

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年4月26日現在

機関番号：32643

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791875

研究課題名（和文）頭頸部扁平上皮癌の新規予後マーカー開発

研究課題名（英文）Investigation of a novel prognostic marker in head and neck squamous cell carcinoma

研究代表者

堅田 浩司（KATADA KOJI）

帝京大学・医学部・助教

研究者番号：60596112

研究成果の概要（和文）：プロテオミクスの手法を使用して頭頸部扁平上皮癌の新規予後マーカーとなる可能性のあるプレクチンを同定し、機能解析によりプレクチンの発現低下が頭頸部癌細胞の増殖・遊走・浸潤の抑制に関わっていることを解明した。さらに、頭頸部癌の低い生存率に関わっているとされているカドヘリンよりもプレクチンの方が高い相関性を認めた。

研究成果の概要（英文）：We identified plectin as a promising prognostic biomarker in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) using proteomic techniques and functional studies implied that a decreased expression of plectin suppresses the proliferation, migration and invasion of HNSCC cells. Furthermore, the survival rate of patients with high plectin was significantly lower than that of patients with low E-cadherin levels, which is known to correlate with the poor prognosis of HNSCC.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：頭頸部癌、プロテオミクス、予後マーカー

## 1. 研究開始当初の背景

(1)生体内での種々の癌化プロセスは一部の例外を除いてほとんどがタンパク質によって制御されており、発癌のメカニズムの解明、さらには癌化の根本原因である因子にターゲットを絞った分子標的治療薬の開発、あるいは癌の早期診断に有用な腫瘍マーカーの発見には、直接タンパク質に焦点を当てた疾患プロテオーム解析もまた非常に効果的な戦略であると考えられる。

(2)我々は癌組織から抽出したタンパク質や患者血液を用いて、二次元電気泳動法などの技術を駆使してプロテオーム解析を進めてきた。そして現在までに食道癌・肝細胞癌・膵臓癌などにおいて新規疾患マーカーや治療標的候補を発見し、その成果を学会あるいは論文発表している。

## 2. 研究の目的

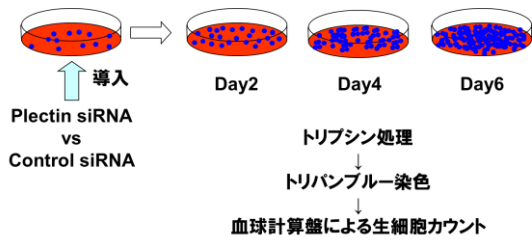
(1)プロテオーム解析で同定したプレクチンというタンパク質が頭頸部癌において発現が上昇している事に関して、癌化メカニズムとの関連を検討する。

(2)プレクチンの予後マーカーとしての意義を他マーカーとの比較や多変量解析にて分析する。

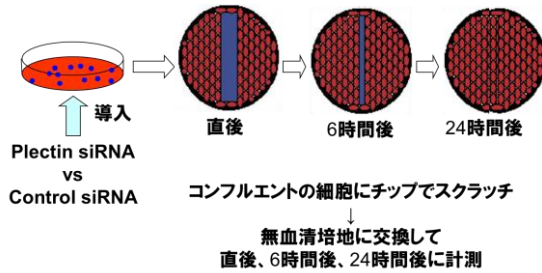
## 3. 研究の方法

(1)頭頸部癌細胞培養株（D562）を用いて、増殖・遊走・浸潤などの関与を証明した。

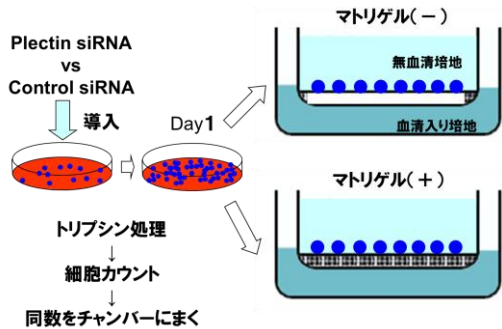
①D562細胞においてsiRNAを用いてプレクチンの発現を抑制させることによって、細胞増殖を調べる cell proliferation assay を行った。



②同様に、wound healing assay により細胞遊走能を調べた。



③同様に、matrigel invasion assay により細胞浸潤能を調べた。



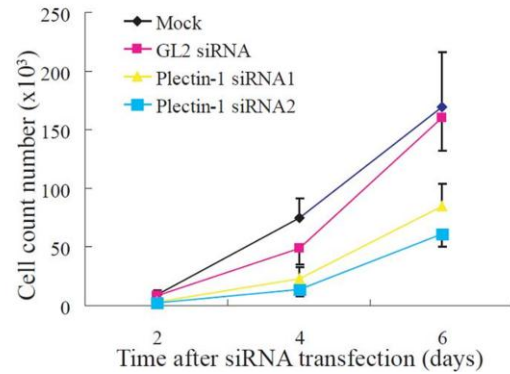
(2) プレクチンの発現と生存率との関係を頭頸部癌の予後マーカーと言われているインテグリン・カドヘリンと比較した。

(3) 頭頸部癌の予後因子としてプレクチンが有意かどうか多変量解析を用いて検討した。

#### 4. 研究成果

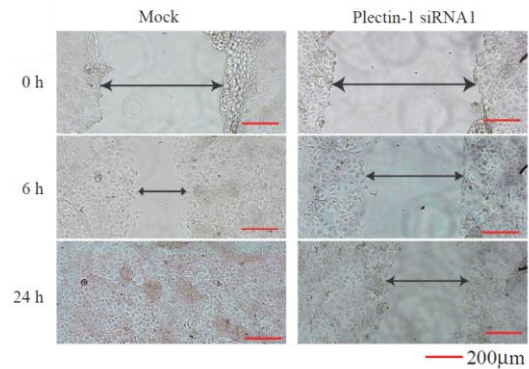
(1) siRNA を用いてプレクチンの発現を抑制させることによる HNSCC 細胞の増殖について調べるため、cell proliferation assay を行った。その結果、図 1 のようにコントロール細胞群と比較してプレクチン抑制群では有意に細胞増殖が抑制されていた。

(図 1)



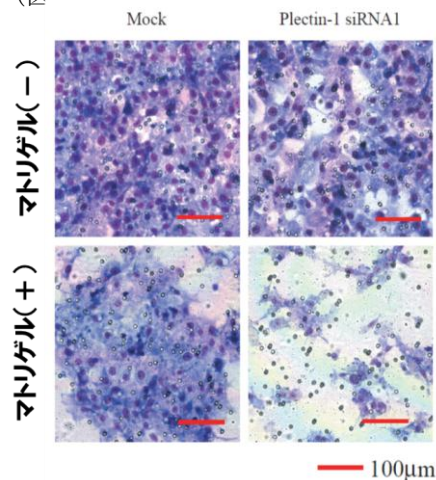
(2) 同様に、wound healing assay を行ったところ、図 2 のようにコントロール細胞群と比較してプレクチン抑制群では細胞遊走能が低下していた。

(図 2)



(3) 同様に、matrigel invasion assay を行ったところ、図 3 のようにコントロール細胞群と比較してプレクチン抑制群では浸潤細胞の割合が減少していた。(図 3)

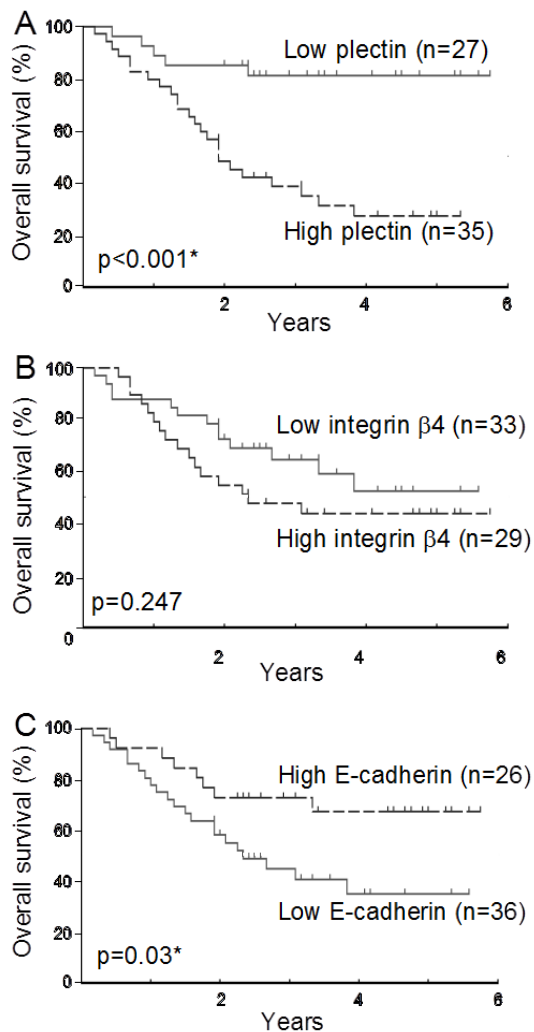
(図 3)



以上の実験により、プレクチンが頭頸部癌組織で上昇していることが細胞増殖・遊走・浸潤に関与していると示唆された。

(4)プレクチンの高発現が HNSCC 患者の予後増悪に関与していることは検証したため、HNSCC 予後マーカーとして報告のあるインテグリン・カドヘリンと比較し、図4のように生存曲線を求めた。

(図4)



上記のように、プレクチンの高発現と HNSCC 患者の予後は、インテグリン・カドヘリンと比較して強い相関が見られた。

(5)HNSCC 患者における臨床病理因子の単変量解析を行い、性別・年齢・腫瘍部位・分化度・ステージ・プレクチン・インテグリン・カドヘリンの発現を図5のように調べた。すると、ステージとプレクチンの発現とカドヘ

リンの発現に予後との有意な差が見られた。(図5)

Variables	Hazard ratio (95% confidence interval)	p
Gender (Male/Female)	0.608(0.211-1.750)	0.3560
Age (<60/≥60)	1.087(0.505-2.340)	0.8312
Location of tumors (larynx, pharynx/others)	0.494(0.218-1.122)	0.0921
WHO histological type (poor-moderate/well)	2.402(0.913-6.325)	0.0759
Clinical stage (I-III / VI)	4.471(1.351-14.801)	0.0142*
Plectin-1 (low/high)	6.359(1.918-21.078)	0.0025*
Integrin β4 (low/high)	1.538(0.739-3.204)	0.2498
E-cadherin (low/high)	0.416(0.184-0.942)	0.0355*

(6)さらに、単変量解析によって有意差が見られたステージ・プレクチンの発現・カドヘリンの発現の3因子について多変量解析を行ったところ、図6のようにすべての因子が独立した予後因子と考えられた。

以上の解析により、プレクチンの発現が高い HNSCC 患者は有意に予後が悪く、プレクチンの発現量と予後との相関はカドヘリン・インテグリンなどのこれまで予後との関係が言われているタンパク質よりも顕著であった。

(図6)

Variables	Hazard ratio (95% confidence interval)	P
Clinical stage (I-III / VI)	3.403(1.024-11.309)	0.0456*
Plectin-1 (low/high)	5.519(1.653-18.433)	0.0055*
E-cadherin (low/high)	0.418(0.184-0.950)	0.0373*

\*Statistically significant.

## 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1件)

①Plectin promotes migration and invasion of cancer cells and is a novel prognostic marker for head and neck squamous cell carcinoma

Koji Katada, Takeshi Tomonaga et.al  
J Proteomics 2012 Mar 16;75(6):1803-15  
査読あり

10.1016/j.jprot.2011.12.018.

〔学会発表〕（計 1 件）

①発表者：堅田浩司  
頭頸部扁平上皮癌における予後マーカー候補の機能解析  
第 23 回日本頭頸部外科学会  
平成 25 年 1 月 25 日  
鹿児島 城崎ホテル

〔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（計 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

堅田 浩司 (KATADA KOJI)  
帝京大学・医学部・助教  
研究者番号：60596112

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：