

令和 4 年 5 月 12 日現在

機関番号：17102
研究種目：若手研究
研究期間：2018～2021
課題番号：18K16895
研究課題名（和文）側頭骨癌におけるインフラマゾーム関連分子の網羅的解析による炎症性発癌機構の解明

研究課題名（英文）Molecular mechanism of inflammation-induced carcinogenesis in temporal bone squamous cell carcinoma

研究代表者
小宗 徳孝（Komune, Noritaka）

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：80529884
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）：側頭骨扁平上皮癌において、インフラマゾーム関連遺伝子の中のNLRP3の発現は、癌のステージが進行すると上昇する傾向にあることがわかった。特に、リンパ節転移症例では、リンパ節転移のない症例と比較して有意にNLRP3発現が上昇していることがわかった。また、NLRP3発現とEMT関連遺伝子との相関も示唆された。さらに、低栄養状態でのNLRP3の発現上昇が側頭骨扁平上皮癌細胞株で認められることから、NLRP3が何らかのパスウェイを活性化させることで、転移能の亢進に関与している可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

側頭骨悪性腫瘍の頻度は100万人に6人未満、頭頸部腫瘍の0.2%未満と報告されており、扁平上皮癌が主な組織型である。本研究では、側頭骨原発扁平上皮癌に着目し研究を行った。口腔・咽頭等の他の頭頸部扁平上皮癌はGenomic landscapeが発表され分子生物学的解析が進んでいるが、側頭骨原発扁平上皮癌の分子生物学的解析の報告は少ない。そのため、分子生物学的エビデンスの構築という面で、本研究の研究成果には学術的意義はあると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In temporal bone squamous cell carcinoma, the expression of NLRP3 among inflammasome-associated molecules tended to increase as the cancer stage progressed. In particular, NLRP3 expression was found to be significantly elevated in cases with lymph node metastasis compared to those without lymph node metastasis. A correlation between NLRP3 expression and EMT-related genes was also suggested. Furthermore, the increased expression of NLRP3 in low nutritional status was observed in temporal bone squamous cell carcinoma cell lines. Based on these data, it was suggested that NLRP3 may be involved in the enhancement of lymph-node metastatic potential by activating unknown pathway.

研究分野：頭蓋底外科

キーワード：側頭骨 扁平上皮癌 炎症性発癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

側頭骨悪性腫瘍の頻度は100万人に6人未満、頭頸部腫瘍の0.2%未満と報告されており、扁平上皮癌が主な組織型である。本研究では、側頭骨原発扁平上皮癌に着目し研究を行う。口腔・咽頭等の他の頭頸部扁平上皮癌はGenomic landscapeが発表され分子生物学的解析が進んでいるが、側頭骨原発扁平上皮癌の分子生物学的解析の報告は少ない。側頭骨扁平上皮癌の発生には慢性炎症が発癌に大きく寄与すると想定されているが、稀な疾患であるため詳細な解析がなされていないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究では、側頭骨原発扁平上皮癌において、生体の自然免疫応答において重要な機構であるインフラマゾームが、炎症性発癌及び癌進展に関与しているか否かを検討し、炎症性発癌及び癌進展のメカニズムの一端を明らかにする。さらに、発癌や癌進展に関わる分子マーカーの同定を目的とする。

3. 研究の方法

側頭骨扁平上皮癌、頭頸部扁平上皮癌（HPV陰性中咽頭癌および舌癌等）の手術もしくは生検検体から、RNAを抽出する。側頭骨原発扁平上皮癌、頭頸部扁平上皮癌（HPV陰性中咽頭癌）および正常患者耳介皮膚から抽出されたRNAにてマイクロアレイ（Agilent Technologies社の SurePrint G3 Human GE Microarray 8X60 v3）解析を行い、遺伝子発現を比較する。

側頭骨扁平上皮癌のパラフィン包埋切片を用いて、インフラマゾーム関連遺伝子の発現について免疫組織学的解析を行う。また、遺伝子の発現（タンパク質）と予後との相関を Kaplan-Meier 曲線を用いて解析する。

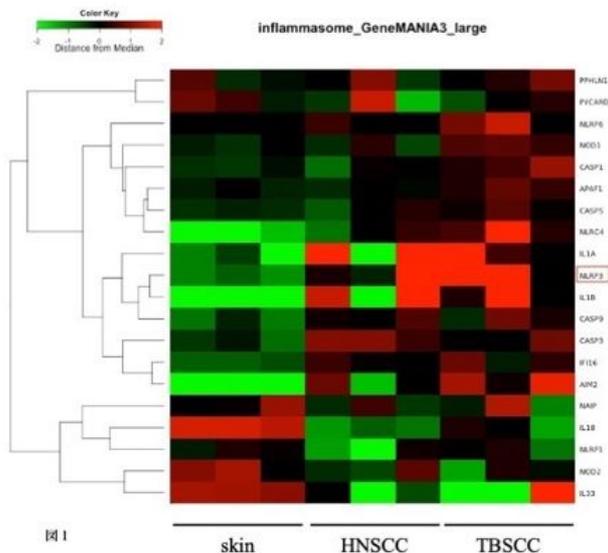
さらに、側頭骨扁平上皮癌検体を用いて、トランスクリプトーム解析をRNAseqを用いて行う。GO解析、GSEA解析などを行い、インフラマゾーム関連遺伝子と関連のあるホールマークの検索を行う。

新しく樹立した、ヒト側頭骨扁平上皮癌細胞株において、NLRP3の発現をqPCRおよびウエスタンブロットにて確認する。

4. 研究成果

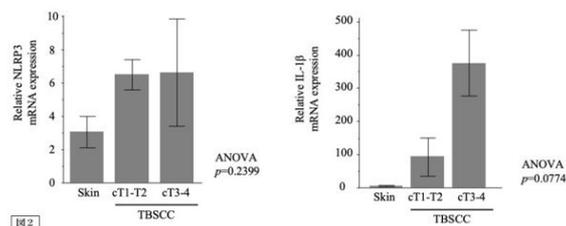
1. 側頭骨扁平上皮癌と頭頸部扁平上皮癌の遺伝子発現比較

手術にて採取された側頭骨扁平上皮癌 3 検体、正常耳介皮膚 3 検体、さらに HPV陰性中咽頭癌 3 検体から RNA を抽出して、マイクロアレイ解析を行った。その結果、他の頭頸部癌および耳介皮膚と比較して、NLRP3 の発現が上昇していることが確認できた (図 1)。そのデータを裏付けるために、TCGA (The cancer genome atlas) の Data Base から、頭頸部癌 SCC での inflammasome 関連分子の発現比較を行ったところ下咽頭癌、上顎癌、耳下腺癌において、下咽頭癌では、上顎癌と耳下腺癌と比べると NLRP3 の発現が低い傾向にあった。そのため、SCC の原発部位によって、inflammasome 関連分子の発現に特性がある可能性があることがわかった。側頭骨扁平上皮癌では、NLRP3 の発現が高いことがわかった。そのため、インフラマゾーム関連分子の中で、NLRP3 に着目して、解析をすすめる方針とした。



2. 側頭骨扁平上皮癌組織における NLRP3 の発現および予後との関連

側頭骨扁平上皮癌患者検体と耳介皮膚の NLRP3 および IL-1 (インフラマゾームシグナルにおいて下流の発現遺伝子) の mRNA の発現を定量 PCR で確認したところ、皮膚と比較して明らかにいずれの発現も上昇していることが確認できた。また、T1/2 症例と比較して、T3/4 症例の方が有意差はないものの発現が亢進する傾向が明らかとなった (図 2)。



NLRP3 の発現と予後の関連を調べるために、75 症例の側頭骨扁平上皮癌症例のパラフィン包埋切片の免疫染色を行い、NLRP3 のタンパク質の発現と予後との関連を解析した。NLRP3 の発現は主に、核ではなく細胞質にみられた。NLRP3 染色にて、がん細胞の細胞質はびまん性に染色された。予後との関連を調べるために、 Kaplan-Meier 曲線を作成して解析した。しかし、NLRP3 の高発現は、疾患特異的生存率にも全生存率においても、予後増悪因子ではなかった (図 3)。TCGA の Data Base では、他の頭頸部癌では、NLRP3 の高発現は予後との相関をみとめたため、本研究での症例が少ないことが、有意差として現れなかった可能性が考えられた。さらに詳細に

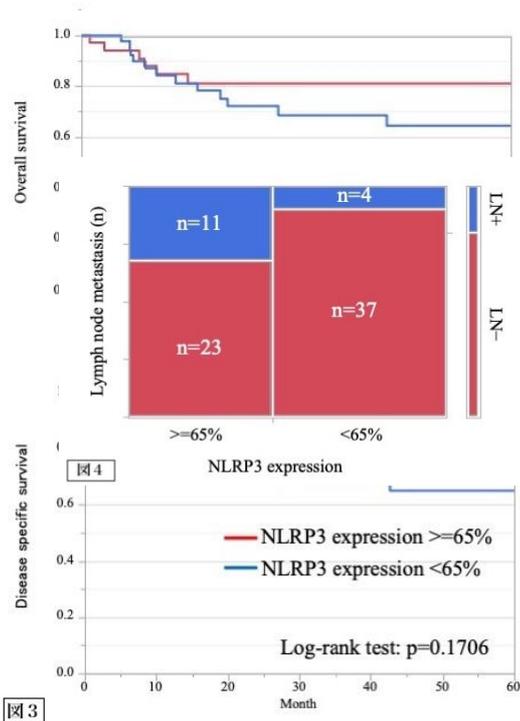


図 3

さらに詳細に

調べると、NLRP3 の発現が高い症例ほど、有意にリンパ節転移を認める症例が多いことがわかった。つまり、NLRP3 は、何らかのシグナルパスウェイを活性化することで、リンパ節転移をきたしやすくしている可能性が有ることが推察された(図 4)。

3. RNAseq を利用したトランスクリプトーム解析

さらに詳細な解析を行うために、側頭骨扁平上皮癌の手術症例 17 検体を用いて、RNAseq 解析を行った。RNAseq の結果、NLRP3 の遺伝子発現は、皮膚と比較して、発現が有意に上昇していることが再確認できた。さらに、NLRP3 の発現と、IL-1 の発現に正の相関を認めた。さらに、GSEA 解析を行ったところ、NLRP3 mRNA の発現上昇と正の相関をしめすホールマークは、Inflammatory response, TNFA signaling via NFkb, KRAS signaling, Epithelial mesenchymal transition などの 12 のホールマークで有意差を認めた。そのな NLRP3 の発現は、上皮間葉転換(EMT)の遺伝子群と相関していることがわかった(図 6)。

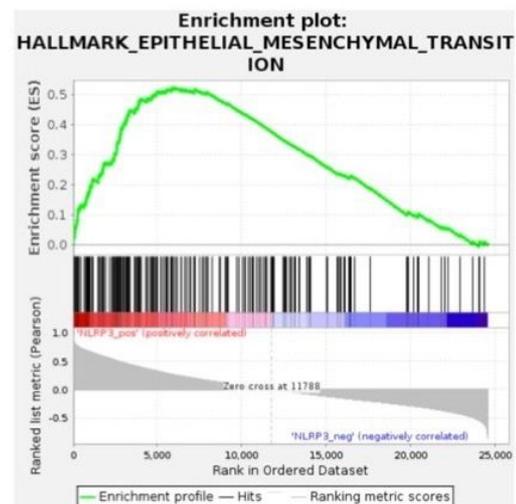


図6 NES=1.53, q=0.17

4. 新規ヒト由来側頭骨扁平上皮癌における NLRP3 の発現

我々研究グループは、ヒト由来側頭骨扁平上皮癌細胞株を樹立した。細胞株における NLRP3 発現を確認したところ、低栄養状態での培養条件において、NLRP3 の発現が上昇してくることが確認できた(図 7)。

上記の結果より、側頭骨扁平上皮癌において、インフラマゾーム関連遺伝子の中の NLRP3 の発現は、癌のステージが進行すると上昇する傾向にあることがわかった。

特に、リンパ節転移症例では、リンパ節転移のない症例と比較して有意に NLRP3 発現が上昇していることがわかった。また、NLRP3 発現と EMT 関連遺伝子との相関も示唆された。さらに、低栄養状態での NLRP3 の発現上昇が側頭骨扁平上皮癌細胞株で認められることから、NLRP3 が何らかのパスウェイを活性化させることで、転移能の亢進に関与している可能性があるかと仮説をたてた。今後詳細な解析を行うことで、NLRP3 インフラマゾーム機構を介した転移制御機構の解明を行っていきたい。

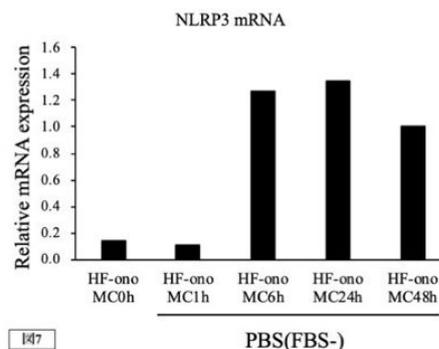


図7

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Komune Noritaka, Sato Kuniaki, Hongo Takahiro, Miyazaki Masaru, Masuda Shogo, Koike Kensuke, Uchi Ryutaro, Tsuchihashi Nana Akagi, Noda Teppei, Kogo Ryunosuke, Wakasaki Takahiro, Yasumatsu Ryuji, Nakagawa Takashi	4. 巻 -
2. 論文標題 Prognostic Significance of Systemic Inflammatory Response in Cases of Temporal Bone Squamous Cell Carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Laryngoscope	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/lary.29421	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9件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 小宗徳孝 宮崎健 中川尚志
2. 発表標題 側頭骨扁平上皮癌の解剖学的予後因子の解析
3. 学会等名 第32回 日本頭蓋底外科学会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 小宗徳孝
2. 発表標題 テーマセッション10「耳科外側頭蓋底外科：中耳手術を超えて」 TM10-2 頸静脈孔周囲のアプローチ
3. 学会等名 第30回日本耳科学会総会・学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 小宗徳孝
2. 発表標題 進行側頭骨癌の治療戦略について：進行外耳道扁平上皮癌を中心に
3. 学会等名 第43回日本頭頸部癌学会（招待講演）
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 小宗徳孝
2. 発表標題 En bloc modified subtotal temporal bone resection for advanced squamous cell carcinoma of the temporal bone
3. 学会等名 NASBS 2020 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 小宗徳孝
2. 発表標題 Surgical Anatomy of the Eustachian Tube for Endoscopic Transnasal Skull Base Surgery: A Cadaveric and Radiologic Study
3. 学会等名 第31回日本頭蓋底外科学会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 小宗徳孝
2. 発表標題 当科における側頭骨扁平上皮癌103例の臨床的検討
3. 学会等名 第29回 日本耳科学会 総会・学術講演会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 小宗徳孝
2. 発表標題 耳科手術シュミレーター Coxel-manを使用した術前準備と術後振り返りの流れ
3. 学会等名 第20回 耳鼻咽喉科手術支援システム・ナビ研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小宗徳孝
2. 発表標題 Collet-Sicard 症候群を呈した右内頸静脈血栓症後に診断された頸静脈孔 PEComa の一例
3. 学会等名 第28回 日本耳科学会 総会・学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小宗徳孝
2. 発表標題 頭蓋底に付着する筋膜構造の屍体解剖解析
3. 学会等名 第30回 日本頭蓋底外科学会
4. 発表年 2018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