

機関番号：32404

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008~2010

課題番号：20592145

研究課題名(和文) 口腔扁平上皮癌の進展と上皮間葉移行に関する研究

研究課題名(英文) Study on progression and epithelial mesenchymal transition of oral squamous cell carcinoma

研究代表者

草間 薫 (KUSAMA KAORU)

明海大学・歯学部・教授

研究者番号：20130479

研究成果の概要(和文)： 口腔扁平上皮癌における上皮間葉移行：epithelial-mesenchymal transition (EMT)の関与を明らかにする目的でEMTの関連因子であるTGF- β , E-cadherin, Snailおよびvimentinについて免疫組織学的検索を行い、臨床病理学的事項との相関性について検討し、さらに頭頸部扁平上皮癌由来細胞株を用い、EMT関連因子の遺伝子発現について検索した。その結果TGF- β は57例中44例(77.2%)で発現がみられたが、E-cadherinの発現減少・消失は全ての症例でみられ、特に腫瘍浸潤部で明らかであった。一方、vimentinの陽性反応を認めたのは57例中9例(15.8%)と少数例であったが、この間葉系マーカーの発現は腫瘍浸潤部に限られ、E-cadherinの発現減少・消失部位と一致していた。Vimentin発現の制御のメカニズムについては未だ不明であるが、E-cadherinと同様にTGF- β 誘導によるEMTが誘導されていることが考えられた。Snail発現は57例中36例(63.1%)で認められたが、いずれも癌細胞の細胞質に弱い反応を示したのみであり、標的因子であるE-cadherinの発現様式との間に関連性はみられなかった。

頭頸部扁平上皮癌由来細胞株をTGF- β で刺激し、real time RT-PCRにて各因子のmRNAレベルの発現を経時的に検索した結果、3種類の細胞株ともSnailの発現にはほとんど変化を認めなかったが、Ca9-22ではvimentin mRNA発現の著しい増加が、KBではE-cadherin mRNA発現の著しい減少がみられ、これらの発現動態は各細胞株によって異なっていた。口腔扁平上皮癌ではTGF- β 誘導によるEMTが不完全ながらも生じており、E-cadherinの発現減弱にはSnail以外の転写抑制因子が関与することが考えられた。また、Snailの発現や活性は様々なシグナル伝達経路によって制御され、口腔扁平上皮癌におけるEMTはそれぞれ症例により異なっており、EMTとは関係なく、その進展にpodoplanin発現が関与すると思われる例もあることが示された。

研究成果の概要(英文)： To clarify the association of epithelial-mesenchymal transition (EMT) with progression of oral squamous cell carcinoma (OSCC), the expression of transforming growth factor β (TGF- β), Snail, E-cadherin and vimentin was examined in 57 cases of oral SCC by an immunohistochemical method. TGF- β expression was demonstrated in 77.2% of cases, Snail in 63.2% and vimentin in 15.8%, respectively. Reduction or loss of E-cadherin expression was found in all cases. Localization of vimentin expression was overlapped with the reduction or loss of E-cadherin expression, but not with that of Snail expression. The expression of TGF- β , E-cadherin and vimentin was not correlated with any clinicopathological findings or invasive front grading (IFG). Analyses by real time RT-PCR using cell lines derived from head and neck cancers revealed the increased vimentin mRNA expression in Ca9-22 cells and significantly decreased E-cadherin mRNA expression in KB cells were demonstrated. HSC-3 cells showed slight increased Snail mRNA expression, but there was no change of vimentin and E-cadherin mRNA expressions. These findings suggest that TGF- β induced-EMT is involved in the progression of oral SCC, and reduction of E-cadherin expression may be associated with transcriptional repression factors other than Snail. EMT in OSCC occurred differently in each case and there were some OSCC cases which podoplanin expression is involved in the progression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：口腔病理学

1. 研究開始当初の背景

上皮間葉移行 Epithelial-mesenchymal transition (EMT) は、上皮細胞が間葉様細胞に形質転換する現象であり、原腸陥入や神経堤形成、心臓や腎臓、口蓋などの器官形成に関与するといわれている。EMT を獲得した上皮細胞は、細胞外基質に変化が生じて運動性が亢進し、その形態は紡錘形の線維芽細胞様に転ずる。また近年では、EMT が線維症や癌の浸潤・転移などに関与することが報告されている。

この EMT の指標としては、上皮系マーカーの発現抑制、間葉系マーカーの発現上昇、運動性や浸潤能の亢進が挙げられている。Transforming growth factor- β (TGF- β) は主に、上皮細胞に対する強力な増殖抑制作用と間葉系細胞に対する増殖促進作用を示すことから、EMT 誘導における最も重要な因子として考えられている。上皮系マーカーの代表である E-cadherin は上皮細胞における接着装置であり、癌細胞に浸潤抑制作用を示すことは良く知られている。そのため、E-カドヘリンの発現抑制は EMT 獲得の一つの指標とされている。E-cadherin の転写抑制因子は多数存在し、主に TGF- β によって制御されている。Zinc-finger 型転写因子の一つである Snail は TGF- β の誘導により発現が増加し、

E-cadherin のプロモーター領域に直接結合してその転写を強力に抑制することから、EMT の代表的な誘導因子と考えられている。また、間葉系細胞の中間径細胞骨格である vimentin の発現は cytokeratin の down regulation と関係し、EMT 移行細胞の線維芽細胞様変化における標準的なマーカーとされ、その発現は予後と相関することが考えられている。しかしながら、口腔顎顔面領域の扁平上皮癌における EMT の関与についての詳細は未だ不明である。

2. 研究の目的

EMT の主要な因子である TGF- β , Snail, E-cadherin, vimentin の口腔扁平上皮癌における発現について免疫組織化学的検索を行ない、臨床病理学的因子との相関性について検討し、さらに頭頸部扁平上皮癌由来細胞株を用いて関連因子の遺伝子発現について検索することにより口腔扁平上皮癌における EMT の関与を明らかにすることを目的とする。また、EMT 以外の関与に関しても模索する。

3. 研究の方法

(1) 口腔扁平上皮癌症例

検索対象は 1999 年から 2004 年の 5 年間に本分野で取り扱った、未加療の口腔扁平上皮癌の生検材料 57 例を用いた。症例の内訳

は男性 42 例，女性 15 例，平均年齢は 63.9±12.6 歳，部位は歯肉 27 例，舌 19 例，頬粘膜 6 例，口底 3 例，口蓋 1 例，口唇 1 例であった。試料は 10%中性緩衝ホルマリン溶液で固定後，パラフィン包埋を行い，薄切切片を作製して，H-E 染色により病理組織学的検索を行った。各症例は UICC の TNM 悪性腫瘍の分類に従って評価を行った。また，遠隔転移を生じた症例はないため M 因子は項目から除外した。腫瘍浸潤部の形態学的評価は Bryne らの *invasive front grading* (IFG) 分類に従って悪性度を分類した。なお，本研究を行なうにあたり，明海大学歯学部倫理委員会の承認を得た（承認番号 A0313 号）。

（2）免疫組織化学的検索

免疫組織化学的検索は streptavidin-peroxidase biotin complex method により行った。通法に従い，切片を脱パラフィン後，内因性ペルオキシダーゼ活性を阻止するために 0.3% H_2O_2 加メタノールを室温で 20 分間処理した。流水およびリン酸緩衝液（PBS: phosphate buffered saline, pH 7.4）で洗浄後，抗原性の賦活化を目的として，Bankfalvi らの方法に従い 0.01M クエン酸緩衝液（pH 6.0）中でオートクレーブ処理を 120°C で 10 分間行った。60 分間の放冷後，PBS で洗浄し，非特異的反応の阻止のため 2% bovine serum albumin (BSA) を用いて室温で 15 分間処理を行った。1 次抗体としては vimentin, E-cadherin, Snail, TGF- β および podoplanin に対する抗体を室温で 60 分間反応させた。PBS にて洗浄後，2 次抗体として biotinylated anti-mouse IgG horse antibody, biotinylated anti-rabbit IgG goat antibody および biotinylated anti-goat IgG rabbit antibody を室温で 30 分間作用させた。再び PBS にて洗浄後，

streptavidin-peroxidase を 200 倍希釈し，室温で 30 分間作用させた。PBS にて洗浄後，発色は 0.01% H_2O_2 加 3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride 溶液で行った。次いで，Mayer のヘマトキシリンで核染色を行い，正常の口腔粘膜上皮の反応性と比較検討した。陰性対照標本は 1 次抗体の代わりに PBS を反応させ同様に染色し，非特異的な呈色反応のないことを確認した。

（3）統計学的分析

免疫組織化学的検索の結果と臨床病理学的因子および *invasive front grading* (IFG) の相関性については， χ^2 検定（有意水準 5%）を用いて統計学的分析を行った。

（4）Real time reverse transcriptase polymerase chain reaction (Real time RT-PCR) 法

頭頸部扁平上皮癌由来細胞株 Ca9-22, KB および HSC-3 をそれぞれ 5×10^4 個/ml で播種し，rhTGF- β_1 を 10ng/ml の濃度になるように 10% fetal bovine serum (FBS) 加 RPMI 1640 培地中で 37°C，5% CO_2 の条件下で 0, 24, 48, 72 時間培養した。その後，RNA iso にて Total RNA を抽出し，PrimeScript RT reagent Kit にて逆転写反応を行い，cDNA を合成した。得られた cDNA に SYBR Premix Ex Taq および mRNA 検出のためのプライマーを加え Thermal Cycler Dice Real Time System にて real time RT-PCR を行った。各 mRNA の発現量は GAPDH mRNA の発現量によって補正し，相対値として評価した。

4. 研究成果

（1）免疫組織化学的検索

免疫組織化学的検索の結果，TGF- β に対する反応は 57 例中 44 例 (77.2%) に認められ，その局在は腫瘍細胞の細胞質にみられた。

Snail に対する反応は 57 例中 36 例 (63.2%) にみられ、その局在は腫瘍細胞の細胞質に認められた。E-cadherin に対する反応は腫瘍細胞の細胞膜に認められたが、その発現減弱は 57 例中 37 例 (64.9%) でみられ (Fig. 1)、残りの 20 例 (35.1%) では消失を認められた。

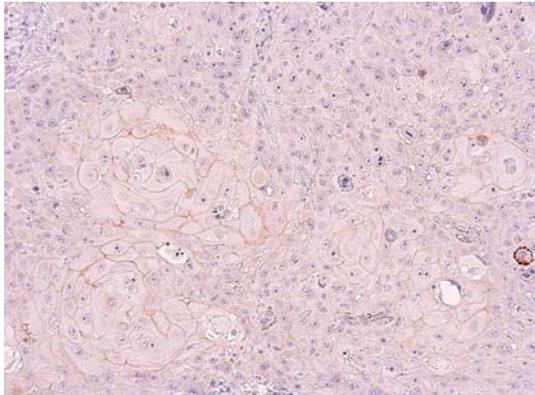


Fig. 1 E-cadherin に対する反応は腫瘍細胞の細胞膜に認められるが、発現の減弱がみられる。

Vimentin に対する反応は 57 例中 9 例 (15.8%) のみでみられ、その局在は腫瘍浸潤部における腫瘍細胞の細胞質や細胞膜に認められた (Fig. 2)。また、vimentin 陽性症例では、vimentin の発現部位に相当して E-cadherin の発現減弱あるいは消失を認められた (Fig. 1, 2)。

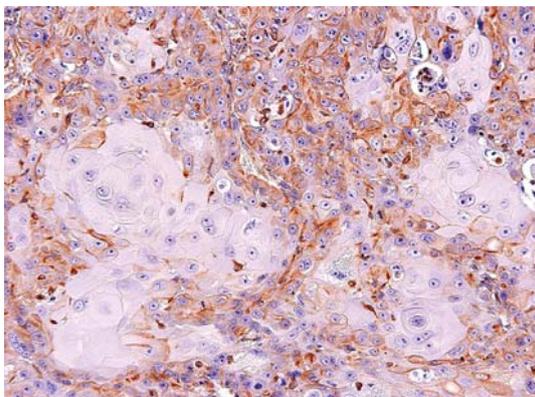


Fig. 2 Vimentin 陽性部位は E-cadherin の発現減弱部位に相当する。

一方、podoplanin に対する反応はほとんどの症例で基底の細胞に相当する腫瘍細胞の細胞膜および細胞質に認められた (Fig. 3)。

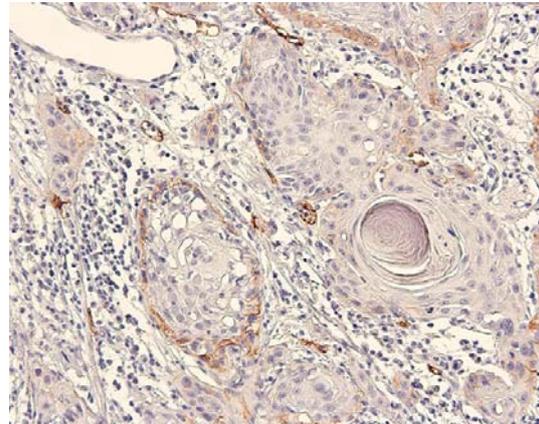


Fig. 3 Podoplanin に対する反応は基底の細胞に相当する腫瘍細胞の細胞膜および細胞質に認められる。

(2) 統計学的分析

免疫組織化学的検索の結果と臨床病理学的事項および IFG との関係については、統計学的分析の結果、臨床病理学的事項および IFG と TGF- β 、E-cadherin および vimentin の発現に関連性はみられなかった。

(3) Real time RT-PCR 法

Ca9-22 では TGF- β の添加により、vimentin mRNA 発現の著しい増加が認められた。一方、E-cadherin および Snail mRNA の発現に変化はなかった。KB では TGF- β の添加によって、E-cadherin mRNA 発現の著しい発現抑制が認められた。しかし、vimentin および Snail mRNA の発現に変化はなかった。HSC-3 では、Snail mRNA のわずかな増加傾向がみられたが、vimentin および E-cadherin の発現に変化はなかった。また、podoplanin 発現についてはそれぞれの培養株でみられたが、特に HSC-3 では強く認められた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

- ① Gonzalez-Alva P, Tanaka A, Oku Y, Yoshizawa D, Itoh S, Sakashita H, Ide F, Tajima Y, Kusama K, Keratocystic odontogenic tumor: a retrospective study of 183 cases. J Oral Sci 査読有 50 (2), 2008, 205-212
- ② Gonzalez-Alva P, Miyazaki Y, Tanaka A, Oku Y, Itoh S, Sakashita H, Ide F, Tajima Y, Kusama K, A comparative study of sporadic and multiple keratocystic odontogenic tumor: a review of 196 tumors. J Meikai Dent Med 査読有 37 (2), 2008, 114-121
- ③ Gonzalez-Alva P, Tanaka A, Oku Y, Okamoto E, Miyazaki Y, Yoshida N, Kaneko T, Tajima Y, Ide F, Sakashita H, Kusama K, Clinicopathological study of ameloblastoma: a review of 85 Japanese patients. Ped Oral Maxillofac Surg 18 査読有、(2), 2008, 73-80
- ④ Miyazaki Y, Okamoto E, Gonzalez-Alva P, Hayashi J, Ishige T, Kikuchi K, Nemoto N, Shin K, Sakashita H, Kusama K: The significance of podoplanin expression in human inflamed gingival. J Oral Sci 査読有、51 (2), 2009, 283-287
- ⑤ Miyazaki Y, Kikuchi K, González-Alva P, Inoue H, Noguchi Y, Tsuchiya H, Hayashi J, Shin K, Ochiai K, Kusama K Association of butyric acid produced by periodontopathic bacteria with progression of oral cancer. J Cancer Sci Ther 査読有、2 (2), 2010, 026-032
- ⑥ Okamoto E, Kikuchi K, Miyazaki Y, Gonzalez-Alva P, Oku Y, Tanaka A,

Yoshida N, Fujinami M, Ide F, Sakashita H, Kusama K, Significance of podoplanin expression in keratocystic odontogenic tumor. J Oral Pathol Med 査読有、39, 2009, 110-114

- ⑦ Gonzalez-Alva P, Tanaka A, Oku Y, Miyazaki Y, Okamoto E, Fujinami M, Yoshida N, Kikuchi K, Ide F, Sakashita H, Kusama K, Enhanced expression of podoplanin in ameloblastomas. J Oral Pathol Med 査読有、39, 2009, 103-109
- ⑧ 田中章夫、宮崎裕司、吉澤 大、井上ハルミ、菊池建太郎、草間 薫、口腔扁平上皮癌における epithelial-mesenchymal transition 関連分子の検討. Hosp Dent (Tokyo) 査読有、22 (1), 2010, 33-39
- ⑨ 田中 真、福田正勝、菅原良和、柳下治男、草間 薫、坂下英明、口腔扁平上皮癌における interleukin (IL)-23 の発現と動態について. Hosp Dent (Tokyo) 査読有、22 (2), 2010, 163-173

[学会発表] (計 10 件)

- ① 田中 章夫、ゴンザレス・アルバ パトリシア、奥 結香、井出 文雄、林 暁、山内 雅司、天野 修、坂下 英明、草間 薫、Association of epithelial-mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma. 第97回日本病理学会総会、金沢、2008年5月
- ② 奥 結香、田中 章夫、ゴンザレス・アルバ パトリシア、林 暁、山内 雅司、天野 修、坂下 英明、草間 薫、口腔癌手術断端の検討 ―局所再発との関連について― 第97回日本病理学会総会、金沢、2008年5月
- ③ Tanaka A, Oku Y, González-Alva P, Sakashita H, Kusama K, Epithelial-

mesenchymal transition in squamous cell carcinoma of the oral cavity. 12th International Congress on Oral Cancer, Shanghai, May, 2008

- ④ Gonzalez-Alva P, 宮崎裕司、田中章夫、奥 結香、坂下英明、石毛俊幸、菊池建太郎、根本則道、井出文雄、草間 薫、Detection of podoplanin expression in ameloblastomas: an immunohistochemical study. 第98回日本病理学会総会、京都、2009年5月
- ⑤ 宮崎裕司、菊池建太郎、山内雅司、落合邦康、草間 薫、歯周病と癌 —— 口腔癌との関連について—— 日本消化器免疫学会、愛媛、2009年7月
- ⑥ 宮崎 裕司、井上 ハルミ、菊池 建太郎、林 丈一郎、山内 雅司、申 基喆、落合 邦康、草間 薫、歯周病の口腔癌進展への関与の可能性～酪酸の口腔扁平上皮癌進展に及ぼす影響～. 第52回 秋季日本歯周病学会学術大会、2009年10月、宮崎
- ⑦ Gonzalez-Alva P, Kikuchi K, Miyazaki Y, Inoue H, Ide F Kusama K, Podoplanin protein expression in ameloblastomas: possible role in the aggressive behavior of the tumor.明海歯科医学会第8回学術大会、2009年6月
- ⑧ Fukuda M, Kusama K, Sakashita H, Expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha in squamous cell carcinoma of the oral cavity. 第68回日本癌学会学術総会 2009年10月、横浜
- ⑨ 宮崎裕司、落合邦康、井上ハルミ、菊池建太郎、草間 薫：歯周病原細菌代謝産物・酪酸の口腔がん進展に及ぼす影響. 第83回日本細菌学会総会、2010年3月、横浜

- ⑩ 宮崎 裕司、井上 ハルミ、菊池 建太郎、González-Alva Patricia、山内 雅司、落合 邦康、草間 薫：口腔癌におけるHPVおよび歯周病の関与について. 消化器免疫学会、滋賀、2010年7月

[図書] (計 1件)

- ① Tanaka A, Oku Y, González-Alva A, Sakashita H, Kusama K, Epithelial-mesenchymal transition in squamous cell carcinoma of the oral cavity. In: Oral Oncology, Vol 12, Varma AK & Qiu WL, New Delhi, India, 254-256, 2008

6. 研究組織

(1) 研究代表者

草間 薫 (KUSAMA KAORU)
明海大学・歯学部・教授
研究者番号：20130479

(2) 研究分担者

坂下 英明 (SAKASHITA HIDEAKI)
明海大学・歯学部・教授
研究者番号：10178551

(2) 研究分担者

田中 章夫 (TANAKA AKIO)
明海大学・歯学部・助教
研究者番号：30406392