

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21592532

研究課題名（和文）：口腔前癌病変における解糖系代謝活性とその意義

研究課題名（英文）：Significance of glycolytic metabolism activities in oral pre-cancer lesions

研究代表者：宮脇 昭彦 (Miyawaki Akihiko)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・助教

研究者番号：40200216

研究成果の概要（和文）：口腔前癌病変の標本を用いて、HIF-1 α 、Glut-1、Glut-3、PDK1 の免疫染色を行った。軽度上皮性異形成、中等度上皮性異形成では HIF1 α 、Glut3 は染色されなかった。Glut1 では有棘層の一部に染色される症例があった。PDK1 は、軽度上皮性異形成では染色されず、中等度上皮性異形成から高度上皮性異形成で陽性率が上昇した。上皮性異形成の比較的早期の段階で解糖系に関わる酵素の発現を認め、高度上皮性異形成は解糖系代謝が亢進していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The correlation between the degree of dysplasia in oral pre-cancer lesion and immunohistochemical staining of HIF-1 α , Glut-1, Glut-3, PDK1 antibodies was evaluated using specimens of oral pre-cancer lesions. The mild to moderate epithelial dysplasia was not stained with HIF-1 α and Glut-3 antibodies. The mild to moderate dysplasia was stained with Glut-1 in prickle layer slightly. On the other hand, immunohistochemical expression of PDK1 in moderate to severe epithelial dysplasia was found efficiently. These findings suggest that expression of enzymes involved in glycolytic metabolism was recognized in early stage of epithelial dysplasia, and that in severe dysplasia, glycolytic metabolism was increased.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：【歯学・外科系歯学】

キーワード：【口腔前癌病変、 HIF-1 α 、Glut-1、 PDK1、 解糖系代謝】

1. 研究開始当初の背景

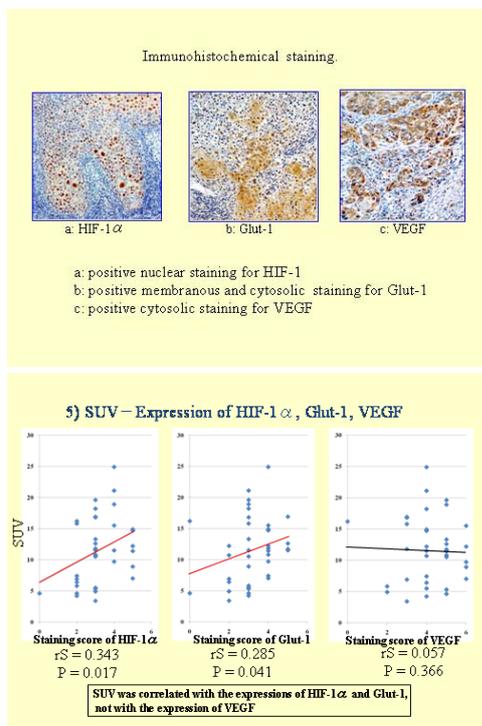
(1) 癌切除断端の上皮性異形成の有無は、

手術後における局所再発あるいは多発癌の危険因子のひとつと考えられているが、日本口腔腫瘍学会、日本口腔外科学会の 2007 年

度版口腔癌診療ガイドラインでは上皮異形成の程度と再発率の検証は極めて少ないと指摘している。その理由として、口腔扁平上皮癌境界病変の診断は 2005 年度 WHO の分類では squamous cell hyperplasia, mild dysplasia, moderate dysplasia, severe dysplasia, carcinoma in situ の 5 型に分類され、その診断基準は遺伝子あるいは分子レベルでの変化を問わず形態のみで判断されるため連続段階的なつながりをもつ上皮性異形成の判定は必ずしも容易ではないことがあげられる。現在、口腔癌の外科的切除範囲はルゴール染色し正常粘膜と異形成上皮の染色性の違いを利用して設定し一定の効果を上げているものの今なお科学的根拠に乏しく不明確である。従って上皮性異形成の程度を形態のみからばかりではなく、その生物学的背景すなわち遺伝子あるいは分子レベルでの変化を解析することは口腔癌の治療のみならず、さらに上皮性異形成の癌化予測に極めて有用である。

(2) 一方、解糖系代謝亢進は多くの癌細胞で確認される生物学的特性である¹⁾。我々は以下(図1、図2)に示すように口腔癌組織において HIF-1 α 、Glut-1、VEGF の免疫学的手法により、FDG-PET の集積が HIF-1 α や Glut-1 の発現が高い程亢進し、癌細胞の生物学的特性すなわち解糖系代謝は口腔癌の低酸素などの微小環境により影響をうける可能性があることを報告した²⁾。

図 1

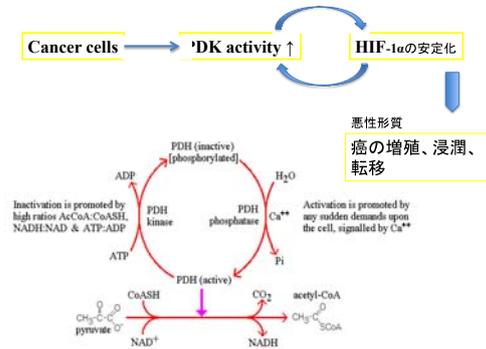


このようなことから FDG の集積は解糖系と密接に関係しており HIF-1 α や Glut-1、

Glut-3 などを標的として解糖系代謝亢進のマーカーになりうることを示唆しているものと考えた。

(3) さらに pyruvate dehydrogenase (PDH, ピルビン酸脱水素酵素) の活性化が癌細胞のワールブルグ効果に貢献していることが報告されている³⁾。

図 3



PDH は図 3 下段に示すようにピルビン酸をアセチル CoA へ変換するミトコンドリア内の酵素で、その活性化は TCA サイクルに供給されるアセチル CoA の量を増大させる。

一方、ピルビン酸脱水素酵素キナーゼ (PDK) は、ピルビン酸がミトコンドリアの TCA サイクルへ入る経路の酵素ピルビン酸脱水素酵素 (PDH) を阻害する。癌細胞は多くの場合このように酸素存在下であっても選択的に解糖を利用してアデノシン三リン酸 (ATP) を生成する。この現象は上述のワールブルグ効果として知られているが、PDK はまた HIF-1 α を安定化することがわかってきており、その結果図 3 上段のように癌の悪性形質の獲得にもその役割を果たしている。このような背景から、癌の発生の段階での代謝の変化をとらえることができれば癌の新たな治療ターゲットとなるばかりではなく、癌の早期発見、発生に新たな知見をもたらすものと考えられる。

2. 研究の目的

上記背景より、我々は癌の解糖系代謝活性に注目し、それを連続段階的に進行すると考えられる口腔前癌病変にまで拡大し、前癌病変の形態学的に軽度上皮性異形成、中等度上皮性異形成、高度上皮性異形成、上皮内癌と判断される病変で癌と同じように解糖系代謝活性の亢進が観察されるのかを検証した。すなわち解糖系代謝活性は我々がこれまで指標としてきたグルコーストランスポーター (Glut-1, Glut3)、低酸素マーカー (HIF-1 α) に加え TCA サイクルへ入る経路と密接に関係する PDK-1 の抗体を指標とした。これら抗体を用いて酵素抗体法による免疫組

組織学的染色、mRNA レベルでの発現と上皮性異形成の程度と関連性を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 対象：

口腔癌切除組織および前癌病変生検組織あるいは切除組織を対象とした。これらの口腔前癌病変あるいは口腔癌境界病変を用いて、上皮性異形成の程度を2005年WHOの分類に従って、軽度上皮性異形成、中等度上皮性異形成、高度上皮性異形成、上皮内癌に評価し分類した。分類は口腔病理医および研究代表者が行った。

(2) 方法：

①上記組織標本とコントロールとして切除標本の正常粘膜を用いて、Glut-1, Glut-3, HIF-1 α , PDK-1の免疫組織学化学的染色を行った。

免疫染色はEnvision Kit/HRP (DAKO Glostrup, Denmark)を用いて行った。標本を4 μ mに薄切し、脱パラ後、内因性ペルオキシダーゼをブロッキングした。クエン酸緩衝液、オートクレーブで抗原賦活化し、Glut-1, Glut-3(500倍希釈)、HIF-1 α 、PDK-1(200倍希釈)で一次抗体を反応させた後、DAB溶液で発色させた。またタンパク質の発現解析には偽陽性、偽陰性の可能性が指摘されているため、固定された凍結標本を用いGlut-1, Glut-3, HIF-1 α 、PDK-1を標的としてin situ ハイブリダイゼーション法によりmRNAの検出を行うこととした。

②PDK-1の発現亢進があれば、グルコースのピルビン酸から乳酸への変換が亢進する。そこでラクテート・プロTMセンサーを用いて前癌病変切除時あるいは生検時に得られる某変部の血液から乳酸値を測定する。上皮性異形成の程度と比較し、乳酸値が上皮性異形成のバイオマーカーとなりうるか分析する。

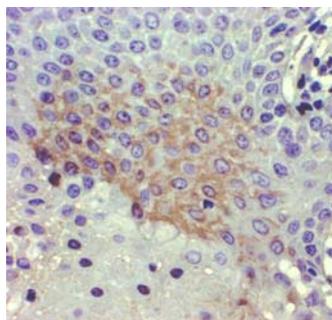
③ 上記①②の結果は上皮異形成の程度により解糖系代謝活性に差があることが予想される。そこでマイクロアレイ解析から上皮性異形成の程度と解糖系代謝に関わる遺伝子発現の差を検出することは重要なことであると考えた。臨床検体からRNAを抽出し、T2ポリメラーゼを用いたRNA増幅法を用いて微量なRNAからマイクロアレイが行えるほどのRNAが確保される。サンプル由来のRNAを逆転写してcDNAを作る時に蛍光色素でラベリングした後、ハイブリダイゼーション後シグナルを検出し蛍光強度を数値化する。

4. 研究成果

①口腔前癌病変を軽度上皮性異形成、中等度上皮性異形成、高度上皮性異形成に分類し口腔癌のパラフィン包埋した標本を用いて、HIF1 α , Glut1, Glut3, PDK1の免疫染色を行っ

た。HIF1 α は口腔癌の標本では我々が行った研究では約70%の陽性率であった。Glut1も同様に口腔癌の組織では陽性率が70%程度である。一方、病理学的に軽度上皮性異形成、中等度上皮性異形成と診断された口腔前癌病変ではHIF1 α 、Glut1, Glut3はほとんど染色されなかった。それに比べ高度上皮性異形成と診断された口腔前癌病変ではHIF1 α 、Glut3の染色性はあがらないものの、Glut1では上皮基底層から有棘層の一部に染色される症例があった(写真1)。正常口腔粘膜組織ではいずれも染色されなかった。

写真1 Glut-1 免疫染色 高度上皮性異型性(有棘層の一部に染色される部分を認める)



PDK1の免疫染色については、軽度上皮性異形成ではほとんど染色されず、中等度上皮性異形成では有棘層の細胞の細胞質軽度の染色性が見られるが明らかではなかった(写真2)。高度上皮性異形成では写真3に示すように基底層から有棘層の細胞質に染色がみられ。上皮性異形成が高度になるに従い陽性率が上昇した。このようにPDK-1の発現と上皮異形成の程度には関連が見られた。

写真2 PDK-1 免疫染色 中等度上皮性異型性

(有棘層の細胞の細胞質にわずかに染色が見られるが、基底層を含めほとんどの部分で染色されない)

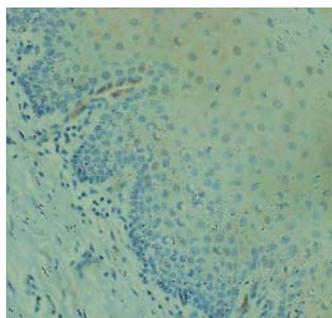


写真3 PDK-1免疫染色 高度上皮性異形成
(基底層相当部分より有棘層の一部の細胞の細胞質が染色されている)

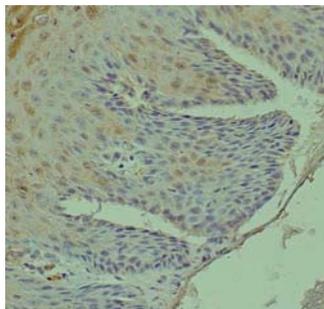


写真4 PDK-1免疫染色 上皮内癌
(上皮内癌は基底層から有棘層まで染色されている。)

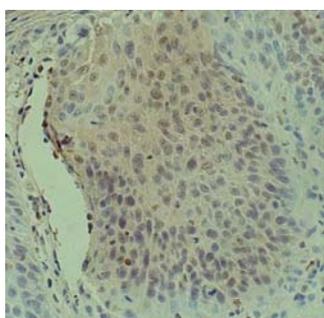
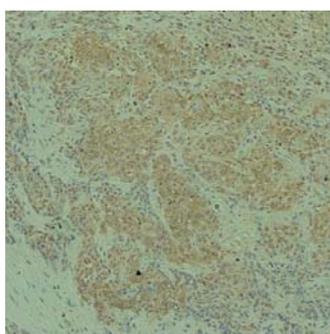


写真5 PDK-1免疫染色 浸潤癌
(浸潤癌は上皮全体が染色されている。)



さらに、上皮内癌や浸潤癌においてPDK-1の発現は、写真4、5に見られるように上皮のほとんどの部分の細胞の細胞質に染色されている。

以上の免疫組織学的結果と上皮異形成との関連は、PDK-1と浸潤癌に関する報告あるいはワールブルグ効果に関連する報告は散見されるが発癌あるいは上皮性異形成の過程での発現の報告は国内外では見られず、本研究の成果であり、現在世界で代謝の研究が進む中で

発癌過程に関わる代謝に対する考えにインパクトを与える結果と考える。

我々が標的としているHIF1 α 、Glut1、Glut3、PDK1は解糖系に関わる酵素であること、最近癌細胞においてPDK1のがん代謝における働きが明らかになりつつあることを考慮すると我々の免疫染色の結果は口腔粘膜上皮の異形成が進行する比較的早期の段階で解糖系の代謝に関わる酵素の上昇、特にPDK1と異形成との関連を示唆している。方法で②と③で述べたような実験は十分な成果が得られず、直接的に乳酸などの解糖系代謝産物の測定は困難であったが、高度上皮性異形成と診断されたものの中には口腔癌組織で観察されるような解糖系代謝の亢進しているものがあることが伺えた。

口腔前癌病変は病理学的には軽度、中等度、高度上皮性異形成の3段階に分類されるが、その判定基準が明確でないこと、高度上皮性異形成のどれくらいが浸潤癌へと進行するのが不明であることから、我々の研究は診断、予後に意義があるものではあるが、その実験結果の解釈が難しい。今後の展望として臨床的には口腔前癌病変と診断された症例の経過を観察しどれくらいが癌化するのか、PDK-1を発現し解糖系の代謝亢進が疑われるものは高率に癌化するのかについて、我々の免疫染色の結果と今後の経過観察によって明らかになってくると思われる。一方基礎的研究として、癌細胞の微小環境である低酸素環境における口腔癌細胞の代謝経路特に解糖系代謝活性の解明と浸潤、転移に関わる悪性形質獲得との関連を明らかにすることが必要と考える。我々はヒト正常口腔粘膜細胞株を樹立し、報告しているが、正常細胞と口腔癌細胞で網羅的な代謝産物の違いとそれに関わるシグナル遺伝子を解明することを計画している。

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] (2件)

- ① AKIHIKO MIYAWAKI, HIROSHI HIJIOKA, RYUJI IKEDA, TAKAYUKI ISHIDA, ETSURO NOZOE, NORIFUMI NAKAMRA, Analysis of the outcome of concurrent neoadjuvant chemo radiotherapy with S-1 compared to super-selective intra-arterial infusion for oral squamous cell carcinoma, ONCOLOGY LETTER 査読有、3, 2012, 995-1001
- ② TOSHIRO KIBE, MICHIKO KISHIDA,

MASAYUKI KAMINO, MIKIKO
IJIMA, LIN CHEN, MIKA HABU,
AKIHIKO MIYAWAKI, HIROSHI
HIJIOKA, NORIFUMI NAKAMURA,
TOHRU KIYONO, SHOSEI KISHIDA,
Immortalization and characterization
of normal oral epithelial cells without
using HPV and SV40 genes, Oral
Science International, 査読有、8, 2011,
20-28

〔学会発表〕(計2件)

- ① 宮脇 昭彦、当科における口腔扁平上皮癌患者の臨床統計的観察-原発巣制御に対する取組みについて-、第30回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会、2012年1月27日、大宮ソニックシティー 埼玉県大宮市
- ② 宮脇 昭彦、当科における口腔扁平上皮癌頸部リンパ節後発転移の臨床的検討、第29回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会、2011年1月17日、崇城大学市民ホール 熊本県熊本市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮脇 昭彦 (MIYAWAKI AKIHIKO)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：40200216

(2) 研究分担者

池田 龍二 (IKEDA RYUJI)

鹿児島大学医学部・歯学部附属病院・薬剤師

研究者番号：50398278

比地岡 浩志 (HIJIOKA HIROSHI)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・講師

研究者番号：70305150

中村 典史 (NAKAMURA NORIFUMI)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：60217875

山口 孝二郎 (YAMAGUTI KOUJIRO)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：00210360