

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25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23890080

研究課題名（和文）

ハイリスク前癌病変の診断を可能にする TGF β シグナル関連新規バイオマーカーの探索研究課題名（英文） The study of TGF β associated novel biomarker that could detect high risk premalignant lesion.

研究代表者

萩原 純孝 (HAGIWARA SUMITAKA)

名古屋大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：40547551

研究成果の概要（和文）：

口腔白板症の診断のもと当科にて生検による確定診断を行った症例で、病理組織学的に上皮異形成を認め、かつ3年以上の経過観察がされていた33例を対象にして、3年の経過観察期間で癌化した症例（ハイリスク群）と3年では癌化しなかった症例（対照群）に分けて TGF β シグナル関連分子 CD109 の陽性率を免疫組織学的に検討した。その結果、ハイリスク群の CD109 陽性率が対照群と比べて有意に高い結果であった。

また、舌扁平上皮癌臨床検体を使用した免疫組織学的解析にて、上皮内癌を含む高分化型および中分化型扁平上皮癌において CD109 および Ki-67 の発現様式を検討したところ、両者の発現指数の間に正の相関を認めた。扁平上皮癌の組織診断において CD109 が Ki-67 同様に有用な診断マーカーとなる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Immunohistochemical analysis using paraffin embedded samples of oral dysplasia showed CD109 positive rate of high-risk group was significantly higher than that of control group. In immunohistochemical analysis of tongue squamous cell carcinoma (TSCC), a positive relation was existed between Ki-67 and CD109 expression in well or moderately differentiated TSCC including CIS.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

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：口腔癌・前癌病変・CD109・免疫組織化学・診断マーカー

1. 研究開始当初の背景

以前われわれは、癌精巢抗原の一つである「CD109」というタンパクに着目し、抗CD109抗体を用いた免疫組織学的手法にて当科で採取した口腔癌組織検体を中心に発現解析を行った。その結果、悪性腫瘍の中でも扁平上皮癌（SCC）で高率に陽性であるこ

とや病理学的に異形上皮と診断される組織においても CD109 陽性のものが存在することを報告した。また基礎実験より、CD109 の高発現は Transforming growth factor(TGF) β シグナル伝達系を負に制御し細胞増殖能を亢進させることも実証した。以上の結果より、CD109 と TGF β シグナルの相互作用がすでに前癌病変の段階で癌化に

関与している可能性が示唆された。

CD109 は全長 1445 アミノ酸からなる GPI アンカー型細胞表面タンパク質であり、これまで当研究科腫瘍病理学講座との共同研究により、CD109 が多発性内分泌腫瘍症 (MEN) 2B 型変異を有する RET 癌遺伝子の下流で発現誘導される遺伝子として同定され、その他の臓器では肺・食道および子宮頸部の SCC において有意に高発現していることが明らかとなっている。また、発癌と TGF β シグナルの関連では、TGF β 受容体やその下流分子 Smad の変異・シグナル抑制が大腸癌や膵癌の発症に関与することが文献的に報告されている。

2. 研究の目的

近年、悪性腫瘍の診断において、腫瘍マーカーを応用することにより癌を早期に発見するという手法が開発されている。しかし、口腔に発生する悪性腫瘍もしくはそれに準じる病変の診断に腫瘍マーカーを応用する試みは少ない。

口腔領域は視診・触診などの診査が比較的容易な部位であるにも関わらず、悪性腫瘍の発見が遅れ治癒不能になってしまう症例や、口腔白板症などの悪性腫瘍か否かの鑑別に困難を要する前癌病変にしばしば遭遇し癌化の時期を見逃す結果となることもまれではない。口腔という解剖学的特徴をいかして、口腔癌の早期発見システムを開発することは急務であると思われる。

今回申請者は、将来的に癌化する危険性をもったハイリスク病変を鑑別同定するための病理組織学的病態や、その診断を補助するための新規バイオマーカーの探索を試み、口腔癌早期発見に寄与すべく新しい診断システムを構築する。

3. 研究の方法

(1) ハイリスク白板症の臨床病理学的病態の検討

白板症は古くから前癌病変とされ、その癌化率は 3~17%との報告がある。生検により白板症と確定診断される病変の中には、すでに病理組織診断の時点で将来的に癌化する危険性を持った病変 (ハイリスク病変) が存在しているものと考えられる。しかし、どのような病変がハイリスク病変なのかを同定する明確な病態や客観的評価法はほとんど確立していない。そこで、当科における白板症患者の臨床経過を後ろ向きに調査することにより、白板症患者の実態を把握するとともに、癌化の転帰をたどった症例の病理組織

学的病態を明らかにする。

(2) 白板症臨床検体における CD109 発現の免疫組織化学的評価

これまでに、CD109 は肺・食道、子宮頸部および口腔の扁平上皮癌 (SCC) で有意に高発現することが確認され、SCC の診断マーカーとなりうる可能性が十分にあることを報告してきた。本研究では、SCC 同様に前癌病変である白板症の組織検体で CD109 の発現を検討する。生検から 3 年の経過観察の間に癌化を呈した症例をハイリスク群、3 年では癌化しなかった症例を対照群とし、抗 CD109 抗体を用いた免疫染色を行い、病変部において染色された陽性細胞数の割合が 30%を Cut Off として両群間の陽性率を比較する。

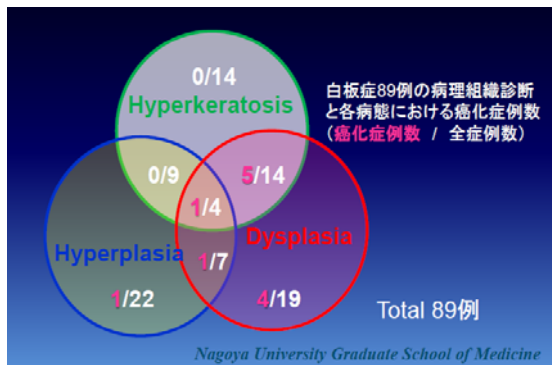
(3) TGF- β /CD109 関連分子の新規バイオマーカーとしての可能性の検討

CD109 高発現細胞株を使用して TGF β シグナルおよび CD109 に強く関連していると思われる分子を同定する。同定された分子を新規マーカーの候補として白板症組織検体に応用して評価する。3 年の経過観察期間で癌化した症例 (ハイリスク群) と癌化しなかった症例 (対照群) の 2 群間で、*in vitro* で同定した TGF β /CD109 関連分子の発現を免疫組織学的に解析し、両群間において発現様式に差があるか検討する。

4. 研究成果

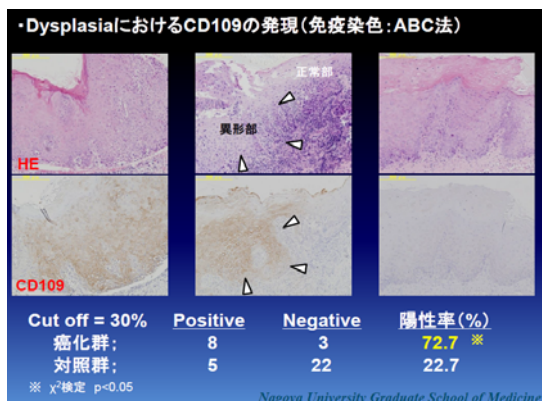
(1) 過去に当科にて口腔白板症を疑い生検による確定診断に至った 100 例を病理組織学的に評価したところ、89 例が組織学的にも白板症と診断され得る病変 (病理学的白板症) であった。残る 11 例は CIS~扁平上皮癌・扁平苔癬・カンジダ等、その他の疾患に分類が可能である病変であった。

89 例の病態別内訳は Hyperkeratosis (HK) 14 例、Hyperplasia (HP) 22 例、Dysplasia (DP) 19 例、それらが各々混在する病変が 34 例であった (図 1)。12 例に癌化を認め (癌化率 13.5%)、臨床的には男性・高齢者・喫煙者・舌に発症した病変で高い癌化率を示した。組織学的には DP を呈する病変で 44 例中 11 例 (25%) が癌化しており有意に高い癌化率を示したが、異型度と癌化率には明らかな相関を認めなかった。また DP に HK が混在する病変では 18 例中 6 例 (33%) が癌化しており最も高い癌化率であった。DP と HK の組み合わせがハイリスクを示唆する病態であると考えられた。



(図 1)

(2) さらに病理組織学的に DP を含むと診断された病変で、3 年以上の経過観察がなされた 33 例に限定して、3 年で癌化を認めた群：ハイリスク群(11 例)および 3 年では癌化を認めなかった群：対照群(22 例)で、抗 CD109 抗体を利用した免疫組織学的手法にて両群を比較した。30%Cut Off にて陽性と判断した場合、ハイリスク群では 11 例中 8 例が陽性(陽性率:73%)となり、対照群 (22 例中 5 例が陽性)と比較し有意に高い陽性率を示した(図 2)。これは CD109 が癌化のリスクを呈する病変の鑑別に使用できる可能性を示唆するものであると思われる。



(図 2)

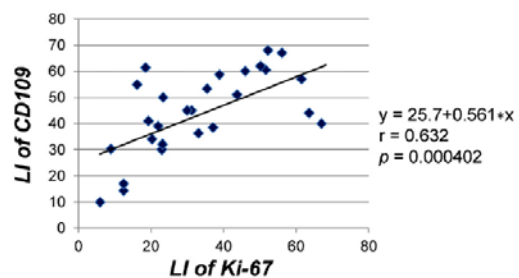
(3) まずは基礎実験として HEK293 細胞に CD109 遺伝子を導入して樹立した CD109 高発現細胞の細胞抽出液から、質量解析法によって CD109 と結合する分子を同定することを試みた。その結果、結合タンパク質と思われる 2 種類の分子を同定することが可能であった。しかし、いずれの分子もエキソソームと呼ばれる微小細胞外分泌小胞の構成タンパク質であり、現時点

での文献的報告では直接的には癌への関与が乏しい分子であった。また生物学的機能において未解明な点が多い分子であったことなどから、それら 2 つの分子を癌化を誘導する因子として結論づけるのは不適切と考え、当初計画していた白版症臨床検体への免疫組織学的応用には更なる検討が必要と判断した。

そこで、CD109 そのものが新規診断マーカーとしての信頼性があるか否かを検証するために、悪性度の診断指標として現在もっとも汎用される増殖マーカーの一つである Ki-67 との相関性を検討することとした(研究計画変更点)。その理由は、CD109 が TGF β シグナルを負に制御し細胞増殖を亢進させるという *in vitro* の結果より、CD109 の増殖マーカーとしての可能性が推測されたためである。

舌扁平上皮癌 (TSCC) 組織検体約 30 例を対象とし、連続切片を抗 Ki-67(MIB-1) 抗体および抗 CD109 抗体を用いて免疫組織学的手法にて評価した。腫瘍部における陽性細胞数率を Labeling Index (LI 値) として定量化し、各々の LI 値の相関関係を単回帰分析法にて評価した。その結果、低分化型 TSCC を除く比較的分化度が高い扁平上皮癌においては、Ki-67 と CD109 の LI 値に正の相関を認め(図 3)、Ki-67 を高発現した病変では CD109 の発現も亢進している傾向があることが示唆された。上皮内癌においてもその傾向は同じであった。

低分化 TSCC については、腫瘍細胞の細胞質があまり発達しておらず、核内に発現が観察される Ki-67 に対して、細胞膜に観察される CD109 の発現が組織学的には正確に評価できないことが一因にあると考えられた。



(図 3)

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）

‘1. Pathological analysis of Ki-67 and CD109 expression in tongue squamous cell carcinoma’

Sumitaka Hagiwara, Noriyuki Yamamoto, Hiroki Furue, Hiroki Sakakura, Toshio Shigetomi, Yoshiki Murakumo, Hideharu Hibi, Masahide Takahashi, Minoru Ueda.

Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology

(Accepted 3 October 2012)

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajoms.2012.10.02>

査読；有

〔学会発表〕（計 3 件）

1) 「口腔扁平上皮癌における CD109 の発現～新規腫瘍マーカーとしての有用性の検討～」

萩原純孝、山本憲幸、古江浩樹、坂倉寛紀、西川雅也、日比英晴、高橋雅英、上田実。

第 57 回日本口腔外科学会総会・学術大会。

2012 年 10 月 19～21 日

（パシフィコ横浜）。

2) 「ハイリスク異形上皮の臨床病理学的検討～病理組織像は癌化の可能性を反映するの
か？～」

萩原純孝、山本憲幸、古江浩樹、和田垣龍、玉利正之、坂倉寛紀、澤村昌嗣、重富俊雄、上田実。

第 56 回日本口腔外科学会総会・学術大会。

2011 年 10 月 21～23 日

（大阪国際会議場）。

3) 「口腔白板症の臨床病理学的検討～ハイリスク白板症の早期診断に向けて～」

萩原純孝、山本憲幸、古江浩樹、松本行史、佐藤文仁、和田垣龍、玉利正之、坂倉寛紀、澤村昌嗣、重富俊雄、上田実。

第 65 回日本口腔科学会学術集会。

2011 年 4 月 21～22 日

（東京：タワーホール船堀）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

萩原純孝 (HAGIWARA SUMITAKA)

名古屋大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：40547551

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし