

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 27 日現在

機関番号：32710

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23792391

研究課題名(和文) 口腔粘膜疾患の癌化に関わる病態形成および獲得免疫機構の解明

研究課題名(英文) The analysis of the carcinogenesis and acquired immunity in the oral mucosa lesion

研究代表者

熊谷 賢一 (Kumagai, Kenichi)

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号：10518129

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：口腔粘膜疾患におけるEGFRシグナル伝達をmRNAおよび蛋白レベルでの発現解析を行った結果、白板症ではErbB4が正常口腔粘膜と比較して有意に高発現しており、さらに上皮異型性と相関していることが明らかとなった。さらに白板症ではErbB1-3の共発現を伴っていることが明らかとなった。ErbB4の過剰発現は口腔扁平上皮癌ではすでに報告されているが、前癌病変での発現解析の報告は本研究が最初であり、EGFRシグナル伝達が口腔前癌病変の病態形成に伴って発現していることから、癌化メカニズムに直接関与する可能性が示唆される結果となった。

研究成果の概要(英文)：The expression of four epidermal growth factor receptor (EGFR) family genes and their ligands were measured in LP tissues from 14 patients and compared with levels in 10 patients with oral lichen planus (OLP) and normal oral mucosa (NOM) from 14 healthy donors by real-time polymerase chain reaction (PCR) and immunohistochemistry. Synchronous mRNA coexpression of ErbB1, ErbB2, ErbB3 and ErbB4 was detected in LP lesions. Out of the receptors, only ErbB4 mRNA and protein was more highly expressed in LP compared with NOM tissues. These were strongly expressed by epithelial keratinocytes in LP lesions, as shown by immunohistochemistry. Regarding the ligands, the mRNA of Neuregulin2 and 4 were more highly expressed in OLP compared with NOM tissues. Therefore, enhanced ErbB4 on the keratinocytes and synchronous modulation of EGFR family genes may contribute to the pathogenesis and carcinogenesis of LP.

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：口腔粘膜 白板症 癌化 癌幹細胞

1. 研究開始当初の背景

口腔粘膜の免疫システムは主に粘膜免疫によって制御されており、細菌、ウイルス、真菌と多岐にわたる外来性の病原微生物の侵入および定着を自然免疫系の働きによって防御している。しかし、その自然免疫系を破綻させて発症する主な口腔粘膜疾患として扁平苔癬、白板症、紅板症などが挙げられる。これら前癌病変の癌化に関わる免疫学的な検討はほとんど成されておらず、不明な点が多い。一方、病理組織学的には、上皮下のリンパ球の浸潤、上皮の角化亢進および表皮の異形成など癌化の可能性を認める組織像を呈するため、発症に関わる病態形成メカニズムについて詳細に検討する必要がある。

一方、癌化の病態形成に関わるシグナル伝達のひとつとして Epidermal Growth Factor Receptor(EGFR) を介したシグナル伝達が注目されている。EGFR の発現については頭頸部癌でも高頻度に認められており、またその発現が予後測定因子として有用な因子であることも報告されている。しかし口腔前癌病変における発現および癌化との関係については不明な点が多いとされている。

2. 研究の目的

本研究では、口腔内の前癌状態あるいは前癌病変（以下、前癌病変とまとめる）の癌化の過程において何らかの獲得免疫系の変化が関与していると仮定し、口腔扁平苔癬、白板症、紅板症ならびに扁平上皮癌の病変部に浸潤する T 細胞による獲得免疫機構の挙動を解析する。さらに、病態形成に関与していると予想される EGFR シグナル伝達に関わる各種受容体および近年癌化に関与すると報告されている癌幹細胞マーカーの遺伝子発現を解析し、各病態間で詳細に比較検討することで、前癌病変の癌化メカニズムに関わるシグナル伝達機構および癌幹細胞の癌化進展度との相関性を明らかにしていくことを目的とした。

3. 研究の方法

研究対象：口腔粘膜疾患（扁平苔癬、白板症、紅板症）患者約 50 例および口腔癌患者約 20 例。

検体：口腔粘膜疾患患者については診断目的による生検切除時の口腔粘膜組織を用いた。口腔癌患者については末梢血と手術時に採取された癌原発巣及び転移したリンパ節組織の一部を用いた。

(1) 患者背景調査

術前に対象患者の年齢、性別、既往歴、現病歴、現症（全身、局所）についての詳細な調査を行うと同時に患者に本研究の意義を説明し、以後の検索の同意を得た。

(2) 検体採取および病理学的検討

口腔粘膜疾患（扁平苔癬、白板症、紅板症）生検あるいは切除時および口腔癌手術時の切除材料を採取し、RNA 安定化試薬に浸漬して

組織内 RNA の安定化をはかった。

(3) 定量的 PCR によるサイトカイン mRNA 発現量の定量

RNA 安定化試薬に保存した組織または末梢血単核球から RNA を抽出し cDNA を合成した後、適切なプライマーを用いて TNF- $\alpha$ 、INF- $\gamma$ 、IL-2、IL-4、IL-5 などのサイトカインおよび EGFR シグナル伝達に關与する EGFR、ErbB2、ErbB3、ErbB4 及びそのリガンドである EGF、AREG、TGF $\beta$ 、EREG、HB-EGF、BTC、NRG1 の mRNA 発現量の定量を real-time PCR により実施した。さらに癌幹細胞マーカーとして CD44、CD133 の mRNA 発現量の定量を real-time PCR により実施した。

(4) 免疫組織染色

組織検体中の発現 EGFR シグナル伝達に關与するモノクローナル抗体を用いての免疫組織学的検討を行った。

4. 研究成果

EGFR シグナル伝達を解析した結果、白板症では ErbB4 が正常口腔粘膜と比較して有意に高発現しており、さらに上皮異型性と相関していることが明らかとなった。さらに白板症では ErbB1-3 の共発現を伴っていることが明らかとなった。ErbB4 の過剰発現は口腔扁平上皮癌ではすでに報告されているが、前癌病変での発現解析の報告は本研究が最初であり、癌化メカニズムに直接関与する可能性が示唆される結果となった。以上の結果をもとに原著論文として International Journal of Oral Science に投稿し掲載受理された。

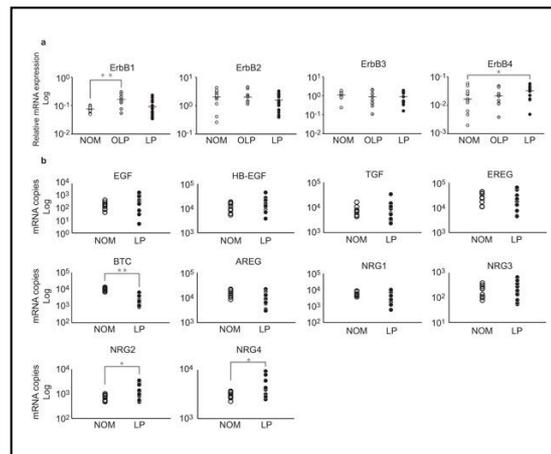


図 1. 白板症と正常口腔粘膜における各種 EGFR および EGF family の発現量

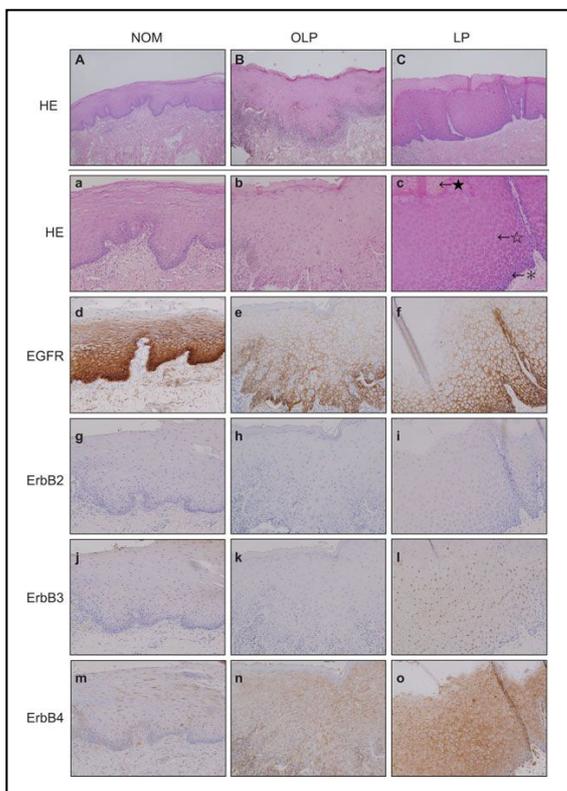


図2．白板症・口腔扁平苔癬・正常口腔粘膜における各種 EGFR family の免疫組織化学的染色

さらに癌化に関わる因子として癌幹細胞に着目し、白板症と口腔扁平上皮癌組織中の癌幹細胞マーカー(CD44, CD133)のリアルタイム PCR による発現解析を行った。とくに口腔扁平上皮癌組織中では正常口腔粘膜に比べて有意な高発現を認め、病期分類やリンパ節転移の有無との相関性を認めた、一方、白板症では有意な高発現は認めなかった。よって CD133 の発現量は口腔扁平上皮癌の癌化進展に直接関与するマーカーであることが明らかとなった。以上の結果をもとに原著論文として Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine and Pathology に投稿し掲載受理された。

##### 5. 主な発表論文等

a (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2件)

Keisuke Fujii, Kenichi Kumagai, Ryuji Suzuki, Yoshiki Hamada  
Clinicopathological significance and prognostic value of CD133 expression in oral squamous cell carcinoma  
Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine and Pathology, 2014, in press

Hiroshi Kobayashi, Kenichi Kumagai, Akito Gotoh, Takanori Eguchi, Hiroyuki Yamada, Yoshiki Hamada, Satsuki Suzuki,

and Ryuji Suzuki

Up regulation of epidermal growth factor receptor 4 in oral leukoplakia  
International Journal of Oral Science 2013 5(1):14-20.

〔学会発表〕(計6件)

国内学会発表 4題

熊谷 賢一, 藤井恵介, 重松宏昭, 中岡雅典, 安川仁章, 川口浩司, 山田浩之, 鈴木隆二, 濱田良樹  
口腔扁平上皮癌における CD44 および CD133 発現と頸部リンパ節転移に関する臨床病理学的検討  
第 68 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会 2014.5.8

藤井恵介, 熊谷 賢一, 重松宏昭, 中岡雅典, 清水 一, 馬杉亮彦, 川口浩司, 山田浩之, 鈴木隆二, 濱田良樹  
口腔扁平上皮癌における CD133 の発現と頸部リンパ節転移に関する臨床病理学的検討  
第 58 回(公社)日本口腔外科学会総会・学術大会(10142) 2013.10.11

熊谷 賢一, 藤井恵介, 北浦一孝, 江口貴紀, 重松宏昭, 岸 悠太, 山田浩之, 川口浩司, 鈴木隆二, 濱田良樹  
口腔癌の頸部リンパ節転移における腫瘍免疫応答の解明  
第 25 回日本口腔診断学会・第 22 回日本口腔内科学会 合同学術大会 2012.9.21-22

小林浩, 熊谷 賢一, 江口貴紀, 重松宏昭, 和気昌宏, 濱田良樹  
口腔白板症および口腔扁平苔癬の病態形成に関わる EGFR family の発現解析  
第 56 日本口腔外科学会総会 2011.10-21-23 (2P.28-6) 大阪

国際学会発表 2題

Kenichi Kumagai, Tsuyoshi Amemiya, Koji Kawaguchi, Ryuji Suzuki, Keisuke Fujii, Hiroaki Shigematsu, Hiroyuki Yamada, Yoshiki Hamada  
Clinicopathological significance and prognostic value of CD133 expression in oral squamous cell carcinoma  
64. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Mainz, Germany 2014.6.12-14

Kenichi Kumagai, Hiroshi Kobayashi, Akito Gotoh, Takanori Eguchi, Hiroyuki Yamada, Ryuji Suzuki, Yoshiki Hamada  
Synchronous modulation of epidermal growth factor receptor family genes in oral premalignant lesions

20th International Conference on Oral and  
Maxillofacial Surgery  
Santiago, Chile, November 1-4, 2011

〔その他〕

ホームページ等

<http://ccs.tsurumi-u.ac.jp/oms>

6．研究組織

(1)研究代表者

熊谷 賢一(KUMAGAI KENICHI)

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号：10518129

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし