

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K17276

研究課題名(和文)性差による口腔癌発症過程の違いとそれに基づく癌化予測についての研究

研究課題名(英文) Cancer risk prediction based on gender differences in carcinogenesis of the oral mucosa

研究代表者

阿部 史佳 (Ayaka, Abe)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：00718421

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：多発性口腔扁平上皮癌は口腔扁平苔癬の既往歴を有する女性患者に多いこと、さらに多中心性発癌が女性に多いことから、口腔発癌に男女差があることが示唆された。口腔扁平上皮癌のHPV感染率ならびにエストロゲン受容体発現に性差を認めなかったが、エストロゲン受容体は若年者よりも高齢者の口腔癌で発現が強い傾向であったことから、エストロゲン分泌の年齢的变化が同受容体発現と連関して癌増殖を維持する可能性が考えられた。口腔発癌過程での性ホルモン受容体発現は明らかにできなかった。また口腔発癌に関連する遺伝子領域のヘテロ結合性喪失を検索したが、口腔発癌のリスク予測につながる結果を得ることはできなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔扁平上皮癌の原因として最も重視されているのは喫煙であり、口腔癌は喫煙や飲酒習慣のある高齢男性に多い疾患とされてきた。近年、女性の口腔癌患者は増えているが、その理由を女性喫煙者の増加だけでは説明できない。本研究は、口腔扁平苔癬に続発する口腔多発癌は女性に多いこと、さらに口腔粘膜の多中心性発癌が女性に多いことを示した。このことから女性の口腔癌は、喫煙や飲酒が関係する男性の口腔癌とは異なる疾患背景を有することが示唆される。性差による口腔発癌のリスク予測についてはさらに研究が必要であるが、本研究で得られたデータは女性の口腔癌予防のための啓発活動につながる。

研究成果の概要(英文)：This research showed that multiple oral squamous cell carcinomas (OSCC) and multicentric cancerization were more prevalent in female patients than male ones, which suggested gender differences in oral carcinogenesis. There were no differences in the frequency of HPV infection and the intensity of estrogen receptors (ER) in tumor cells between male and female OSCC patients. However, ER expression of elder OSCC patients seemed to be more intense than that of younger ones, which might indicate that ER expression was regulated in accordance with serum estrogen level to maintain the growth of tumors. Alteration of ER receptor in the process of oral cancerization could not be clarified. Finally, we examined loss of heterozygosity in gene regions, which were previously found to be related with oral carcinogenesis, but could not determine markers to predict of oral cancer risk.

研究分野：口腔外科

キーワード：口腔癌 口腔潜在的悪性疾患 上皮性異形成 性ホルモン HPV感染 LOH

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

口腔癌は全癌中の 1~2%と比較的少ない癌腫ではあるが、口腔は摂食嚥下やコミュニケーションにおいて重要な働きを担い人間の QOL 維持に大切な役割を果たす。また進行した口腔癌では治癒後も顔面の形態にも大きく影響を与えるため、早期発見のみならず、予防法の確立が望まれる分野である。

口腔癌患者は年々増加傾向にあり、当科を受診した口腔癌患者も 1985 年は 12 例であったが、2013 年には 37 人と増加傾向にある。口腔がん検診などによる啓発活動や口癌治療法の進歩にもかかわらず、生存率に明らかな上昇は見られず、早期発見の重要性は極めて大きい。

また、男女ではホルモンバランスや生活習慣が異なることから病気の発症メカニズムが異なるため、このような男女差を医療に反映させようとする考えが注視されてきている。口腔においても性差により異なる臨床動態を示す疾患が見られる。口腔潜在的悪性疾患(OPMD)である口腔白板症は、その第一の原因が喫煙であり男性に多い疾患が、喫煙習慣のない女性にもしばしば発症し、男女で臨床動態の違いがあるのではないかと推察される。一方、口腔扁平上皮癌の 5~10%は同時性あるいは異時性に多発することが知られているが、多発性のものは女性に多い傾向である。このような口腔白板症、口腔扁平上皮癌(OSCC)の臨床動態の違いは、口腔発癌の過程に男女間で違いがあることを予想させる。

### 2. 研究の目的

性差により口腔発癌過程に違いがあるかを調べ、そのデータをもとに性差による口腔粘膜の癌化予測法を確立し、口腔癌の早期発見、早期治療に役立てることを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 口腔多発癌と OPMD の関連

当科で加療を行った口腔多発癌患者15例を対象とし、患者カルテより多発癌の発症のタイミング、口腔癌とOPMDの発症部位、該当患者の生活歴について検討した。

#### (2) 口腔癌周囲粘膜におけるスキップ異型上皮巢について

上皮性異形成が隣在する早期口腔癌 18 例(男性 12 例、女性 6 例)を対象に、癌と連続しない異型上皮巢の有無について HE 染色と抗サイトケラチン 17 抗体(抗 CK17 抗体)による免疫染色から検索した。

免疫染色：手術材料のホルマリン固定パラフィン薄切切片を用いて免疫染色を行った。1 次抗体の濃度、抗原賦活化処理は以下の通りである。2 次抗体で処理後、DAB にて発色した。

1次抗体：抗CK17抗体(Dako社 M7046) - 30倍希釈、4 Overnight、抗原賦活化処理：pH6.0 citrate buffer autoclave 121 15分

2次抗体：ヒストファインシンプルステイン MAX-PO(M)：ニチレイ社

#### (3) OSCC における HPV 感染

40 歳未満の OSCC26 例(男性 15 例、女性 11 例)について患者カルテより原発部位、TNM 分類、生活歴について調査し、HPV 感染の有無について検索した。HPV 感染については下記に示す抗体を用い、生検組織パラフィン切片の免疫染色により検索した。

免疫染色：生検組織のホルマリン固定パラフィン薄切切片を用いて免疫染色を行った。1 次抗体の濃度、抗原賦活化処理は以下の通りである。2 次抗体で処理後、DAB にて発色した。

1次抗体：抗 p16 抗体(abcam社 2D9A12) - 100 倍希釈、4 Overnight、抗原賦活化処理：pH6.0 citrate buffer autoclave 121 15分

2次抗体：ヒストファインシンプルステイン MAX-PO(M)：ニチレイ社

#### (4) OSCC における ER<sup>+</sup>、ER<sup>-</sup> の発現

(3) で対象とした 40 歳未満 OSCC26 例に加え、40 歳以上の OSCC 患者 9 例について、エストロゲン受容体(ER<sup>+</sup>)およびエストロゲン受容体(ER<sup>-</sup>)の発現について免疫染色を行い検討した。

免疫染色：生検組織のホルマリン固定パラフィン薄切切片を用いて免疫染色を行った。1 次抗体の濃度、抗原賦活化処理は以下の通りである。2 次抗体で処理後、DAB にて発色した。

1次抗体：抗 ER<sup>+</sup> 抗体 HC-20(Santa Cruz社 sc-543) - 50 倍希釈、4 Overnight、抗原賦活化処理：pH6.0 citrate buffer autoclave 121 15分

抗 ER<sup>-</sup> 抗体 B-3(Santa Cruz社 sc-373853) - 100 倍希釈、4 Overnight、抗原賦活化処理：pH6.0 citrate buffer autoclave 121 15分

2次抗体：ヒストファインシンプルステイン MAX-PO(M)または MAX-PO(R)：ニチレイ社

#### (5) OSCC および OPMD における LOH の検索

口腔発癌に関連してヘテロ接合性消失(LOH)が生じることが報告されている遺伝子領域の中から 9p21、17p13.1、3p14、3p21.3 の 4 領域について検索した。

DNA 抽出：Takara DNA エキストラクター® WB キット により染色体 DNA を抽出した。

使用プライマー：PCReady™プライマー：ユーロフィンジェノミクス社に作製を依頼した。

Markers	Locations	Size of PCR products (bp)	Sequence of primers
D9S171 sense	9p21	158 ~ 177	AGCTAAGTGAACCTCATCTCTGTCT
D9S171 antisense			ACCCTAGCACTGATGGTATAGTCT
TP53 sense	17p13.1	103 ~ 135	ACTGCCACTCCTTGCCCCATTTC
TP53 antisense			AGGGATACTATTACAGCCCAGGTTG
D3S1228 sense	3p14	84	TCCTTAACTCTTTCTCTGTGAGTTG
D3S1228 antisense			TCTAGGAAAGGGATTAGGAAGGA
D3S966 sense	3p21.3	147	TACCTCCTCACTGTTTCATATTAG
D3S966 antisense			CACATAGTATGTCTCGGCTAACAG

PCR 条件

9 p21

プレヒート	95	5 分間	} 40 サイクル
変性	95	50 秒間	
アニーリング	64	1 分間	
伸長	72	1 分間	
最終伸長	72	30 分間	

3p14

プレヒート	94	10 分間	} 35 サイクル
変性	94	1 分間	
アニーリング	60	2 分間	
伸長	72	1 分間	
最終伸長	72	1 分間	

17p13.1

プレヒート	95	5 分間	} 40 サイクル
変性	95	50 秒間	
アニーリング	65	1 分間	
伸長	72	1 分間	
最終伸長	72	30 分間	

3p21

プレヒート	94	5 分間	} 35 サイクル
変性	94	1 分間	
アニーリング	53	1 分間	
伸長	72	1 分間	
最終伸長	72	10 分間	

4 . 研究成果

( 1 ) 口腔多発癌と OPMD の関連

口腔多発癌15例の12例は同時性多発癌、3例は異時性多発癌であった。性別では男性4例、女性11例と女性に多く、初診時年齢は60 ~ 87歳(平均75.1歳)であった。OPMDは15例中11例(73.3%)の症例に認めた。その内訳は口腔扁平苔癬(OLP)が7例(46.7%)と最も多く、口腔白板症が3例(20%)、慢性口腔カンジダ症が1例(6.7%)であった。また性別とOPMDの関連は、OLPでは5例(71.4%)が女性、口腔白板症は3例いずれも女性、慢性カンジダ症の1例も女性であった。口腔癌の発症部位・発症順序とOPMDの部位は図1、表1のとおりである。生活歴について検討すると、3例で喫煙および飲酒習慣を認めたが、そのうちOPMDが指摘された患者は1例であった。

表1 口腔多発癌症例のまとめ

	性別	年齢	第1癌	第2癌	第3癌	OPMD	喫煙	飲酒	
異時性	A-1	女	81	右頬粘膜(81)	左下顎歯肉(87)	-	OLP	-	-
	A-2	女	85	左下顎歯肉(85)	右下顎歯肉(87)	-	OLP	-	-
	A-3	女	73	右上顎歯肉(73)	左舌(75)	-	OLP	-	-
	A-4	男	68	右上顎歯肉(69)	右下顎歯肉(70)	-	OLP	+	+
	A-5	女	79	左舌(79)	左口底(81)	右舌(87)	OLP	-	-
	A-6	男	73	左舌(73)	左下顎歯肉(77)	左上顎歯肉(78)	OLP	-	-
	A-7	女	69	右頬粘膜(69)	右上顎歯肉(71)	右下顎歯肉(76)	OLP	-	-
	A-8	女	77	両側下顎歯肉(77)	左頬粘膜(79)	-	Leukoplakia	-	-
	A-9	女	87	右下顎歯肉(87)	正中・左下顎歯肉(87)(多中心性)	-	Leukoplakia	-	-
	A-10	女	78	上顎歯肉(77)	上唇(85)	-	Candidasis	-	-
	A-11	女	78	右頬粘膜(78)	右上顎歯肉(82)	-	No	-	-
	A-12	男	67	右口底(68)	左頬粘膜(71)	-	No	+	+
同時性	B-1	女	76	左舌	右頬粘膜	右口腔底	Leukoplakia	-	-
	B-2	男	76	右下顎歯肉	左下顎歯肉	-	No	-	-
	B-3	女	60	右口腔底	右口蓋	-	No	+	+

( )内は発症時の年齢

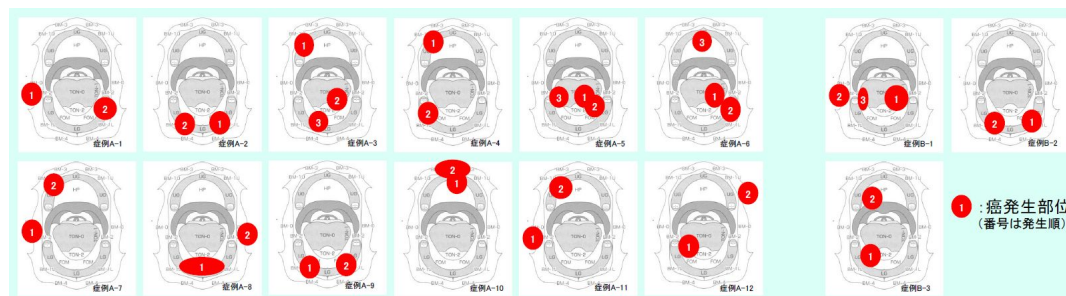
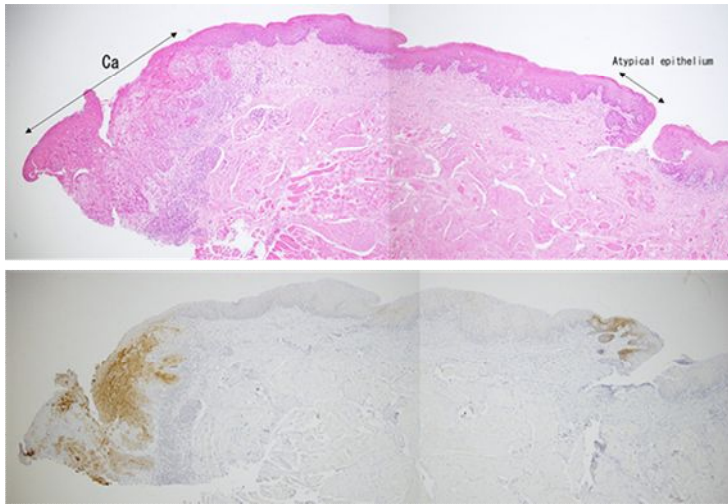


図1 : 口腔癌発生部位と順序(症例Aは異時性多発癌、Bは同時性多発癌)

(2) 口腔癌周囲粘膜におけるスキップ異型上皮巣について

上皮性異形成が隣在する早期口腔癌 18 例 (男性 12 例、女性 6 例)のうち 5 例で、健常粘膜上皮に口腔癌とは連続しないスキップ異型上皮巣を認めた。性別にみると、女性 6 例中 4 例 (66.7%)、男性 12 例中 1 例 (8.3%) と女性の口腔癌で頻度が高かった。図 2 は口腔癌から離れた部位にみられた異型上皮巣である。口腔癌の部位とスキップ異型上皮巣は抗サイトケラチン 17 抗体による免疫染色で陽性である。



このことは口腔多発癌が女性に多いことと合わせて注目すべき所見である。

図 2 口腔癌から離れた部位にスキップした異型上皮を認める (上段: HE 染色、下段: 抗 CK17 抗体による免疫染色)

(3) 口腔扁平上皮癌における HPV 感

40歳未満のOSCC26例についてHPV感染の有無を調べた。26例の性別は男性が15例 (57.7%)、女性が11例 (42.3%)であった。原発巣は舌が23例、下顎歯肉が1例、口腔底が1例、硬口蓋が1例、病期はStage 1/2が14例、Stage 3/4が12例であった。喫煙習慣は13例に認め、男性では11例 (77.3%)、女性では2例 (18.2%)であった (表2)。

HPV感染は15例 (57.7%) に認め、男性は8例 (53.3%)、女性は7例 (63.6%)であった。

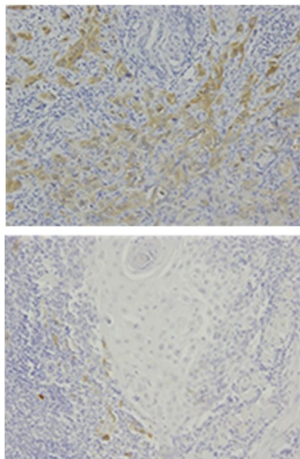


図 3 OSCC における p16 の発現 (上図: 陽性、下図: 陰性)

表 2 若年者 26 症例のまとめ

性別	年齢	初診年	原発巣	T	N	M	Stage	喫煙	飲酒	転帰
1 男性	38	1985	口腔底	4	0	0	A	+	+	AO
2 男性	39	1985	硬口蓋	4	0	0	A	+	+	AO
3 女性	26	1988	舌	2	0	0		-	-	DC
4 女性	34	1991	舌	3	1	0		-	-	AO
5 男性	33	1993	舌	2	0	0		-	-	AO
6 女性	31	1994	舌	3	0	0		-	-	AO
7 男性	38	1994	舌	2	0	0		+	+	AO
8 女性	27	1999	舌	1	0	0		-	-	AO
9 男性	33	2000	舌	2	1	0		-	+	AO
10 女性	38	2000	舌	4	1	0	A	+	+	AO
11 女性	36	2001	舌	2	0	0		-	-	AO
12 女性	39	2001	舌	1	0	0		+	+	AO
13 女性	37	2002	舌	3	2b	0	A	-	-	DC
14 男性	32	2009	舌	2	2	0	A	-	-	DC
15 女性	36	2010	舌	2	0	0		-	-	AO
16 男性	37	2010	舌	2	0	0		+	-	AO
17 女性	36	2011	舌	3	2b	0	A	-	-	AO
18 男性	28	2012	舌	1	0	0		+	+	AO
19 男性	29	2012	舌	2	0	0		+	+	AO
20 女性	38	2012	舌	3	0	0		-	-	AO
21 男性	34	2013	下顎歯肉	4	1	0	A	+	-	AO
22 男性	39	2013	舌	2	0	0		+	-	AO
23 男性	18	2014	舌	2	0	0		+	-	AO
24 男性	27	2015	舌	1	0	0		-	-	AO
25 男性	33	2015	舌	4	0	0	A	+	+	DC
26 男性	39	2015	舌	1	0	0		+	+	AO

(4) OSCCにおけるER、ERの発現

ERの発現は、口腔癌周囲の健常口腔粘膜上皮では基底層細胞の胞体または核に陽性を示した (図4-1)。癌の部分では発現が亢進し、すべての癌細胞胞体が陽性を示し、さらに一部の癌細胞の核が陽性であった (図4-2、3)。

ERの発現は、口腔癌周囲の健常口腔粘膜上皮では基底層細胞の核に弱い陽性を示した (図4-1)。口腔癌の部分では両者の発現が亢進し、癌細胞の核に陽性を示した (図4-2、3)。

ER、ERの発現と部位、病期、性別、喫煙習慣とで明らかな違いは捉えられなかった。

また40歳以上の口腔癌患者と40歳未満の患者では、40歳以上の患者の方がER発現がやや強い傾向であった。

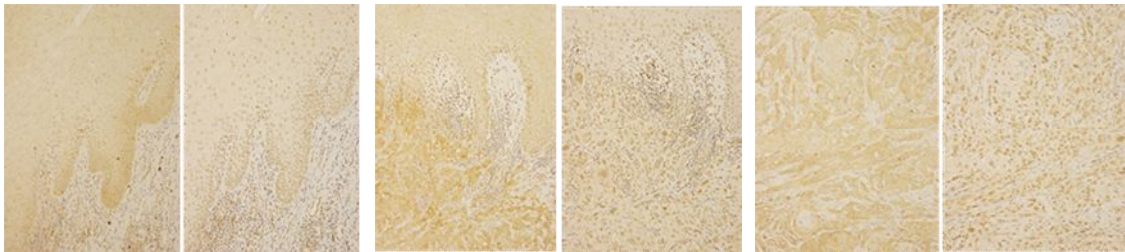


図 4-1 健常口腔粘膜における ER の発現 (左: ER、右: ER) 図 4-2 腫瘍への移行部の口腔粘膜における ER の発現(左: ER、右: ER) 図 4-3 腫瘍部分における ER の発現 (左: ER、右: ER)

(5) OSCC および OPMD における LOH の検索

OSCC並びにOPMDのパラフィン切片から抽出したDNAを用いてLOHを検出する前に、まず切除組織より抽出したDNAを用いてLOHの検出を行った。対象はOSCC7例(男性2例、女性5例)、OPMD 2例(いずれも口腔白板症で男性)である(表3)。

9p21のLOHを口腔癌4例、白板症1例で検出した。口腔癌の性別では男性の2例、女性の2例に9p21のLOHを認めた。17p13.1のLOHは、口腔癌の4例、白板症の2例で検出した。口腔癌の性別では男性の1例、女性の3例に17p13.1のLOHを認めた。3p21.3と3p14については、女性口腔癌の1例で3p14のLOHがみられたが、他の症例ではLOHを検出しなかった。また口腔癌の3例(男性1例、女性2例)と白板症の1例は9p21と17p13.1の両者にLOHを示していた。

次にパラフィン切片からDNAを抽出しPCRを試みたが、明瞭なバンドを得ることができなかった。これはDNA抽出量が少ないこと、ホルマリン固定によるDNA細断化の影響が考えられた。

表3 対象症例のまとめ

性別	疾患名	部位	LOH			
			9p21	17p13.1	3p14	3p21
#1 男性	扁平上皮癌	下顎歯肉	+	+	-	-
#2 男性	白板症	舌	-	+	-	-
#3 女性	扁平上皮癌	上顎歯肉	+	-	-	-
#4 男性	白板症	舌	+	+	-	-
#5 男性	扁平上皮癌	下顎歯肉	+	+	-	-
#6 女性	扁平上皮癌	下顎歯肉	+	+	-	-
#7 女性	扁平上皮癌	舌	-	-	-	-
#8 女性	扁平上皮癌	舌	-	-	-	-
#9 女性	扁平上皮癌	上顎歯肉	-	+	+	-

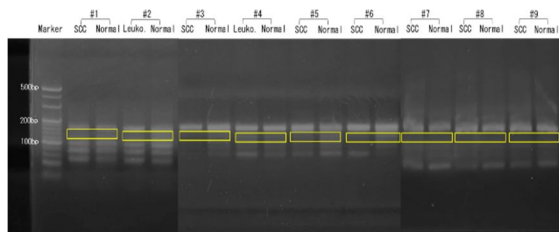


図5-1 9p21 LOH

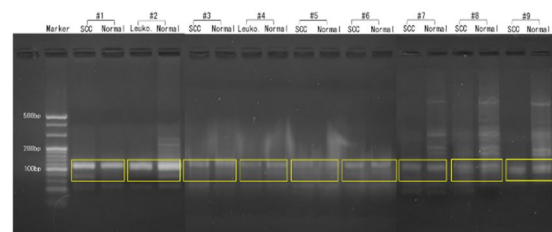


図5-2 17p13.1 LOH

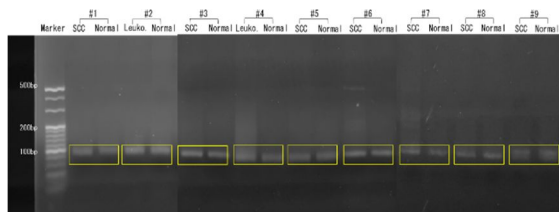


図 5-3 3p14 LOH

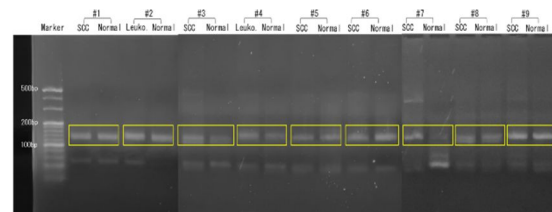


図 5-4 3p21 LOH

(6) まとめ

今回の研究結果より、以下の点が示唆された。

口腔多発癌患者において、OPMD 症例が女性では多く、男性では少なかったことから、女性の口腔発癌において OPMD が関与している可能性がある。

口腔癌周囲粘膜において、スキップした上皮性異形成巣を女性において高頻度に認めていたことから、女性では多中心性の発癌が起こりやすい。

OSCC における ER の発現は、若年者よりも 40 歳以上の患者で強い傾向であったことから、エストロゲン分泌が少ない閉経後の女性や男性において ER 発現が増強し、癌細胞の増殖を促進している可能性がある。

口腔扁平上皮癌ではp16タンパクの遺伝子が存在する9p21とp53タンパクの遺伝子が存在する17p13.1にLOHを半数に認めたが、症例数が少ないため性差とこれらの領域のLOHの関連を捉えることができなかった。また口腔白板症2例でもこの2領域にLOHが検出され、2例のうち高度異形成を伴う1例は両者にLOHを認めた。このことから白板症では異形成の出現がLOH増加と関連する可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 阿部史佳, 河野辰行, 川村和弘, 池田麻美, 内田佳奈, 後藤満帆, 佐藤裕太, 田嶋理江, 平野公彦, 河野憲司
2. 発表標題 口腔扁平苔癬を併発した口腔多発癌症例の臨床的検討
3. 学会等名 第63回（公社）日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ayaka Abe, Kenji Kawano
2. 発表標題 Multiple oral cancer in patients with oral lichen planus
3. 学会等名 2019 American Academy of Oral Medicine Annual Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 阿部史佳, 河野憲司
2. 発表標題 口腔多発癌の臨床的検討：口腔潜在的悪性疾患の関わりについて
3. 学会等名 第43回日本頭頸部癌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ayaka Abe, Kenji Kawano
2. 発表標題 Oral squamous cell carcinomas of young adults less than 40 years of age
3. 学会等名 2021 American Academy of Oral Medicine Virtual Annual Conference (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------