

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 5 年 6 月 18 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K19195

研究課題名（和文）口腔扁平上皮癌の予後とMaspinの細胞質発現およびその役割

研究課題名（英文）Prognosis of oral squamous cell carcinoma and cytoplasmic expression of Maspin and its role

研究代表者

川崎 誠（KAWASAKI, Makoto）

鳥取大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：80816372

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：鳥取大学医学部附属病院歯科口腔外科にて口腔扁平上皮癌の手術を行った患者に対して予後調査を行い、Maspinの免疫染色を行いその局在について調査した。Maspinが細胞質に局在している場合他の患者と比較し有意に予後不良であった。また細胞株を用いてMaspinの局在を調査したところ、Maspinが細胞質および核で発現しているHSC4という細胞株で、Maspinの発現を抑えることで浸潤能が増殖した。この結果より細胞質および核に発現しているMaspinが腫瘍抑制的に機能していると考えられる。これらの結果を各学会や論文として発表を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔扁平上皮癌においてMaspinと予後についての調査はいくらかあるが、その局在まで検討している文献は確認できなかった。他の癌腫では報告がある一方、口腔扁平上皮癌において細胞質に局限したMaspinが予後不良であることをわれわれが初めて報告した。このことにより今後口腔扁平上皮癌の患者にMaspinの局在を調べ、Maspinが細胞質に局限した場合Maspinを抑制することのできる分子標的薬で患者の予後を改善できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We investigated the prognosis of patients who underwent surgery for oral squamous cell carcinoma at the Department of Dentistry and Oral Surgery, Tottori University Hospital, and investigated the localization of Maspin by immunostaining. When Maspin was localized in the cytoplasm, the prognosis was significantly worse compared with other patients. We also investigated the localization of Maspin using cell lines, and found that in the HSC4 cell line, in which Maspin is expressed in the cytoplasm and nucleus, suppression of Maspin expression increased the invasive ability. These results suggest that Maspin, which is expressed in the cytoplasm and nucleus, functions as a tumor suppressor. These results were presented at academic conferences and as papers.

研究分野：歯科口腔外科

キーワード：Maspin squamous cell carcinoma immunostaining Subcellular localization oral cancer

1. 研究開始当初の背景

わが国では口腔癌は癌全体の約 1%を占めており、口腔癌の中では舌癌が 60%以上を占める。口腔はその表面が扁平上皮からなる粘膜に被覆されており、病理組織学的には 90%以上が扁平上皮癌を占める。その治療成績は、5 年生存率で Stage 85~95%、Stage 80~85%、Stage 60~75%、Stage 40~50%と報告されている。National Comprehensive Cancer Network のガイドラインで頭頸部癌の手術可能な症例は全例手術が推奨されており、術後補助治療は TNM 分類や切除標本の病理情報によって決定されるが症例によっては放射線や化学療法の必要性の有無を必ずしも規定しないこともあり、臨床の現場で術後補助療法として放射線や化学療法を行うか苦慮することもある。

セリンプロテアーゼインヒビター的一种である Maspin は正常乳腺上皮細胞で発現しており、癌の進展に伴い、発現が減少する遺伝子として単離された。この遺伝子を癌細胞で過剰発現させると細胞増殖、遊走能、浸潤能の減少を誘導したことから、癌抑制遺伝子として機能していると考えられており、そのメカニズムとして血管新生抑制やアポトーシス促進タンパク質 BAX の発現亢進に伴うアポトーシス誘導などが報告されている。これらの結果から、Maspin は癌の発生や進展に重要な遺伝子であるとされており、癌治療や発癌過程の解析に有用であると考えられてきた。しかし、乳癌患者などの癌組織における細胞質局在型 Maspin 発現は、癌抑制遺伝子と相反する癌遺伝子に似た振る舞いを示すことが近年の研究で明らかになってきた。また、大腸癌やメラノーマ患者の癌組織においても Maspin 高発現患者は予後不良であることが報告されている (Snoeren N, et al. Br J Cancer 2013, Martinoli C, et al. Mod Pathol 2014)。さらに、Maspin の過剰発現による癌抑制効果が認められないといったこれまでとは逆の研究結果も報告されてきている (Teoh SS, et al. Nat Commun 2014)。

これらの知見から、これまで癌抑制遺伝子であると考えられていた Maspin は一部の癌腫では癌遺伝子として機能していると考えられる。その原因として、Maspin が細胞質に局在している場合予後不良になるということ仮定した。

2. 研究の目的

これまで、癌抑制遺伝子であると考えられていた Maspin は、それが細胞質に局在する場合全く逆の癌遺伝子として働いていることが近年の研究結果から推測される。今回の予備実験でも矛盾しない結果であった。このことから、Maspin の局在と癌の悪性度の関連、局在の変化を誘導する因子の解明は、基礎研究のみならず予後予測や癌治療などの臨床面においても極めて重要であると考えられる。

実際の口腔扁平上皮癌患者の Maspin の免疫染色を行い、その予後を調査することで口腔扁平上皮癌患者の Maspin の細胞質局在における予後を確認する。また、口腔扁平上皮癌の細胞株を用いて Maspin の発現や局在を調べ、その細胞株で Maspin の発現を抑制した場合の機能を調べることである。

3. 研究の方法

対象患者は 2005 年 1 月から 2015 年 12 月までの間に鳥取大学医学部附属病院歯科口腔外科で手術を行った口腔扁平上皮癌の一次症例 127 例のうち、術前化学療法にて口腔癌取り扱い規約第 2 版での治療効果グレード 2 以上の有効性を示した症例 9 例、術前放射線治療あるいは超選択的動注化学療法を行った症例 29 例、免疫染色後の癌細胞が明瞭に同定できなかった症例 9 例、合計 47 例を除外した 80 例を解析対象とした。研究デザインは電子カルテをもとに診療情報収集する後ろ向き研究のデザインで統計解析は IBM 社の SPSS スタティスティックスバージョン 25 を使用し、P が 0.05 未満の時に有意差ありと判定した。同意取得は鳥取大学医学部附属病院ホームページでの公開によるオプトアウト法で行い、鳥取大学医学部の倫理審査委員会での承認を得ている。

免疫染色については、使用した標本はすべて手術標本を用いている。抗体は抗ヒトマスピンモノクローナル抗体であるクローン EAW24 を使用した。コントロールは Maspin が通常発現している乳腺の正常筋上皮細胞を用いた。Maspin の発現を細胞内局在で分類し、細胞質のみに染色した細胞が腫瘍全体の 10%以上を占めた症例を Maspin 陽性と定義した。

また、免疫染色での臨床病理学的検討に加え、ヒト口腔扁平上皮癌細胞株を用いた in vitro の研究を行った。ヒト口腔扁平上皮細胞株：HSC2、HSC3、HSC4、Ca9-22、SAS を用いて、定量的リアルタイム PCR、ウエスタンブロット法を行い Maspin の発現を解析した。また、上記の細胞株を subcellular protein fractionation kit を用いて核と細胞質に分画し、Western blot 法にて核と細胞質それぞれの Maspin の発現を解析し、Maspin の局在を調査した。HSC3、HSC4 において、Maspin をターゲットとした siRNA でトランスフェクションを行い、Maspin の発現を抑制した状態で浸潤能の解析を行った。浸潤能の解析は 3 回ずつ行っている。

4. 研究成果

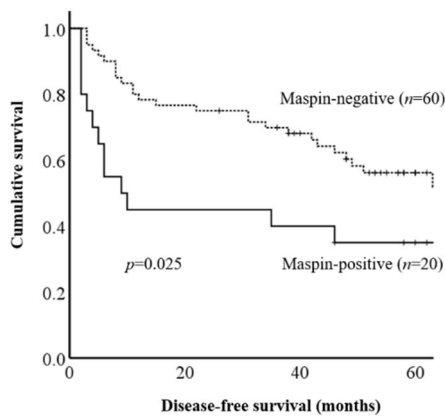


図 1

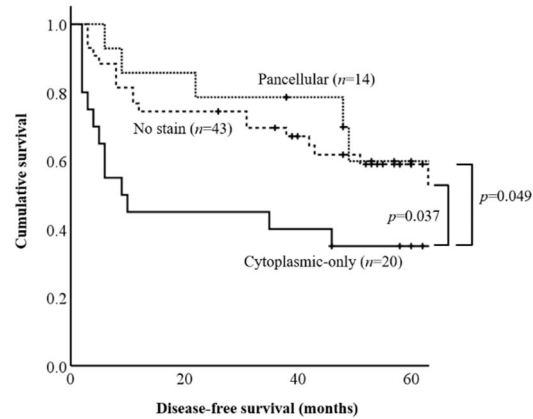


図 2

Maspin の発現と局在によって、細胞質のみ、cytoplasmic-only が 20 例、核および細胞質、pancellular が 14 例、核のみ、nuclear-only が 3 例、染色なし、no stain が 43 例で、それぞれの予後について調査した結果、図 1 のように細胞質のみ (Maspin-positive) とその他の群 (Maspin negative) を比較したところ、細胞質のみの群がその他の群と比較し有意に腫瘍特異的生存期間が短かった。また図 2 のように細胞質のみと、核および細胞質、染色なしの群とそれぞれ比較したところ、これらについても細胞質のみが有意に予後が不良であった。また年齢、原発腫瘍の大きさ、リンパ節転移の有無、Maspin の状態 (Maspin positive と negative) の比較で多変量解析を行ったところ Maspin の状態の因子のみで有意差を認めた。これらより、Maspin の細胞質局在が無病生存期間において独立した予後不良因子であることが結論付けられた。

また、口腔扁平上皮癌細胞株を用いた研究について、HSC2、HSC3、HSC4、Ca9-22、SAS の細胞株について、アクチンをコントロールに定量的リアルタイム PCR、ウエスタンブロットを行い Maspin の発現量を解析した。全ての細胞株で Maspin の mRNA とタンパク質発現を認めた。また細胞株を核および細胞質に分画し、Westernblot を行ったところ、全ての細胞株で核および細胞質に Maspin のタンパク質発現を認めた。このうち、HSC4 において、Maspin をターゲットとした siRNA をトランスフェクションしたところ HSC4 では有意に浸潤能の増加がみられた。HSC4 においては、pancellular に発現する maspin が浸潤能の抑制に働いていた可能性を示唆した。

この結果を学会発表および論文として発表を行った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 KAWASAKI MAKOTO、SAKABE TOMOHIKO、KODANI ISAMU、UMEKITA YOSHIHISA	4. 巻 41
2. 論文標題 Cytoplasmic-only Expression of Maspin Predicts Poor Prognosis in Patients With Oral Squamous Cell Carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 4563～4570
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancer.15269	査読の有無 無
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2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 川崎 誠
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌患者におけるmaspinの細胞内局在の臨床的意義
3. 学会等名 第109回日本病理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川崎 誠
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌におけるmaspinの細胞内局在の臨床的意義
3. 学会等名 日本口腔外科学会
4. 発表年 2019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
---------	---------