

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K10354

研究課題名(和文) 癌関連線維芽細胞(CAF)を標的とした新しい口腔癌治療戦略の開発

研究課題名(英文) The novel therapeutic strategy for oral cancer targeting cancer-associated fibroblast

研究代表者

三上 俊彦(MIKAMI, Toshihiko)

新潟大学・医歯学系・非常勤研究員

研究者番号：90595745

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：舌扁平上皮癌N0症例を46例抽出し、全線維芽細胞に対する $\alpha$ -SMA陽性細胞の割合(CAF率)を算出した。低CAF率群と高CAF率群に対象を分け、頸部リンパ節後発転移をエンドポイントとして単変量(Log-Rank検定)および多変量解析(Cox比例ハザード分析)による統計学的検討を行った。全46例中、10例に後発転移を認め、低CAF率群は28例、高CAF率群は18例であった。単変量解析において高CAF率群は後発転移率が有意に高かったが、多変量解析においては後発転移に影響を及ぼす因子として選択されなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

当初は予防的頸部郭清の適応判断の補助としてCAF発現率が有用であるかを立証することが目的であったが、既知の危険因子も含めた多変量解析で独立した危険因子として選択されなかった。しかしながら、単変量解析ではCAF発現率が高い症例が有意に後発転移をきたしており、他の危険因子と組み合わせるなどの工夫でCAF発現率の有用性を見いだせると考えられる。生命予後とCAF発現の関連性については多く報告されているが、リンパ節転移との関連に着目して検討した報告は少ない。リンパ節転移を予測することは治療方針決定に重要であり、本研究結果をもとに多面的なリンパ節転移予測因子同定の一助となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We determined the ratio of  $\alpha$ -SMA positive cells to total fibroblasts (CAF ratio) in 46 cases of N0 tongue squamous cell carcinoma. Delayed cervical lymph node metastasis were observed in 10 of 46 cases. There were 28 cases in the low CAF rate group and 18 cases in the high CAF rate group. The end points were set as delayed cervical lymph node metastasis, and they were examined statistically by the log-rank test as univariate analysis and by the Cox proportional hazard model as multivariate analysis. As a result, the high CAF rate group had a significantly higher rate of delayed cervical lymph node metastases in univariate analysis, however, it was not confirmed as independent risk factors affecting delayed cervical lymph node metastases in multivariate analysis.

研究分野：口腔外科学

キーワード：癌関連線維芽細胞 口腔扁平上皮癌 頸部リンパ節転移

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

癌微小環境の主な構成成分である線維芽細胞は、癌関連線維芽細胞 (Cancer-Associated Fibroblast: CAF) と称され、癌の進展を多面的に促進させる事が実証されている。また、口腔扁平上皮癌の生命予後と CAF 発現との関連性については数多くの報告があるが、リンパ節転移との関連に着目して臨床病理学的に検討した報告は少ない。

### 2. 研究の目的

早期口腔扁平上皮癌における CAF の発現頻度を明らかにし、頸部リンパ節転移との関連性を臨床病理学的に解明する。

### 3. 研究の方法

#### (1)CAF の発現パターンの認識

新潟大学医歯学総合病院口腔再建外科において過去に手術単独治療をおこなった扁平上皮癌 NO 症例を抽出する。生検標本および外科切除標本のパラフィンブロックから連続薄切標本を作製し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色、抗  $\alpha$ -SMA 抗体、抗 vimentin 抗体を用いた免疫組織化学をおこない、CAF の発現パターンを比較検討する。CAF は癌間質に存在する線維芽細胞のなかで  $\alpha$ -SMA を発現しているものとして同定可能であり、同定が難しい場合は抗  $\alpha$ -SMA 抗体、抗 vimentin 抗体の二重染色法も行い確認する。CAF の発現頻度は全線維芽細胞数に対する CAF 数の割合 (CAF 率) を算出し詳細に検討する。

#### (2)臨床病理組織学的予後因子の解析

(1)と同じ連続切片で、頸部リンパ節転移危険因子を含めた既知の臨床病理組織学的予後因子として性別、T 分類、腫瘍分化度、腫瘍発育様式、腫瘍深達度、YK 分類、脈管 (リンパ管、血管) 侵襲の有無について解析する。血管、リンパ管の客観的同定には抗 CD31 抗体、抗 podoplanin 抗体を用いて免疫組織化学を行う。CAF 率は 50%未満のものを low score、50%以上を high score の 2 群に分類し、前述の各種臨床病理学的危険因子を含めて多変量解析による統計学的検討を行う。エンドポイントを頸部リンパ節後発転移とし、それぞれの危険因子としての CAF の有用性を明らかにする。

#### (3)CAF の定量

当院口腔外科を初診し手術単独治療を施行する口腔扁平上皮癌 NO 症例の生検標本の一部から線維芽細胞を単離培養し、定量 RT-PCR で  $\alpha$ -SMA の遺伝子発現量を定量する。線維芽細胞の単離には、組織片培養法を用いる。すなわち生検標本の腫瘍側から 5mm 角の真皮小片を 10%ウシ胎児血清添加培地に沈めて培養し、100%コンフルエントに達した段階で全線維芽細胞を採取して Isogen で total RNA を抽出する。クロロホルム抽出及びエタノール沈殿により RNA を精製した後、PrimeScript RT reagent Kit (Takara) を用いて cDNA を合成する。その後、SYBR Premix Ex Taq II (Takara) を用いて、リアルタイム PCR 装置により定量的 RT-PCR 反応を行う。標的遺伝子である  $\alpha$ -SMA の mRNA の発現は GAPDH で標準化して行い、各症例の  $\alpha$ -SMA 遺伝子発現量を測定する。

その後の前向き追跡調査で頸部リンパ節後発転移の有無を確認し、後発転移群と非後発転移群に分けて  $\alpha$ -SMA 遺伝子発現量につき比較検討を行う。頸部リンパ節後発転移に対する  $\alpha$ -SMA 遺伝子発現量カットオフ値を ROC 解析で決定し、生検標本 CAF 定量が潜在的リンパ節転移を予測しうることを証明する。

### 4. 研究成果

#### (1)CAF の発現パターンの認識

新潟大学医歯学総合病院口腔再建外科において 2009 年から 2017 年の 9 年間で手術単独治療をおこない、資料の整った扁平上皮癌 NO 症例、46 症例が抽出された。生検標本および外科切除標本のパラフィンブロックから連続薄切標本を作製し、HE 染色、抗  $\alpha$ -SMA 抗体、抗 vimentin 抗体を用いた免疫組織化学をおこない、CAF の発現パターンを比較検討した。

条件検討に予想以上に労力を要し、そのために必要な薄切標本作成に時間を要したが、浸潤癌の間質を中心に CAF の発現を認めた (図 1)。

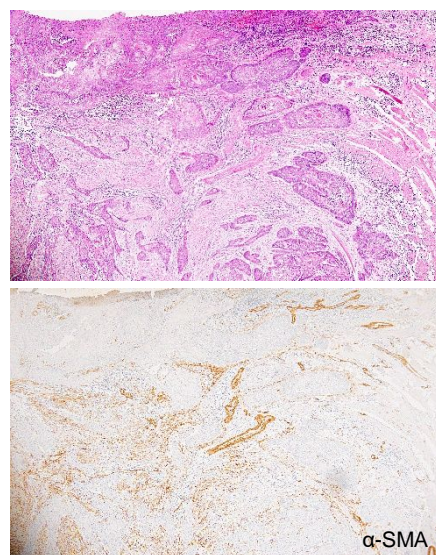


図 1. 癌間質に  $\alpha$ -SMA 強陽性を認める症例

## (2)臨床病理組織学的予後因子の解析

全 46 症例中、10 症例に後発転移を認め、CAF low score 群は 28 症例、CAF high score 群は 18 症例であった。CAF low score 群に比較して CAF high score 群は単変量解析において有意に後発転移率が高かった ( $p < 0.01$ ) (図 2) が、多変量解析においては頸部リンパ節後発転移に影響を及ぼす因子として選択されなかった。

当初は予防的頸部郭清の適応判断の補助として CAF 発現率が有用であるかを立証することが目的であったが、既知のリスク因子も含めて多変量解析を行ったところ独立した危険因子として選択されなかった。しかしながら、単変量解析においては CAF 発現率が高い症例が有意に後発転移をきたしており、他の危険因子と組み合わせて評価を行うことで有用性を見いだせる可能性が示唆される。

口腔扁平上皮癌の生命予後と CAF 発現との関連性については数多くの報告があるが、リンパ節転移との関連に着目して臨床病理学的に検討した報告は少ない。リンパ節転移を予測することは治療方針決定に重要であり、本研究結果をもとに多面的なリンパ節転移予測因子同定の一助とされたい。

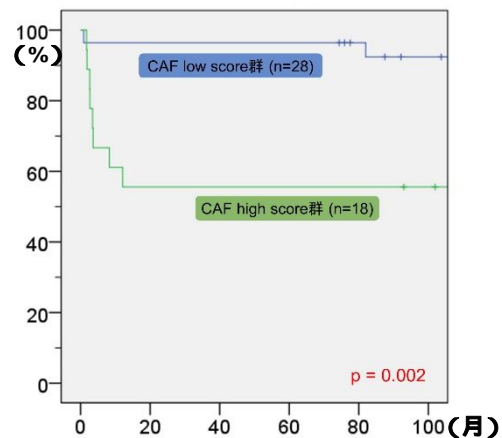


図 2. エンドポイントをリンパ節後発転移とした生存曲線 (非後発転移率)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	新美 奏恵  (NIIMI Kanae)  (20397136)	新潟大学・医歯学総合病院・准教授   (13101)	
研究分担者	船山 昭典  (FUNAYAMA Akinori)  (80529686)	新潟大学・医歯学総合病院・講師   (13101)	

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