

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20791563  
 研究課題名 (和文) 口腔扁平上皮癌および口腔粘膜前癌病変における S100A7 タンパクの発現解析  
 研究課題名 (英文) Expression analysis of the S100A7 protein in the oral squamous cell carcinoma and oral precancer disease.  
 研究代表者  
 福沢秀昭 (FUKUZAWA HIDEAKI)  
 福岡歯科大学・歯学部・助教  
 研究者番号：90465724

研究成果の概要 (和文)：今回の研究では、主に当科において切除し口腔扁平上皮癌および白板症と診断された組織標本を使用し、S100A7 マウスモノクローナル抗体を用いて、免疫組織学的染色を行った。S100A7 タンパクの発現は認めるものの、口腔扁平上皮癌および白板症ともに発現にばらつきを多く認めた。当初予測した結果とならず、今後は検体数の追加やその他の口腔前癌病変と併せて検討する必要性が考えられた。

研究成果の概要 (英文)：In the current study, using tissue samples are diagnosed with oral leukoplakia and squamous cell carcinoma primarily treated at our department, using a mouse monoclonal S100A7 antibody, performed immunohistochemical staining. As a result, many cases of variations in expression of both leukoplakia and oral squamous cell carcinoma. Not the result of what was expected, it was considered necessary will be considered along with other oral precancerous lesions and number of additional samples.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
20 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
21 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系歯学

キーワード：口腔外科学一般

#### 1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、癌におけるさまざまな研究が各分野でなされており、発癌機構や癌転移機構などの解明が飛躍的に進んでいる。中でも、癌に関連する遺伝子の研究は現在最も注目されており、その結果多くの癌関連遺伝子が発見され、診断や癌組織をターゲットにした

遺伝子治療の開発など、臨床の場によく応用されている。

(2) S100 ファミリーは類似構造を持つ多数の蛋白からなるが、各々の蛋白は組織特異性を有し、癌組織におけるそれら蛋白の発現に注目がなされている。すでに腎癌、乳癌や肺癌では、

今回の対象とは異なる S100A4 蛋白等の解析が進められ、一定の成果を見ている。当初、S100A7 (Psoriasis) の発現は乾癬や keratinocyte の分化異常の際に見られると報告されていたが、近年、皮膚癌や食道扁平上皮癌組織での特異的発現や癌細胞の形質への関与が報告され出した。扁平上皮癌における S100A7 の特異的発現調節機構の解析により、将来前癌病変の評価および癌治療への応用が期待される。

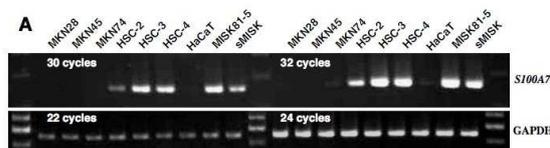
(3) 申請者はこれまでに、口腔扁平上皮癌における S100A7 の発現調節機構の解析を行ってきたが、S100A7 が実際の口腔扁平上皮癌組織に発現しているにおける S100A7 の役割は不明である。

## 2. 研究の目的

S100A7 は S100 ファミリーに属するカルシウム結合タンパク質で、皮膚病変である乾癬の病変部に特異的に発現するタンパク質として発見され、現在までに他の炎症性病変や癌での発現が確認されている。近年、S100A7 は悪性扁平上皮細胞の分化に関連しているという報告がなされた。そこで我々は口腔扁平上皮癌における S100A7 の発現調節機構に着目し、口腔扁平上皮癌特異的発現調節機構の解明を目的として、S100A7 遺伝子上流のプロモーター活性解析を展開してきた。

(1). 現在本研究において、扁平上皮癌における S100A7 の発現は、培養した cell line(HSC3,MKN28,MISK81-5,HaCaT) においてのみの発現を検討してきた。さらに口腔扁平上皮癌細胞株の検索を数種追加し、口腔扁平上皮癌における S100A7 の発現・浸潤・転移における検索を行っていく

Fig1



胃癌細胞 (MKN28,45,74) 口腔扁平上皮癌 (HSC-2,3,4,MISK81-5, s MISK) 正常ケラチノサイト細胞 (HaCaT) 間での S100A7 遺伝子の mRNA 発現の比較 (判定量 RT-PCR)

Fig2

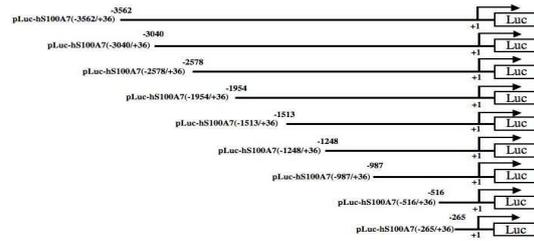


Fig3

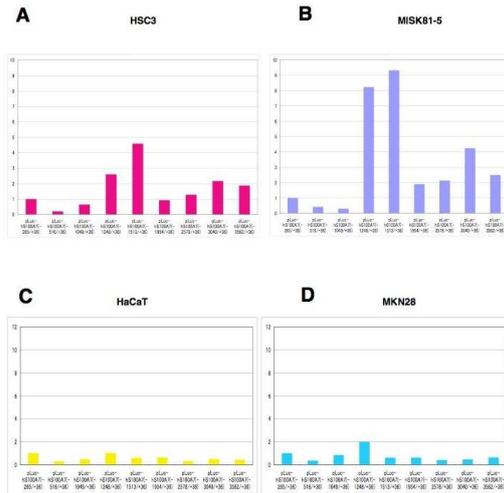


Fig2 で作製したプラスミドを、各培養細胞にトランスフェクションした後、ルシフェラーゼ活性を解析した結果、口腔扁平上皮癌には特異的に発現を示す領域を認めた。

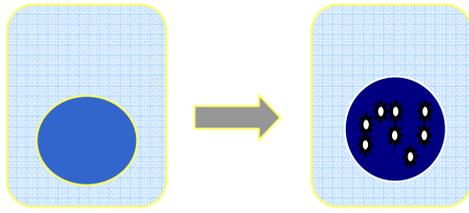
2. S100A7 タンパクの免疫組織学的染色による検討は、悪性黒色腫・乾癬・正常皮膚等での報告はあるが、口腔扁平上皮癌および前癌病変における比較検討はなされていない。また本タンパクは癌の初期に高発現するという報告や、浸潤期に発現する場合には転移しやすいとの報告がある。したがって口腔内に発生した扁平上皮癌および前癌病変においても同様の発現を示すのか、また前癌病変では発現の有無の検討を行う。

## 3. 研究の方法

本研究は、組織特異性を有するといわれる S100A7 タンパクに着目し、癌組織 (主に扁平上皮癌) における発現調節機構の解析を行う。癌細胞株および正常 keratinocyte 細胞株を用い、S100A7 遺伝子上流域における cis-element を同定する。そしてそこに結合する trans-acting factor の同定を行う。ここまでは上記 cell line を用いた培養細胞実験上のデータであるので、さらなる臨床におけ

るフィードバックを想定し、切除標本より免疫組織学的染色法にて生体内の癌組織における S100A7 タンパクの発現および発現分布の検索を行う。

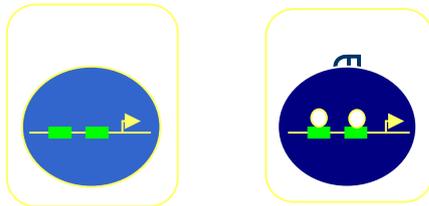
口腔扁平上皮癌細胞に発現するタンパク



正常細胞

癌細胞

正常細胞には発現しない、もしくは低発現であるが、口腔扁平上皮癌には高発現を示す。



正常細胞

癌細胞

正常細胞では転写されないのであれば癌特異的に結合する転写因子の存在があるのでは？

平成20年度

① *in vitro* にて口腔扁平上皮癌細胞株7種を用いて

(1) S100A7 遺伝子の発現を判定量 RT-PCR 法にて解析を行う

(2) S100A7 の発現ベクターを作製し、細胞株にトランスフェクションを行う。ルシフェラーゼ活性

を測定し、各々のベクター間での発現解析を行う。

(3) 発現ベクターをトランスフェクションした細胞株を用いて、増殖能や *in vitro* invasion assay を利用した浸潤能について検索を行う。

この検索については、刺激因子を使用した群や S100A7 の発現を siRNA を用いてノックダウンさせた群などで比較検討を行う。

平成21年度

② 口腔扁平上皮癌組織および口腔白板症組織の病理組織切片を作製し、免疫染色を行う。

1) 検体採取

生検時と手術時切除標本を、本研究に使用することを患者および家族の同意の下に検体として採取する。

2) 病理組織標本の作製

採取した検体を通常法に従いパラフィン包埋し、切片を作成する。

3) S100A7 抗体を用いた免疫染色

マウスモノクローナル抗 S100A7 抗体を用いて、免疫染色を行う。

4) S100A7 抗体陽性細胞率、陽性細胞の分布、各ステージによる比較を検討する

正常口腔粘膜組織と口腔白板症組織および口腔扁平上皮癌の S100A7 発現

転写のプロセスに注目！

の比較を行う。

研究対象：当病院にて、口腔扁平上皮癌、白板症と診断された患者の生検および切除標本

目標症例数：上記病変併せて50症例を目標とする

4. 研究成果

S100A7 タンパクの免疫組織学的に染色による検討は、癌の初期に高発現するという報告や、浸潤初期に発現する場合には転移しやすいという報告がある。20年度は病理組織検査にて口腔扁平上皮癌と診断された、組織標本20例を用いて、S100A7 マウスモノクローナル抗体を用いて、免疫組織学的染色を行った。結果としては、口腔扁平上皮癌においては、S100A7 タンパク陽性および陰性ともに認めた。高分化型・中分化型・低分化型といった腫瘍分化度での比較や頸部リンパ節転移の有無症例での比較も行うも、現時点では S100A7 の発現に明らかな差は認めなかった。口腔白板症は、自覚症状に乏しく、臨床の場でも比較的病変の範囲が狭いものや、境界が明瞭な場合は、切除せず経過観察を行うことが多い。しかし、白板症での発現解析を行うことでも、癌化傾向にあるかどうかの判定も可能となるかもしれない。

H21年度では引き続き、口腔扁平上皮癌と診断された組織標本50例を使用し、S100A7マウスモノクローナル抗体を用いて、免疫組織学的染色を行った。昨年同様S100A7タンパク発現

にはばらつきがあるが、計70例では陽性である率が高かった。また、白板症と診断された組織標本20例を用いて、同様にS100A7タンパクの発現を解析したが、扁平上皮癌同様に発現にはばらつきを認められた。癌の進行の度合い別に解析を行うと、切除時の腫瘍の大きさが比較的小さく内部浸潤や外向性に発育していないケースでは、陽性細胞率は高く思えた。腫瘍の大きさと頸部リンパ節転移を認めなかったケースでの発現解析では差は認められなかった。胃癌で報告があった初期の癌に高発現するという報告は、扁平上皮癌でも同様の結果が得ることができたと思われるが、まだまだ詳細な検討が必要であると思われた。前癌病変である白板症に関しては、ばらつきが多く発現を認めたから癌化し易いかどうかという判定にはまだまだ結び付けがたく、更なる症例の追加やその他の前癌病変と併せて見ていく必要性が考えられた。今後も継続して染色を行う検体数を増やし、更なる発現解析を行っていく予定である。

#### 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 件)

[学会発表] (計 件)

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計◇件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

福沢 秀昭 (FUKUZAWA HIDEAKI)

福岡歯科大学・歯学部・助教

研究者番号: 90465724

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: