

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：33703

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592976

研究課題名(和文) 発現遺伝子に基づく組織の悪性度と患者免疫能評価を組み合わせた口腔癌の予後診断法

研究課題名(英文) Prognosis of oral squamous cell carcinoma patients using gene expression profile and immunological status.

研究代表者

近藤 信夫 (Kondoh, Nobuo)

朝日大学・歯学部・教授

研究者番号：40202072

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：口腔癌患者の全身状態を把握するために、本研究では患者の末梢血を用いた免疫応答能力の測定を行い、予後診断のための指針作りを目指した。我々はまず、OSCC患者末梢血のサイトカイン濃度を測定し、末梢血液細胞の免疫応答変化を検討し、リンパ節転移を起こしていないステージIからIIIまでの初期OSCC症例群では、患者の末梢血液細胞をLPS刺激培養して放出される、Th1サイトカインであるIFN- γ 産生能が原発腫瘍の大きさに逆相関して減弱することや、リンパ節転移頻度の上昇とともにそれが上昇することを突き止めた。さらに、CD57+T細胞の比率は、OSCCの悪性化に伴って上昇することを見出した。

研究成果の概要(英文)：In order to diagnose overall status of OSCC patients, we evaluated immunological activity using peripheral blood samples from the patients. We first examined cytokine levels in peripheral blood, and cytokine producing-capability of LPS-stimulated peripheral blood cells (PBLs) from the patients. Our results demonstrated that the production of a Th1 cytokine, IFN- γ by LPS-stimulated PBLs from OSCC patients was significantly down regulated in accordance with the tumor progression from stages I up to III. By contrast, the production of IFN- γ was up-regulated from PBLs of the patients harboring lymphnode metastasis compared to that of the patients without metastasis. On the other hand, proportion of CD57+T lymphocytes among PBLs was increased along with the tumor progression from stages I up to IV.

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：口腔扁平上皮癌 遺伝子発現 免疫細胞診断

1. 研究開始当初の背景

我々は口腔病変において、前癌病変から発癌に至る過程を示す11種のマーカー遺伝子群を同定し、線形判別解析とleave-one-out検証法に基づいて口腔扁平上皮癌(以下OSCC)と前癌病変の鑑別を95%以上の確度で行なう遺伝子診断モデルを構築した(Kondoh N, et al, Oral oncology, 43, 455-62, 2007)。さらに癌の悪性度との相関が高いとされる山本-小浜の浸潤度分類の鑑別が可能な遺伝子診断モデルを構築した(Kondoh N, et al, Mol Carcinog, 47, 744-756, 2008)。一方、臨床的に癌が転移するまでには多くの関門を経ることが想定されるが、分担研究者の高山らは既に末梢血において、IFN- γ やIL-10の誘導能およびCD57陽性 TCR陽性リンパ球亜集団(CD4⁺CD57⁺ T細胞)の動態を胃癌患者や肝細胞癌患者で観察し、それらが予後診断の指標となることを報告してきた(Takayama E., et al. Immunology, 108, 211-219, 2003; Shiraki T, et al. Oncol Rep.26(1),201-8, 2011)。しかしながら口腔癌症例における免疫機構と予後との関連性は未だ検討されていなかった。

2. 研究の目的

口腔扁平上皮癌の治療では、リンパ節転移の存在を早期に把握することが予後や術後のQOLを改善する上で重要な決め手となる。口腔癌患者の予後を正確に予測するためには癌組織の形質を出来るだけ正確に診断するのみならず、患者の全身状態を総合的に把握することが重要と考えられる。本研究では発現遺伝子プロファイルにもとづいた口腔扁平上皮癌組織の遺伝子診断と、患者の抹消血を用いた免疫応答能力の測定を組み合わせた予後診断のための指針作りを目指した。

3. 研究の方法

本研究ではOSCC患者末梢血漿および血液細胞についてIFN- γ とIL-10の値およびその産生能や、CD4⁺CD57⁺ T細胞の亜集団分布を解析し、OSCCの病期との関連性を検討した。

1) 血液検体

2009年から2011年までの3年間に朝日大学歯学部附属病院歯科口腔外科、朝日大学歯学部附属村上記念病院歯科口腔外科、および横浜市立大学附属病院歯科口腔外科を受診し、同意が得られたOSCC患者72人(32~88歳、平均63.53歳、男性44人、女

性28人)より得られた治療開始前のヘパリン化血検体を研究対象とした(表1)。本研究は朝日大学倫理委員会の倫理規定に基づき承認された(第20071号)。

表1. 末梢血液検体を採取したOSCC患者の臨床病理像

| | 全患者 | 51-80歳のみ | 舌原発のみ |
|---------------------|-----------|----------|-----------|
| 患者数 | 72 | 49 | 40 |
| 年齢 | 65.6±15.1 | 67.3±8.5 | 60.9±16.7 |
| 性別 | | | |
| 男性 | 44 | 34 | 27 |
| 女性 | 28 | 15 | 13 |
| 原発部位 | | | |
| 舌 | 40 | 25 | 40 |
| 上顎歯肉 | 11 | 9 | 0 |
| 下顎歯肉 | 10 | 7 | 0 |
| 口腔底 | 5 | 5 | 0 |
| 頬粘膜 | 4 | 2 | 0 |
| 口唇 | 1 | 1 | 0 |
| 口蓋 | 1 | 0 | 0 |
| 原発腫瘍径 (T) | | | |
| Tis | 0 | 0 | 0 |
| 1 | 7 | 4 | 5 |
| 2 | 22 | 13 | 15 |
| 3 | 18 | 15 | 10 |
| 4 (T4aとT4bを含む) | 25 | 17 | 10 |
| 所属リンパ節転移 (N, LN 転移) | | | |
| 0 | 41 | 29 | 24 |
| 1 | 8 | 6 | 5 |
| 2 (N2a, b, c を含む) | 23 | 14 | 11 |
| 3 | 0 | 0 | 0 |
| 遠隔転移 (M) | | | |
| 有 | 0 | 0 | 0 |
| 無 | 72 | 49 | 40 |
| 病期 (TNM stage) | | | |
| I | 7 | 4 | 5 |
| II | 16 | 10 | 12 |
| III | 14 | 12 | 8 |
| IV | 35 | 23 | 15 |

2) 検体処理と保存

採血後、常温常圧下で保存した検体を24時間以内に、以下の3種類の方法で処理した。ヘパリン化血を遠心分離して血漿検体を採取した。血球成分をリポ多糖(lipopolysaccharide, LPS)により刺激培養し、培養上清検体を採取した。また、血球成分は各種蛍光標識抗体染色した。

3) 酵素結合免疫吸着(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)法により、血漿中および上記培養上清中のIFN- γ とIL-10を定量した。

4) 血球を蛍光標識抗体染色した後、各種蛍光標識抗体を用いてフロー・サイトメーター解析を行った。

5) 統計解析; 統計解析ソフトウェア(Stat Mate Version 4.0 ATOMS社, JAPAN)を用いてANOVAおよびWelchのt検定を行った。P<0.05の場合、有意差ありとした。

6) 動物モデルの構築を検討するためにC3Hマウスに同系マウス頬粘膜扁平上皮癌細胞株、sq1979細胞を移植し、脾細胞の刺

激培養を行い、サイトカイン産生能を比較した。

3. 研究成果

- OSCC の悪性化に伴う末梢血の Th1 および Th2 サイトカインの変化を検討するために、OSCC 患者の末梢血漿検体 12 症例(各病期 I, II, III, IV を 3 検体ずつ)で IFN- γ と IL-10 の濃度を測定したが、いずれも検出限界以下だった(not shown)。
- 72 人の OSCC 患者の末梢血を LPS 存在下で刺激培養し、培養上清を用いて ELISA 法により IFN- γ 産生能を測定した。OSCC 患者末梢血 IFN- γ 産生能は病期 I から病期 IV への進行に伴い減弱したが、一方病期 I から病期 II への進行に伴い増強した(P= 0.010)(図 1 a)。IFN- γ 産生能は専ら腫瘍径で再分類(TNM 分類に準ず)すると、1 から 3 への増大に伴い減弱したが(P= 0.030)、腫瘍径 3 から 4 への進行に伴い増強した(P= 0.013)(図 1 b)。

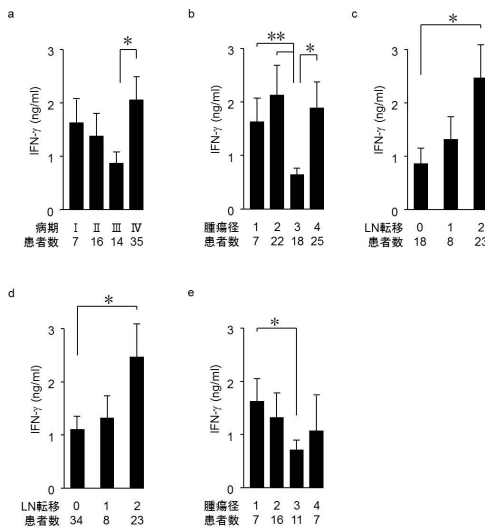


図1. OSCC患者末梢血のLPS刺激培養によるIFN- γ 産生能。OSCC患者72症例を病期(I~IV)あるいは腫瘍径(1~4)で分類しIFN- γ 産生能を比較した。(a, b)病期III, IVに属する49症例、或いは腫瘍径(2~4)に属する65症例のそれぞれをLN転移状態(0~2)で分類しIFN- γ 産生能を比較した。(c, d)臨床的にLN転移が無いと診断された41症例を腫瘍径(1~4)で分類してIFN- γ 産生能を比較した。(e)病期(I~IV)、腫瘍径(1~4)、LN転移の状態による分類は表1, 2の定義に準じた。標準誤差(\pm SE)と統計的有意差(*, P<0.05; **, P<0.01)を示す。

- UICC(2005年)のOSCC病期分類(TNM分類)は腫瘍径の他にリンパ節転移(LN転移)と遠隔転移によって規定される。検討した全OSCC患者には遠隔転移は認められなかったが、31人にLN転移が認められ、病期 I と病期 II に集中していた。そこで病期 I と病期 II の患者集団に絞って IFN- γ 産生能を比較すると、IFN- γ 産生能の上昇とLN転移との間に相関が認められた(図 1 c)。一方, LN転移を

臨床的に示さない41人の患者については腫瘍径が1から3へ増大するのに伴って IFN- γ 産生能の減弱が有意に認められた(P= 0.026)(図 1 d)。

- OSCC の好発年齢でしかも年齢による免疫能変化の影響を受け難い限られた年齢層(51-80歳)の患者(表1に示す49人)に絞って IFN- γ 産生能を検討したところ、同様に統計学的有意差が認められた(P= 0.045)。これらの事実から、OSCC の病期 I から病期 II への進行に伴い IFN- γ 産生能が減弱することが確かめられた(図 1 e)。
- OSCC の悪性化に伴う末梢血 IL-10 産生能は、患者群での腫瘍径分類、LN転移のいずれとの比較においても、統計学的に有意な関連が認められなかった(図 2 a-e)。

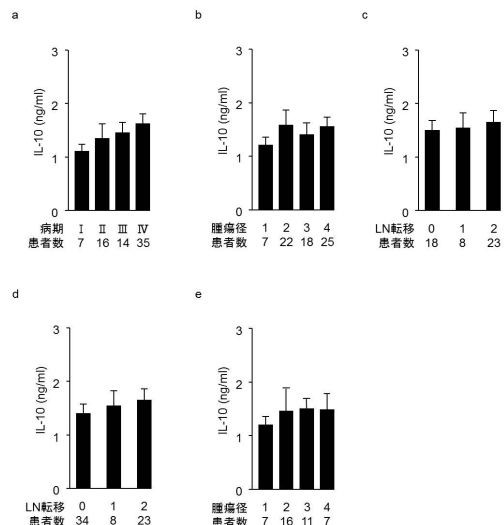


図2. OSCCの悪性化に伴う末梢血IL-10産生能の変化。OSCC患者72症例を病期(I~IV)あるいは腫瘍径(1~4)で分類しIFN- γ 産生能を比較した。(a, b)病期III, IVに属する49症例、或いは腫瘍径(2~4)に属する65症例のそれぞれをLN転移状態(0~2)で分類しIFN- γ 産生能を比較した。(c, d)臨床的にLN転移が無いと診断された41症例を腫瘍径(1~4)で分類してIFN- γ 産生能を比較した。(e)病期(I~IV)、腫瘍径(1~4)、LN転移の状態による分類は表1, 2の定義に準じた。標準誤差(\pm SE)と統計的有意差(*, P<0.05; **, P<0.01)を示す。

- OSCC の悪性化に伴う末梢血球中 CD4⁺CD57⁺ T(N-Th)細胞の変化を調べると、OSCC 好発年齢層(51-80歳)の49症例では、全 CD4⁺TCR⁺リンパ球に占める Th 細胞の比率は病期 I に比べ病期 II と III で有意に増加していた(図 3 a)。症例を腫瘍径で再分類すると、1 に比べて 2, 3, 4 で有意に増加していた(図 3 b)。同様の傾向は原発部位を舌のみに限定した OSCC 患者集団内でも認められた(P= 0.024 および P= 0.022)。これに対して N-Th 細胞の比率と、LN転移との間に有意な関連した差は認め

られなかった(図3c,d)。

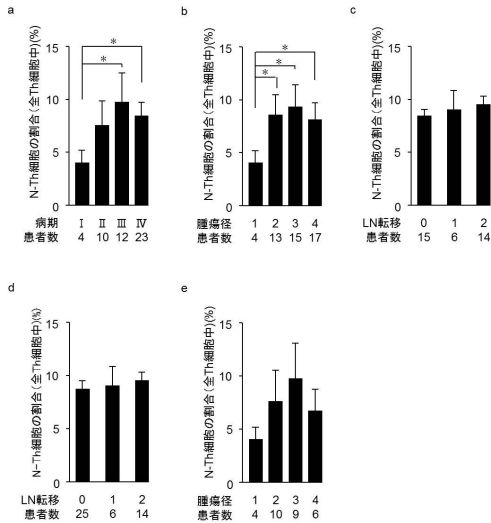


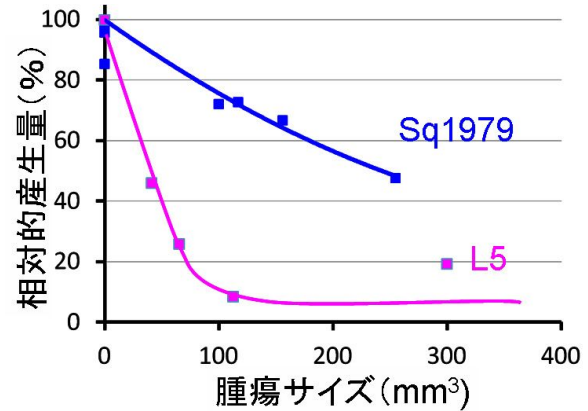
図3. OSCCの悪化に伴う末梢血中N-TH細胞の変化。51歳から80歳までのOSCC患者49症例を、病期(I~IV)、或いは腫瘍径(1~4)で分類し、FACSによりTh細胞に占めるN-TH細胞の比率を比較した(a, b)。病期III, IVに属する35症例、或いは腫瘍径(2~4)に属する45症例のそれぞれをLN転移状態(0~2)で分類しTh細胞に占めるN-TH細胞の比率を比較した(c, d)。同様に、腫瘍的にLN転移が無いと診断された29症例を腫瘍径(1~4)で分類してTh細胞に占めるN-TH細胞の比率を比較した(e)。標準誤差(±SE)と統計的有意差(*, P<0.05)を示す。

7) OSCC 癌患者においてTリンパ球亜集団 (CD4 陽性 CD57 陽性 T細胞)や、患者末梢血細胞成分の LPS 刺激時の Th1 サイトカイン (IFN- γ) 産生能が患者の病態像を反映して変化することを突き止めた。しかしながら、OSCC の腫瘍径の増大に伴う末梢血 IFN- γ 産生能の減弱は、増大した腫瘍が IFN- γ 産生能の低下を引き起こすことに由来するのか、あるいは個々の患者の素因としての抗腫瘍サイトカインである INF- γ 産生能がもともと低いことが腫瘍の成長を促進する結果なのか、そのメカニズムは重要な検討課題として残された。この点を詳細に検討するために動物モデルの構築を試みた。C3H マウスに同系マウス類粘膜癌細胞株のsq1979細胞および高転移型サブクローン、L5細胞を皮下移植し、3週間後に脾細胞を採取して抗 CD3 抗体による Tリンパ球刺激を加え、サイトカインの産生能を検討すると、担癌マウスの個々の腫瘍サイズの増大に反比例して IFN- γ 産生能が低下した。従って OSCC 患者末梢血細胞で観察された免疫応答変化が同系統腫瘍担癌マウスにおいても観察され、患者固有の IFN- γ 産生能に応じて OSCC の増殖に差が生じたものではなく、増大した腫瘍の作用によって IFN- γ 産生能の抑制が引き起こされていることが示された(図4)。

この実験系はまた、今後の癌腫瘍免疫応答の研究に資することが考えられ

た。

図4. Sq1979 および L5 細胞によるマウス脾細胞の IFN- γ 産生能の抑制



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4件)

Nagaya R, Mizuno-Kamiya M, Takayama E, Kawaki H, Onoe I, Tanabe T, Nagahara K and Kondoh N. The mechanisms of immunosuppression by mouse adipose tissue-derived Mesenchymal stromal cells on mouse alloreactively stimulated spleen cells. *Exp Ther Med*, 7: 17-22, 2014
DOI: 10.3892/etm.2013.1382

Kondoh N, Takayama E, Kamiya M, Kawaki H, Motohashi M, Muramatsu Y, Shikimori M, Mitsudo K and Tohnai I. Comprehensive study of oral squamous cell carcinoma patients using blood samples and gene expression profiles. *J Cancer Sci Ther*. S18-001, 2012.
<http://dx.doi.org/10.4172/1948-5956.S18-001>

Nakata T, Takayama E, Magari H, Kato J, Kondoh N, Ichinose M; Simultaneous detection of T lymphocyte-related antigens (CD4/CD8, CD57, TCR β) with nuclei by fluorescence-based immunohistochemistry in paraffin-embedded human lymph node, liver cancer and stomach cancer. *Acta Cytologica*. 55: 375-363, 2011.

Shiraki T, Takayama E, Magari H, Nakata T, Maekita T, Enomoto S, Mori Y, Shingaki N, Moribata K, Deguchi H, Ueda K, Inoue I, Mizuno-Kamiya M, Yashiro K, Iguchi M, Tamai H, Kameyama Y, Kato J, Kondoh N, Ichinose M.; Altered cytokine levels and increased CD4⁺CD57⁺ T cells in the peripheral blood of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma patients. *Oncol Rep*. 2011 Jul;26(1):201-8.

〔学会発表〕(計 16 件)

- (1) 東康加, 神谷真子, 稲垣俊弘, 川木晴美, 高山英次, 櫻井学, 智原栄一, 近藤信夫. マウス口腔扁平上皮癌(Sq1979)の進展が脾細胞 IFN- γ 産生能に及ぼす影響. 第 55 回歯科基礎医学会学術大会・総会. 2013 年 9 月 20 日~22 日 (岡山)
- (2) 稲垣俊弘, 神谷真子, 東康加, 川木晴美, 高山英次, 村松泰徳, 近藤信夫. マウス口腔扁平上皮癌による脾細胞インターフェロン γ 産生能の抑制効果. 第 55 回歯科基礎医学会学術大会・総会. 2013 年 9 月 20 日~22 日 (岡山)
- (3) 飯田昌樹, 光藤健司, 長縄鋼亮, 足立 誠, 高山英次, 馬場隼一, 來生知, 一瀬雅夫, 住友伸一郎, 村松泰徳, 式守道夫, 近藤信夫, 藤内 祝. 第 58 回、日本口腔外科学会学術集会総会. 2013 年 10 月 11-13 日 (福岡)
- (4) 長縄 鋼亮, 高山 英次, 飯田 昌樹, 足立 誠, 光藤 健司, 住友伸一郎, 村松 泰徳, 藤内 祝, 近藤 信夫, 式守 道夫. 口腔扁平上皮癌患者末梢血におけるサイトカイン産生能. 第 58 回、日本口腔外科学会学術集会総会. 2013 年 10 月 11-13 日 (福岡)
- (5) 長縄 鋼亮, 高山 英次, 飯田 昌樹, 足立 誠, 光藤 健司, 馬場 隼一, 一瀬 雅夫, 住友伸一郎, 村松 泰徳, 藤内 祝, 式守 道夫, 近藤 信夫. Cytokine producing capabilities in peripheral blood from oral squamous cell carcinoma patients. 第 72 回日本癌学会学術総会. 2013 年 10 月 3-5 日 (横浜)
- (6) 飯田 昌樹, 光藤 健司, 長縄 鋼亮, 足立 誠, 高山 英次, 馬場 隼一, 一瀬 雅夫, 村松 泰徳, 式守 道夫, 近藤 信夫, 藤内 祝. 口腔扁平上皮癌患者末梢血の T 細胞亜集団. 第 72 回日本癌学会学術総会. 2013 年 10 月 3-5 日 (横浜)
- (7) Kondoh N, Takayama E, Kamiya M, Kawaki H, Motohashi M and Muramatsu Y, Comprehensive study of oral squamous cell carcinoma patients using blood samples and gene expression profiles. 2nd World Congress on Cancer Science and Therapy (招待講演). 2012 年 09 月 10 日~2012 年 09 月 11 日. San Antonio, TX, USA.
- (8) 長縄 鋼亮・高山 英次・足立 誠・飯田昌樹・本橋征之 光藤 健司・村松 泰徳・式守 道夫・藤内 祝・近藤 信夫. 口腔扁平上皮癌患者末梢血のサイトカイン産生能と T 細胞亜集団. 第 54 回歯科基礎医学会. 2012 年 09 月 14 日~16 日 (郡山)
- (9) NAGANAWA K, TAKAYAMA E, ADACHI M, BABA J, IIDA M, MITSUDO K, Masao ICHINOSE, Yasunori MURAMATSU, Iwai TOHNAI, SHIKIMORI M, KONDOH N. CD4⁺ CD57⁺ T cells and cytokine producing capabilities in peripheral blood from oral squamous cell carcinoma patients. 第 71 回癌学会学術総会. 2012 年 09 月 19 日~21 日(札幌).
- (10) 東 康加, 神谷真子, 川木晴美, 高山英次, 智原栄一, 近藤信夫. マウス口腔扁平上皮癌と間葉系間質細胞の移植が腫瘍の生着と全身免疫系に及ぼす影響. 第 54 回歯科基礎医学会. 2012 年 09 月 14 日~16 日(郡山)
- (11) 長縄鋼亮・高山英次・馬場隼一・足立誠・本橋征之・光藤健司・村松泰徳・式守道夫・藤内祝・近藤信夫. 口腔扁平上皮癌患者末梢血中の T 細胞亜集団. 第 53 回歯科基礎医学会学術大会・総会. 2011 年 9 月 30 日-10 月 2 日(岐阜)
- (12) 長縄鋼亮・高山英次・馬場隼一・足立誠・本橋征之・藤本雅子・足立憲正・竹内浩子・小栗千里・來生知・光藤健司・村松泰徳・藤内祝・近藤信夫・式守道夫. 口腔扁平上皮癌患者末梢血中 CD4⁺CD57⁺ T 細胞の増加. 第 56 回日本口腔外科学会総会・学術大会. 2011 年 10 月 21 日-23 日(大阪)
- (13) 長縄鋼亮・高山英次・足立誠・光藤健司・村松泰徳・近藤信夫・藤内祝・式守道夫. 口腔扁平上皮癌患者末梢血中の T 細胞亜集団解析. 第 29 回東海頭頸部腫瘍研究会. 2012 年 3 月 10 日(名古屋)
- (14) 足立憲正, 高山英次, 神谷真子, 川木晴美, 倉知正和, 近藤信夫. 金属アレルギーマウスモデルにおいて細菌成分がインターフェロン γ 産生能に及ぼす影響. 第 53 回歯科基礎医学会学術大会・総会. 2011 年 9 月 30 日-10 月 2 日(岐阜)

(15) 長屋亮、神谷真子、仲島崇志、門中貴義、川木晴美、高山英次、永原國央、近藤信夫. マウス脂肪組織由来幹細胞の免疫抑制効果. 第 53 回歯科基礎医学学会学術大会・総会. 2011 年 9 月 30 日-10 月 2 日(岐阜)

(16) 長縄鋼亮・高山英次・馬場隼一・足立誠・本橋征之・神谷雅子・川木晴美・光藤健司・一瀬雅夫・村松泰徳・式守道夫・藤内祝・近藤信夫. 口腔扁平上皮癌患者末梢血 CD4⁺CD57⁺ T 細胞の増加. 第 70 回癌学会学術総. 2011 年 10 月 3 ~ 5 日 (名古屋)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況善政 0 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

近藤信夫 (KONDOH NOBUO)
朝日大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：40202072

(2) 研究分担者

北川善政 (KITAGAWA YOSHIMASA)
北海道大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：00224957

(3) 研究分担者

山崎 裕 (YAMAZAKI YUTAKA)
北海道大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：90250464

(4) 研究分担者

藤内 祝 (TOHNAI IWAI)
横浜市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：50172127

(5) 研究分担者

光藤健司 (MITSUDO KENJI)
横浜市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：70303641

(6) 研究分担者

式守道夫 (SHIKIMORI MICHIO)
朝日大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：70154193

(7) 研究分担者

高山英次 (TAKAYAMA EIJI)
朝日大学・大学院歯学研究科・准教授
研究者番号：70533446

(8) 研究分担者

村松泰徳 (MURAMATSU YASUNORI)
朝日大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：70533446

(9) 研究分担者

本橋征之 (MOTOHASHI MASAYUKI)
朝日大学・大学院歯学研究科・講師
研究者番号：80396390

(10) 研究分担者

出雲俊之 (IZUMO TOSHIYUKI)
東京医科歯科大学・歯学部付属病院・准教授
研究者番号：80322709

(11) 研究分担者

川木晴美 (KAWAKI HARUMI)
朝日大学・大学院歯学研究科・講師
研究者番号：70513670

(12) 研究分担者

神谷真子 (KAMIYA-MIZUNO MASAKO)
朝日大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：80181907