

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：16401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659898

研究課題名(和文)細胞競合に立脚した口腔扁平上皮癌の早期診断・予防方法の開発に向けた基礎的研究

研究課題名(英文)Effects of cell competition on carcinogenesis of oral squamous cell carcinoma

研究代表者

山本 哲也 (YAMAMOTO, Tetsuya)

高知大学・教育研究部医療学系・教授

研究者番号：00200824

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：今回我々は、細胞競合関連蛋白であるSPARCの口腔扁平上皮の発癌における意義を検討した。SPARCは白板症の症例において異型度が強くなるにつれて陽性率が高くなり、早期浸潤癌では腫瘍細胞の多くに局在が認められた。株化口腔扁平上皮癌細胞にSPARC発現ベクターを導入すると細胞の増殖能が亢進した。さらに、SPARC導入株化OSC細胞を非導入細胞と共培養すると、非導入細胞が排除された。以上の結果より、SPARCは発癌初期においては細胞競合による淘汰からの回避に働くとともに、癌の発生・進展において重要な役割を演じていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The matricellular protein, secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) is thought to be involved in cell competition. The objective of this study is to investigate the role of SPARC in cancerization of oral squamous epithelium. Clinical specimens from pre- and early cancerous lesion, invasive squamous cell carcinoma (SCC) and controls were immunostained with SPARC. Leukoplakia, carcinoma in situ, and early invasive SCC had more SPARC-positive cells than normal mucous epithelium. Cell proliferation was enhanced by SPARC overexpression in OSC cells. When two variants of OSC cells, with or without SPARC overexpression, were co-cultured, SPARC overexpression cells became dominant when they were confluent. SPARC is induced by dysplastic cells in the early stage of cancerization, and may improve survival capability, but is not involved in malignancy. SPARC may act to escape from elimination by cell competition.

研究分野：口腔外科

キーワード：細胞競合 扁平上皮癌 SPARC

1. 研究開始当初の背景

Field cancerization は 1953 年に Slaughter らが提唱した概念で、粘膜上皮の癌化がある 1 点のみで生じるのではなく、同時性・多中心性に癌化する現象をいう。口腔扁平上皮癌においても多中心性癌が認められ、その周囲には様々な程度の異型上皮が存在し、その異型上皮への対応には苦慮させられることが多い。

口腔扁平上皮癌は単一あるいは数個の口腔粘膜上皮細胞が癌遺伝子の活性化や癌抑制遺伝子の不活性化という癌原性の突然変異を多段階的に蓄積することにより発生すると考えられている。したがって、口腔扁平上皮癌の発生初期においては癌の前駆細胞である癌原性細胞（異型細胞）がその周囲を正常細胞で囲まれた状態で存在し、この癌原性細胞と正常細胞の間では細胞間相互作用が生じていると考えられる。近年、この細胞間相互作用によって細胞競合が起こり、癌原性細胞が細胞競合の敗者（Loser）となって組織から排除されること、逆にこの細胞競合機構が破綻すると癌原性細胞が細胞競合の勝者（Winner）となり、浸潤・増殖して癌が発生することが明らかとなっており、口腔扁平癌の発生においても、細胞競合が関与していることが考えられる。

2. 研究の目的

細胞競合による変異細胞排除の破綻が口腔扁平上皮癌の発生に繋がるのではないかと想定されることから、本研究では、口腔扁平上皮癌の発生における細胞競合の関わりを明らかにするとともに、細胞競合に立脚した早期診断・予防法の確立を目的に、多中心性の口腔扁平上皮癌における癌細胞とその周囲の異型上皮、さらには正常粘膜上皮における細胞競合関連蛋白質の発現を検討するとともに、発現異常の認められた蛋白質を導入した口腔粘膜由来上皮細胞と非導入上皮細胞とを混合培養したときの細胞の挙動を検討する。

3. 研究の方法

(1) 口腔扁平上皮の発癌における細胞競合関連蛋白質（SPARC）の発現

これまで、Myc を高発現している細胞は高い適応能を有し勝者となり、逆にその発現が低い細胞は敗者となり細胞死に陥り貪食されると報告されているが、敗者の細胞では SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine) の発現誘導により、アポトーシスを抑制する自己防衛シグナルが働くことが知られている。そこで、口腔扁平上皮の発癌における SPARC 発現の意義を検討すべく、前癌症例（白板症、上皮内癌、早期浸潤癌）、口腔扁平上皮癌症例、健常口腔粘膜の免疫組織化学的検討を行う。

(2) *In vitro* における株化口腔扁平上皮癌

細胞の増殖能に及ぼす SPARC の影響

当科で樹立した株化口腔扁平上皮癌（OSC）細胞を用い、OSC 細胞における SPARC の発現をウエスタンブロッティング法にて検討するとともに、OSC 細胞の増殖能および遊走能に及ぼす SPARC の影響を検討すべく、SPARC を siRNA にてノックダウンあるいは SPARC 発現ベクター導入により強発現させたときの増殖能を MTT アッセイにて測定する。

(3) *In vitro* における株化口腔扁平上皮癌細胞の細胞競合に及ぼす SPARC の影響

SPARC 導入細胞と非導入細胞とを一定の比率で共培養し、コンフルエントになった状態で共焦点レーザー顕微鏡にて細胞比を観察する。

4. 研究成果

(1) 白板症、上皮内癌、早期浸潤癌の切除組織における免疫組織化学的検討

前癌病変は白板症 27 例と早期癌 31 例の計 58 例を対象とし、白板症は組織学的に hyperplasia、mild dysplasia、moderate dysplasia、severe dysplasia および PVL (proliferative verrucous hyperplasia) に、早期癌は上皮内癌と早期浸潤癌に分けて検討し、対照として健常口腔粘膜 15 例を用いた。(表 1)

表 1: 症例の内訳

項目			例数	(%)
臨床・病理組織診断	白板症	hyperplasia	12	(16.4)
		mild dysplasia	4	(6.9)
		moderate dysplasia	5	(6.8)
		severe dysplasia	1	(1.7)
		PVL	5	(6.8)
		癌	上皮内癌	15
	早期浸潤癌	16	(27.6)	
部位	舌	歯肉	12	(16.4)
		頬粘膜	11	(15.1)
		口唇	5	(6.8)
		口底	5	(6.8)
		口蓋	3	(4.1)

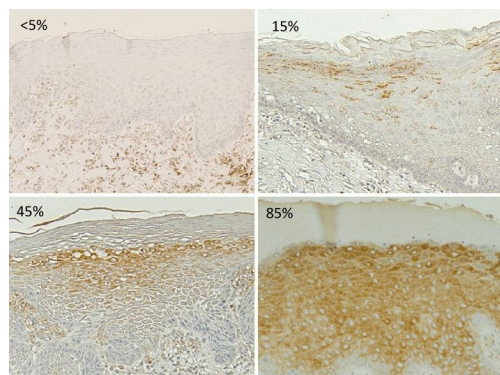


図 1: 病変における SPARC の局在
SPARC の局在は上皮内の陽性細胞率を評価した。

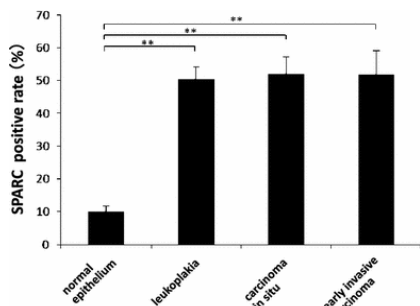


図 2：各病変の上皮細胞における SPARC の陽性細胞率
 健常粘膜に比べ、白板症、上皮内癌、早期浸潤癌では SPARC 陽性細胞率が有意に高かった。

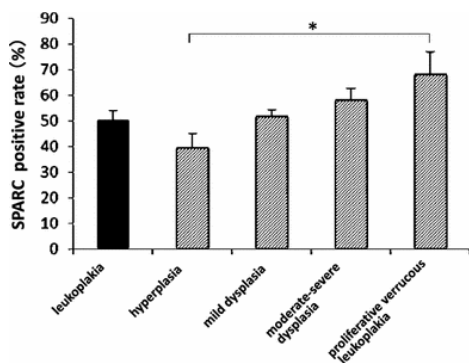


図 3：白板症における SPARC 陽性細胞率
 PVL で最も SPARC 陽性細胞率が高く、上皮の異型が強いほど SPARC 陽性細胞率が高かった。

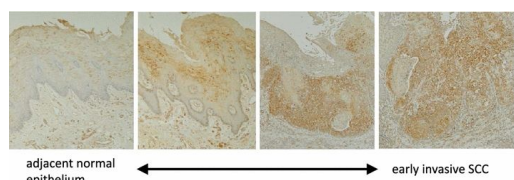


図 4：舌の早期浸潤癌における SPARC の免疫染色像
 SPARC の染色性は正常上皮に近接する部位ではわずかであるが、異形上皮、腫瘍組織では強染された。

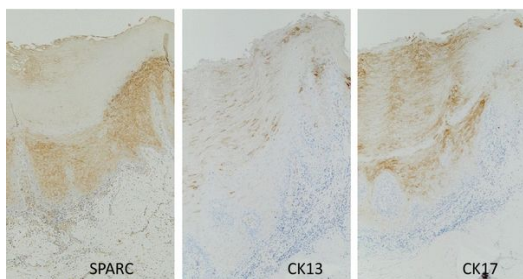


図 5：中等度の上皮異形成を呈する白板症における SPARC およびサイトケラチン発現
 SPARC および CK-17 は有棘細胞層で染色され、基底層や基底上層では染色されなかった。CK13 は SPARC 陽性領域では染色されなかった。

(2) 口腔扁平上皮癌における免疫組織化学的検討

対象の内訳を表 2 に示す。

表 2：口腔扁平上皮癌症例

項目		例数	(%)
性別	男性	47	(71.2)
	女性	19	(28.8)
部位	舌	40	(60.6)
	頬粘膜	13	(19.7)
	口底	13	(19.7)
T分類	T1	11	(16.7)
	T2	38	(57.6)
	T3	6	(9.1)
	T4	11	(16.7)
N分類	N0	44	(15.1)
	≥N1	22	(6.8)
M分類	M0	66	(100.0)
	M1	0	(0.0)

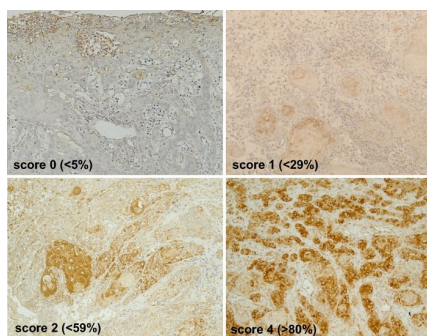


図 6：口腔扁平上皮癌における SPARC の局在
 SPARC の局在は腫瘍の陽性細胞率を評価した。

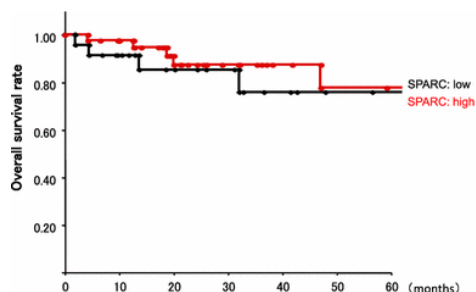


図 7：SPARC の発現と 5 年生存率
 SPARC の発現と生存率の間に相関は認められなかった。

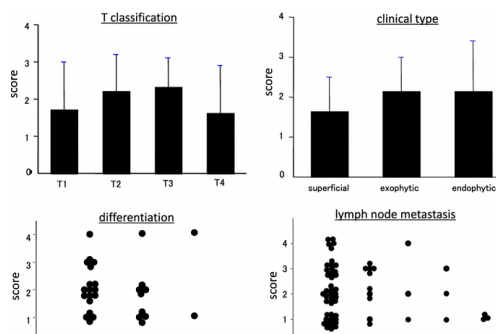


図 8：SPARC の発現と臨床病理学的因子
 染色スコアと T 分類、臨床型、分化度、リンパ節転移との間に関連はなかった。

(3) *In vitro* における株化口腔扁平上皮癌 (OSC) 細胞の増殖能に及ぼす SPARC の影響

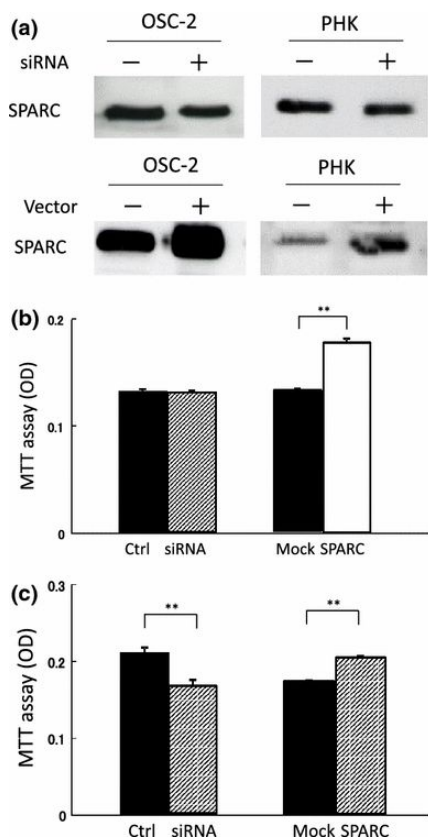


図 9 : OSC および PHK 細胞の増殖能に対する SPARC の影響
SPARC 発現ベクターを導入すると OSC-2 細胞、PHK 細胞の増殖はいずれも有意に促進された。

(4) *In vitro* における OSC 細胞の細胞競合に及ぼす SPARC の影響

SPARC 非導入細胞と導入細胞とを 1:1 および 2:1 の比率で共培養し、コンフルエントになった状態で共焦点レーザー顕微鏡にて細胞比を観察した。

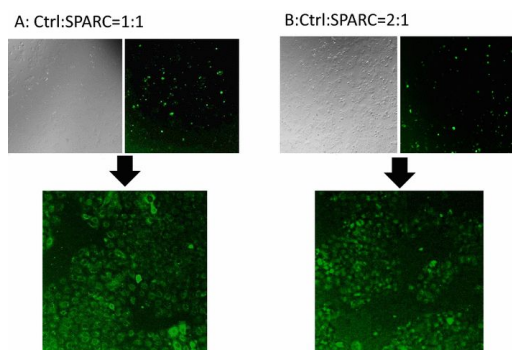


図 10 : 細胞競合に及ぼす SPARC の影響
SPARC 導入細胞は非導入細胞よりも優位に増殖し、コンフルエントになった時にはほとんどが SPARC 導入細胞で占められていた。

以上の結果より、SPARC は発癌初期において細胞競合による淘汰からの回避ならびに癌の発生・進展において重要な役割を演じていることが示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Yamada T, Ohno S, Kitamura N, Sasabe E, Yamamoto T. SPARC is associated with carcinogenesis of oral squamous epithelium and consistent with cell competition. Med Mol Morphol.2014 Oct 14.[Epub ahead of print]
DOI:10.1007/s00795-014-00895

〔学会発表〕(計 3 件)

大野清二、笹部衣里、北村直也、山本哲也 口腔扁平上皮癌の発癌における SPARC を介した細胞競合の関わり 第 49 回日本口腔組織培養学会学術大会 2012.11.17

山田朋弘、大野清二、笹部衣里、山本哲也 口腔扁平上皮の発癌における SPARC を介した細胞競合の関わり 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 学術総合センター橋記念講堂 (東京都)

山田朋弘、大野清二、笹部衣里、長崎敦洋、北村直也、山本哲也 口腔扁平上皮癌の発癌ならびに進展における SPARC の関わり 第 66 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会 2012.5.17-18 広島国際会議場 (広島県)

〔その他〕

ホームページ等

http://www.kochi-ms.ac.jp/~fm_dntst/index.htm

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

山本 哲也 (YAMAMOTO, Tetsuya)
高知大学・教育研究部医療学系・教授
研究者番号 : 00200824

(2) 研究分担者

山田 朋宏 (YAMADA, Tomohiro)
九州大学・歯学研究科 (研究院)・准教授
研究者番号 : 60335619

笹部 衣里 (SASABE, Eri)
高知大学・教育研究部医療学系・講師
研究者番号 : 40363288

北村 直也 (KITAMURA, Naoya)
高知大学・教育研究部医療学系・助教
研究者番号 : 70351291