, 間質細胞の細胞質に陽性であった(h). YK-4C 症例では, 間質細胞と腫瘍細胞の細胞質に陽性であった(l).

上記の結果を, 以下のように 3 型に分類した(-: 陽性細胞 30%未満, +/-: 陽性細胞 60%未満, +:陽性細胞 60%以上).

		CK17			E-cadherin			Vimentin		
		-	+/-	+	-	+/-	+	-	+/-	+
PRMT5	C (n=41)	4 (10%)	13 (32%)	24 (58%)	0 (0%)	9 (22%)	32 (78%)	23 (56%)	10 (24%)	8 (20%)
	N+C (n=11)	7 (64%)	3 (27%)	1 (9%)	4 (36%)	5 (46%)	2 (18%)	2 (18%)	2 (18%)	7 (64%)
YK	1,2,3 (n=19)	0 (0%)	5 (26%)	14 (74%)	0 (0%)	1 (5%)	18 (95%)	16 (84%)	1 (5%)	2 (11%)
	4C, 4D (n=33)	11 (33%)	11 (33%)	11 (33%)	4 (12%)	13 (39%)	16 (49%)	9 (27%)	10 (31%)	14 (42%)

CK17 と E-cadherin 陽性細胞の減少, Vimentin 陽性細胞の増加は, 各々 PRMT5 の核と細胞質の局在と相関した( $P=0.0003, <0.0001, 0.0136$ ). また, YK-4C, 4D 症例に有意に見られた(YK1-3 vs. YK-4C, 4D  $P=0.0005, 0.0032, 0.0004$ ).

まとめ

(1)OSCC における PRMT5 の発現を評価し, 以下の結論を得た.

PRMT5 は正常上皮に比して, OED, CIS, OSCC での細胞質における発現が増加した. 染色強度は, OED, CIS および OSCC の病変間にて顕著な差は認められなかった.

PRMT5 は OSCC 特に紡錘状の形態を示す症例では, 核と細胞質に局在し, EMT マーカーの発現(E-cadherin, CK17 の減弱, Vimentin の増加)との相関を認めた.

(2)PRMT5 の発現は, OSCC の病態初期から認められ, 浸潤性に関与することが示唆された.

(3)OSCC における PRMT5 の浸潤メカニズムには, EMT を介していることが示唆されたため, その機構の解析が今後の検討課題と思われた.

上記内容を Pathology International 誌に報告した(2018; 68: 359-366).

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Amano Y, Matsubara D, Yoshimoto T, Tamura T, Nishino H, Mori Y, Niki T.	4. 巻 68(6)
2. 論文標題 Expression of protein arginine methyltransferase-5 in oral squamous cell carcinoma and its significance in epithelial-to-mesenchymal transition.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pathol Int.	6. 最初と最後の頁 359-366
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/pin.12666.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Mito K, Amano Y, Oshiro H, Matsubara D, Fukushima N, Ono S.	4. 巻 98(4)
2. 論文標題 Liver heterotopia associated with congenital diaphragmatic hernia: Two case reports and a review of the literature.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Medicine (Baltimore).	6. 最初と最後の頁 e14211
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/MD.00000000000014211.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Noguchi T, Sugiura Y, Okada N, Tsuchiya Y, Hyasaka JI, Sasaguri KI, Sarukawa S, Fujita A, Amano Y, Mori Y.	4. 巻 13(1)
2. 論文標題 A modified preauricular and transmandibular approach for surgical management of osteosarcoma of the mandibular condyle within the masticator space and infratemporal fossa: a case report.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Med Case Rep.	6. 最初と最後の頁 58
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13256-019-1975-1.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ishihara A, Hatakeyama S, Suzuki J, Amano Y, Sasahara T, Toshima M, Morisawa Y.	4. 巻 19(1)
2. 論文標題 Histological evidence for the cardiac safety of high-dose pegylated liposomal doxorubicin in a patient with HIV-associated Kaposi sarcoma: a case report and literature review.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Infect Dis.	6. 最初と最後の頁 848
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12879-019-4500-7.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ozawa T, Tanaka R, Nagaoka R, Anan Y, Kim Y, Matsuzono K, Mashiko T, Koide R, Shimazaki H, Ohtani K, Amano Y, Kawai K, Fujimoto S.	4. 巻 11;27
2. 論文標題 Data on characteristics of reported cases of unilateral posterior reversible encephalopathy syndrome (PRES).	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Data Brief.	6. 最初と最後の頁 104648
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dib.2019.104648.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kihara A, Amano Y, Yoshimoto T, Matsubara D, Fukushima N, Fujiwara H, Niki T.	4. 巻 43(11)
2. 論文標題 Stromal p16 Expression Helps Distinguish Atypical Polypoid Adenomyoma From Myoinvasive Endometrioid Carcinoma of the Uterus.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Am J Surg Pathol.	6. 最初と最後の頁 1526-1535
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/PAS.0000000000001320.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshimoto T, Matsubara D, Soda M, Ueno T, Amano Y, Kihara A, Sakatani T, Nakano T, Shibano T, Endo S, Hagiwara K, Fukayama M, Denda-Nagai K, Irimura T, Mano H, Niki T.	4. 巻 110(9)
2. 論文標題 Mucin 21 is a key molecule involved in the incohesive growth pattern in lung adenocarcinoma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Sci.	6. 最初と最後の頁 3006-3011
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14129.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ozawa T, Tanaka R, Nagaoka R, Anan Y, Kim Y, Matsuzono K, Mashiko T, Koide R, Shimazaki H, Ohtani K, Amano Y, Kawai K, Fujimoto S.	4. 巻 185
2. 論文標題 Unilateral posterior reversible encephalopathy syndrome: A case report.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clin Neurol Neurosurg.	6. 最初と最後の頁 105493
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.clineuro.2019.105493.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 天野雄介, 松原大祐, 吉本多一郎, 仁木利郎
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌におけるPRMT5の発現解析
3. 学会等名 第106回日本病理学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 天野雄介, 松原大祐, 仁木利郎
2. 発表標題 頭頸部癌におけるPRMT5の局在
3. 学会等名 第28回日本臨床口腔病理学会総会・学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 天野雄介, 松原大祐, 木原淳, 吉本多一郎, 仁木利郎
2. 発表標題 頭頸部癌におけるPRMT5の局在
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 天野雄介, 松原大祐, 木原淳, 吉本多一郎, 仁木利郎
2. 発表標題 口腔癌におけるYAPの役割
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 天野雄介, 松原大祐, 木原淳, 吉本多一郎, 仁木利郎
2. 発表標題 胎児型肺腺癌との鑑別を要したHNF-4 陽性肺腺癌の一例
3. 学会等名 第107回日本病理学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 天野雄介, 松原大祐, 木原淳, 吉本多一郎, 仁木利郎
2. 発表標題 Expressions of YAP and phospho-YAP (S127) in oral cancer
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 天野雄介, 松原大祐, 木原淳, 吉本多一郎, 仁木利郎
2. 発表標題 The role of YAP expression in oral cancer
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 天野雄介, 仁木利郎	4. 発行年 2018年
2. 出版社 北隆館	5. 総ページ数 1
3. 書名 別冊B10 Clinica 慢性炎症と疾患 口腔疾患と慢性炎症	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----