

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462865

研究課題名(和文) 論理型多変量解析を応用した新規口腔扁平上皮癌臨床病理診断システムの構築

研究課題名(英文) Development of a logic covariate model for prognostic prediction of oral squamous cell carcinoma

研究代表者

関 幸子 (SEKI, Sachiko)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・客員研究員

研究者番号：90447491

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、日々の病理診断で得られる情報を統計学的に解析し、予後予測のためにモデルを作成することを目的に行われた。口腔扁平上皮癌症例を用いて、予後と関連があると疑われているpodoplaninの発現、cadherinの発現、及び炎症反応を指標にして病理組織解析を行い、その情報をCox回帰分析し、podoplanin、cadherin、炎症反応それぞれについて予後予測モデルを構築することができた。この成果から、病理診断情報を他の臨床情報等と組み合わせることで精度の高い予後予測が可能であると考えられ、さらに研究を進める意義があると判断された。

研究成果の概要(英文)：Statistical analysis has been widely applied to social medicine and clinical medical fields. However, in the field of pathology, the diagnostic data are not always provided for statistical analysis, which should be effective for prognostic prediction of malignant tumors. In this study, Cox regression analysis was performed using data of histopathological analysis for the expression of podoplanin, cadherin and inflammatory reaction, which have been suggested to associate with prognosis or malignancy of oral squamous cell carcinoma. We could produce novel models to predict prognosis of oral squamous cell carcinoma using data for the expression of podoplanin, the expression of cadherin and inflammatory reactions, respectively. These data strongly suggested that information of histopathological analysis was useful to produce models to predict prognosis of oral squamous cell carcinoma in combination with other clinical data.

研究分野：口腔病理学

キーワード：口腔扁平上皮癌 予後予測 統計解析

### 1. 研究開始当初の背景

今日の病理学研究は病因解明の先端を切り開く分子細胞生物医学研究と、実際に生じた疾患を基にした臨床病理学研究の、大きく2つに分類される。前者は医学生物学の進展に不可欠であり、後者はそれらの知見を疾患の診断や治療に有効に応用する方法を切り開くために不可欠である。培養細胞や動物実験では成り立つものの、それらの知見が実際の臨床病理診断にはなかなか応用されないことも多い。その理由のひとつとして、評価が不十分であることが挙げられる。とりわけ我が国では専門の統計学者が少ないことから、統計学的評価は単変量の有意差検定にとどまるものも多く、より戦略的な統計解析により、様々な重要生物因子を有効に臨床病理診断に応用するための研究が強く求められている。

当研究室では、先端研究の成果を医学・歯学に応用する方法を開発することが病理学に課せられた重要な役割のひとつであることを認識し、専門の統計学者とともに、有望な各種重要分子を臨床診断に応用するモデルの開発研究を行っている。まず、口腔扁平上皮癌の予後予測因子としても注目されているが相反するデータも多く、臨床病理診断への応用には至っていない VEGF に着目し、口腔扁平上皮癌約 90 症例を用いて病理組織学的に検討し、予後を目的変数として広汎な多変量解析を行った。その結果、IPF と名付けた変数を用いたロジック回帰モデルによって、既存の臨床疫学統計手法では得られない精度の高い予後予測が可能であることを証明し、当該分野の著名な学術雑誌に成果を報告した(Oral Oncol. 47:588-593, 2011)。この研究により、口腔領域ではまだ世界的に見てもあまり行われていないロジック回帰モデルを応用し、さらに他の因子を用いて口腔扁平上皮癌の予後予測モデルを作成することは、現在評価が分かっている有望な因子と予後との関連や、生物学的意義を明らかにする点でも大きな意義があると考えられた。

### 2. 研究の目的

がん幹細胞が存在することが理論的に裏付けられているが、上皮細胞由来の癌細胞が間葉系由来の細胞に近い性格に変化する上皮間葉移行(EMT)が起こることも細胞生物学的に証明され、実際にヒトの腫瘍でもそのようなことが起こっているか否かについて世界中で研究が進められている(Science 331:1559-1564, 2012)。EMT は主として TGF- $\beta$  の作用により上皮細胞の接着分子である E-cadherin の発現が低下するとともに、間葉系タイプの接着分子である N-cadherin の発現が上昇して間葉系細胞の性格に変化すると考えられ、E-cadherin の阻害因子である Snail の発現がそれに関与することが細胞生物学的に確認されている(Proc. Jpn. Acad. Ser. B 45:314-323, 2009)。なお、口腔扁平

上皮癌で古くから知られている癌細胞の紡錘形細胞化が EMT とどのように関連するかについては不明である(Int. J. Cancer 127:1356-1362, 2010)。また、口腔扁平上皮癌では、腫瘍間質結合組織に炎症性細胞浸潤が強く見られる場合に予後がよいことが昔から疑われているが、最近ようやく腫瘍周囲の間質結合組織にリンパ球浸潤が強いと予後がよいことを示す論文が出始めた(J. Oral Pathol. Med. 39:667-671, 2010)。一方、逆にリンパ球が腫瘍の転移に寄与するとする新たな仮説も出され(Cancer Epidemiol. 36:354-363, 2012)、実際の症例を用いた検証が待たれる。

本研究課題では、1991年から2008年までの口腔扁平上皮癌症例について、組織学的分化度、癌細胞の紡錘形細胞化、腫瘍間質の炎症性細胞浸潤の種類と程度について病理組織学的に分類し、基礎データを作成する。次に、EMT 関連分子の発現、扁平上皮癌細胞の紡錘細胞化、及び間質結合組織に浸潤する炎症性細胞を解析し、統計解析を行った。さらにこれらのデータを統合し、すでに VEGF の研究で応用に成功した、病理組織および臨床データに対して論理型演算を組み合わせた新規の統計学的多変量解析であるロジック回帰モデルを用いて患者の予後予測因子を探索することで、精度の高い予後予測モデルを構築することを目指した。

### 3. 研究の方法

長崎大学歯学部における約 15 年間の扁平上皮癌約 80 例につき、組織学的分化度を確認し、腫瘍浸潤先端部位での癌細胞の紡錘形細胞化の有無を判定する。さらに、腫瘍間質については炎症性細胞浸潤の種類と程度を詳細に検討し、腫瘍細胞に対する生体の炎症反応の強さを分類し、患者の予後、TNM 分類、病期分類とともに基礎データを作成した。

次に、細胞生物学的に世界的に注目されている EMT 現象が、実際に発生した口腔扁平上皮癌においてどのような意義を有するか、さらに、診断学的意義があるか否かを、EMT 関連分子の免疫組織化学的検討及び、広汎な統計解析処理により確認した。

EMT のマーカーとして、E-cadherin, N-cadherin, N-cadherin の誘導作用があると示唆されている CD75 (J. Biol. Chem. 289:34627-34641, 2014) の発現を免疫組織化学的に確認するとともに、上皮細胞の紡錘細胞化の有無について確認した。

間質結合組織への炎症反応については、リンパ球浸潤及び好中球の腫瘍胞巣内への浸潤の指標とした微小膿瘍形成を検討したのに加え、NK 細胞のマーカーである NKp46 の抗体を用いて免疫組織化学的に NK 細胞の出現状況を検討した。

また、リンパ管への侵襲の有無を検討する目的で、リンパ管内皮細胞を特異的に染

色する podoplanin 抗体を用いて組織を免疫組織化学的に染色し、その結果も検討した。これらのデータについても、広汎な統計解析処理を行い、診断学的な意義を確認した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 口腔扁平上皮癌細胞での podoplanin の発現と予後との関連

当初口腔扁平上皮癌細胞のリンパ管への侵襲を見やすくする目的で行った免疫組織化学染色であったが、意外にも口腔扁平上皮癌細胞の細胞質にもかなり高率に染色されることから、podoplanin の発現自体が口腔扁平上皮癌患者の予後と関連するかどうかを確認することにした。Podoplanin は血小板の凝集に参与する糖タンパクの一種であり、動物への移植実験において転移能が高い腫瘍細胞株で高い発現が見られたことから、悪性腫瘍の転移に関わることが疑われた (Cancer Res. 55:7670773, 1995; J. Biol. Chem. 278:51599-51605, 2003)。しかし、決定的な証拠が得られないまま経過し、これとは別に、リンパ管の内皮細胞に高い特異性をもって染色されることが発見され (Am. J. Pathol. 154:385-394, 1999)。現在ではリンパ管の同定を目的に病理組織検査で広く podoplanin 抗体が用いられている。

さらにこれらの研究とは別に、podoplanin が一部の腫瘍細胞自体で発現していること、また、特に口腔扁平上皮癌において発現が認められることが見出されていた (Int. J. Cancer 113:899-910, 2005; Cancer 107:563-569, 2006; Oral Oncol. 47:873-878, 2011; Pathobiol. 78:171-180, 2011)。この中のいくつかでは、podoplanin の発現が口腔

扁平上皮癌の予後不良を予測する因子であることが示唆されているが、統計解析が不十分でまだ検討を行う余地があると判断された。こうした経緯から、当初の予定を変更し、まず口腔扁平上皮癌での podoplanin の発現の有無が予後予測因子として活用できるかを解析することにした。

Podoplanin の染色は癌細胞の分化度に無関係に認められ、病理組織切片中に存在する口腔扁平上皮癌細胞の 50% 以上に染色される群と 50% 未満に染色される群の 2 群に分類した。他の種々の臨床情報についても検討し、予後との関連を単変量解析にて検討したところ、podoplanin が 50% 以上染色される群では 50% 未満の群に対して有意に予後が悪いことが判明した (Table 1)。単変量解析において予後との有意な関連が検出された因子についてさらに Cox 回帰分析を行い、可能な限り高い確率で予後を予測できるモデルの構築を行ったところ、年齢 (70 歳以上または 70 歳未満)、浸潤様式 (Jakobsson の分類で 1 及び 2 [分類 a] または 3 [分類 b] 及び 4 [分類 c])、TNM 分類 (T3, T4 または T1 または T2) と podoplanin の発現 (50% 以上または 50% 未満) を組み合わせた場合、最も正確に口腔扁平上皮癌の予後予測ができるという結果を得た。例えば、podoplanin の発現が 50% 以上かつ年齢が 70 歳以上かつ T3, T4 という進行癌の状態の患者が死亡するリスク (RR) は、podoplanin の発現が 50% 未満かつ年齢が 70 歳未満かつ T1 という早期癌の患者に対して実に 125 倍にもなるという結果が得られた (図 1)。

Table 1  
Study subjects by factors and their estimated relative risk (RR).

Factor	Category	Prognosis		Cox Regression	
		Good	Poor	RR	p-value
Age	<70	19	31	1.00	-
	≥70	3	29	2.93	<0.001
Sex	Male	16	39	1.00	-
	Female	6	21	0.94	0.809
Differentiation grade	Well	16	50	1.00	-
	Moderate	4	6	0.76	0.508
	Poor	2	4	1.05	0.928
Mode of invasion	a	12	3	1.00	-
	b	5	28	7.76	<0.001
	c	5	29	8.62	<0.001
Podoplanin	<50%	21	46	1.00	-
	≥50%	1	10	2.16	0.032
T	1	9	6	1.00	-
	2	9	21	2.65	0.036
	3	1	6	6.24	0.002
	4	3	27	5.31	<0.001
N	0	16	24	1.00	-
	1	2	13	2.19	0.024
	2	4	23	2.23	0.007
Stage	I or II	15	16	1.00	-
	III or IV	7	44	2.99	<0.001
Ki-67	1	3	0	1.00*	-
	2	2	4	1.00*	-
	3	2	7	1.74	0.380
	4	7	15	1.43	0.527
	5	8	34	1.77	0.281

\*: As for Ki-67, we pooled patients with score 1 and 2 as a reference group, because the number of deaths is zero for the patients with score 1.

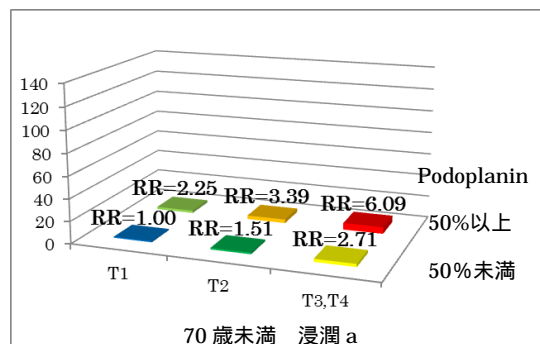
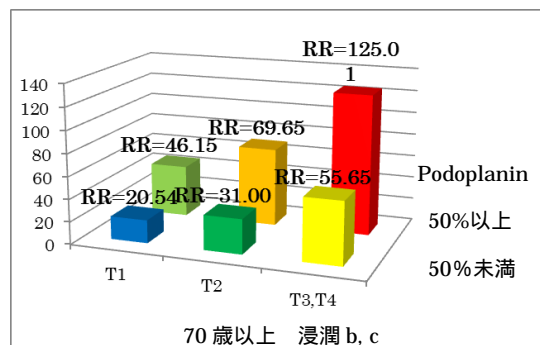


図 1.

これらの結果から、podoplanin が多くの口腔扁平上皮癌で発現しており、かつ、強い発

現が予後不良を予測することが示唆され、極めて有用な口腔扁平上皮癌の予後予測因子であると考えられた。またさらに、年齢、浸潤様式及び TNM 分類を組み合わせることで、より正確な予後予測が可能になると考えられた。本研究成果は論文としてまとめ、国際学術雑誌に発表した。

## (2) 炎症・免疫反応を用いた進行口腔扁平上皮癌患者の予後予測モデル

悪性腫瘍の病理組織診断の情報のうち、腫瘍細胞の広がりや組織型すなわち腫瘍細胞の分化度が有用な予後予測情報となっている。しかし、患者の免疫能自体が予後に大きく関与していると思われ、病理組織診断で容易に得ることができる指標である炎症性細胞浸潤の情報が予後予測に役立つと考えられる。検討した間質へのリンパ球浸潤の程度、腫瘍巣内への好中球による微小膿瘍形成の有無、さらに癌細胞を殺す機能をもつ NK 細胞の浸潤の程度を用いた口腔扁平上皮癌の予後予測モデルの構築を試みた。今回は、同じ解剖学的広がりを持つ患者での予後予測という、より困難な課題に挑戦するため、進行癌であるステージ III 及び IV の症例のみを抽出して解析を行った。

単変量解析では、間質へのリンパ球浸潤の

Table 2. Study subjects by factors and their estimated relative risk (RR)

Factor	Category	Sample size	Prognosis		Cox Regression	
			Good	Poor	RR	p-Value
Sex	0	11	1	10	1.000	-
	1	30	6	24	0.733	0.416
Age	<69	22	5	17	1.000	-
	70-	19	2	17	1.577	0.187
Stage	III	9	2	7	1.000	-
	IV	32	5	27	1.475	0.362
T-stage	1, 2	13	3	10	1.000	-
	3	4	1	3	1.012	0.985
	4	24	3	21	1.689	0.176
N-stage	0	6	1	5	1.000	-
	1	13	2	11	0.777	0.640
	2	22	4	18	0.761	0.590
Dense lymphocyte infiltration	0	24	1	23	1.000	-
	1	17	6	11	0.471	0.458
Microabscess	0	33	2	31	1.000	-
	1	8	5	3	0.221	0.014
Differentiation grade	0	5	2	3	1.000	-
	1	5	1	4	1.770	0.458
	2	31	4	27	1.571	0.460
Mode of invasion	0	20	2	18	1.000	-
	1, 2	21	5	16	0.732	0.368
NKp46	0	27	6	21	1.000	-
	1	10	1	9	1.222	0.619
	2	4	0	4	1.496	0.473

強弱、腫瘍巣内の微小膿瘍形成の有無が予後に関与することが判明したが、NK 細胞の浸潤程度については予後との有意な差が見られなかった (Table 2)。通常は多変量解析の

因子として単変量解析で有意な差が認められたものを利用するのであるが、本研究ではあえて NK 細胞の浸潤の程度についても多変量解析の因子として用いてみることにした。Cox 回帰分析の結果では、腫瘍巣内に微小膿瘍の形成が見られ、かつ NK 細胞の浸潤が軽度である患者とそれ以外の患者の比較が最も効率よく予後を予測するという結果が得られた (Table 3, 図 2)。本研究成果は国際学術雑誌に採択され、印刷予定である。

Table 3. Results of Cox proportional hazards regression model (N=41)

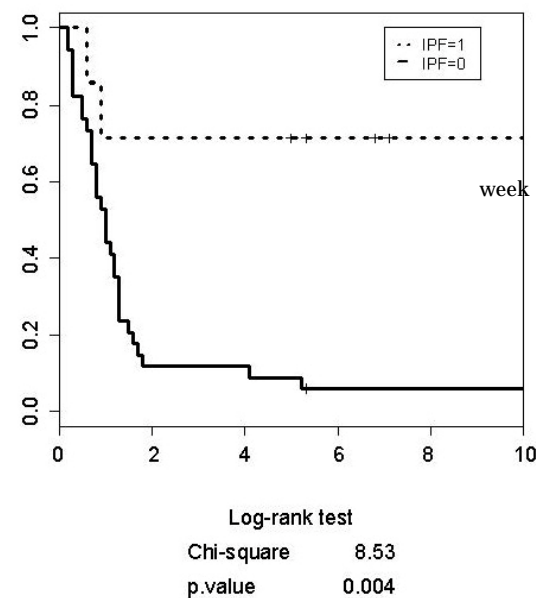
Covariate	Estimated coefficients	SE	p-value	RR	95% confidence interval		AIC
					Lower	Upper	
<i>Selected logistic regression model</i>							
IPF*	-1.875	0.74	0.011	0.15	0.04	0.65	201.8
<i>Other univariate and multivariate models with a linear combination of covariates</i>							
<i>Univariate model 1</i>							
Dense lymphocyte infiltration	-0.752	0.37	0.044	0.47	0.23	0.98	208.4
<i>Univariate model 2</i>							
Microabscess	-1.510	0.61	0.014	0.22	0.07	0.73	203.8
<i>Multivariate model</i>							
Dense lymphocyte infiltration	-0.170	0.41	0.681	0.84	0.38	1.90	205.6
Microabscess	-1.390	0.68	0.041	0.25	0.07	0.95	

\* N: number of patients in the model

IPF: important prognostic factors, IPF=1 when NKp46 = (0 or 1) and Microabscess = 1,

IPF=0 when (NKp46 = 2) or (NKp46 = (0 or 1) and Microabscess = 0)

図 2 . 生存曲線



## (3) Cadherin の発現変化を用いた口腔扁平上皮癌の予後予測モデル

Cadherin は細胞接着分子のひとつであり、上皮系と間葉系ではそれぞれ E-cadherin、N-cadherin を発現していることが知られている。上皮細胞は通常互いに接し合って細胞塊を形成しているが、間葉系の細胞は一つ一つがばらばらに独立して存在する傾向があ

る。最近の研究から、上皮由来である癌細胞が間葉系の細胞に変化し、癌胞巣という癌細胞の集団がばらばらになり、一つ一つに分かれた癌細胞が組織中に急速に浸潤して行くという、上皮間葉移行現象が起こっていることが発見され、注目されている。その時、もともと上皮系の E-cadherin を発現している癌細胞が、上皮間葉移行を起こすと E-cadherin の発現が弱まり、N-cadherin を発現するように変化することが知られており、これらは上皮間葉移行の重要なマーカーとされている。

本研究では、口腔扁平上皮癌での E-cadherin 及び N-cadherin の発現を免疫組織化学的に検討し、それらの発現と予後との関連を統計学的に解析し、予後予測モデルの作成を試みた。まず、悪性腫瘍が組織中に浸潤して行くのは腫瘍の最先端である「浸潤先端」部位であることから、cadherin の発現変化を解析する部位を浸潤先端部位に局限して評価する方法が妥当であると考えられる。その一方で、腫瘍の浸潤部位全体で評価することも意義がある可能性がある。そのため、E-cadherin、N-cadherin 及び N-cadherin の誘導因子のひとつである CD75 の評価は、浸潤先端部位と浸潤部位全体の二つの方法で行った。

E-cadherin と N-cadherin の発現は互いに相反する傾向を示し、癌細胞は E-cadherin (+)/N-cadherin (-)、E-cadherin (+)/N-cadherin (+)、E-cadherin (-)/N-cadherin (-)、E-cadherin (-)/N-cadherin (+) のいずれかに分類された。また、N-cadherin の誘導因子のひとつである CD75 は N-cadherin と類似した発現傾向を示したが、単変量解析で予後との相関が見られず、多変量解析には用いなかった。Cox 回帰分析の結果は、下の表 (Table 4) に示す通りであった。すなわち、浸潤先端部位での評価も浸潤部位全体の評価でも、N-cadherin の発現が予後予測に有効であり、E-cadherin の発現は有効でなかった。さらに、浸潤先端部位と浸潤部位全体との比較では、わずかに浸潤部位全体での評価が勝っていたものの、浸潤先端部位での評価とほとんど

Table 4.

	Regression coefficient	Std. Error	P-value	Relative Risk(RR)	95%CI of RR		
					Low	Up	Aic
第1法：濃度、面積							
(Intercept)	-0.253	0.822	0.758	0.78	0.16	3.88	80.0
E.cad.濃度(±_+_++)vs(-)	-0.458	0.894	0.609	0.63	0.11	3.65	
N.cad.濃度(±_+_++)vs(-)	1.818	0.645	0.005	6.16	1.74	21.83	
年齢 70 以上 vs 70 未満	1.844	0.739	0.013	6.32	1.49	26.89	
第2法：先端染色							
(Intercept)	-0.583	0.516	0.259	0.56	0.20	1.54	78.3
N.cad.先端染色(±_+_++)vs(-)	1.719	0.610	0.005	5.58	1.69	18.44	
年齢 70 以上 vs 70 未満	1.825	0.733	0.013	6.20	1.48	26.07	
第3法：浸潤部位全体							
(Intercept)	-0.082	0.416	0.845	0.92	0.41	2.08	81.2
E.cad.先端染色 +vs-	-0.182	0.729	0.803	0.83	0.20	3.48	
N.cad.先端染色 +vs-	1.576	0.610	0.010	4.84	1.46	15.97	
年齢 70 以上 vs 70 未満	1.661	0.713	0.020	5.27	1.30	21.31	
第4法：浸潤部位全体							
(Intercept)	-0.114	0.395	0.773	0.89	0.41	1.94	79.2
N.cad.先端染色 +vs-	1.580	0.609	0.009	5.21	1.29	20.71	
年齢 70 以上 vs 70 未満	1.643	0.708	0.020	5.17	1.29	20.71	

差がなかった。これらの結果をまとめて論文を執筆中であり、国際学術雑誌に投稿予定である。

## 総合的考察

本研究課題では、podoplanin、炎症性反応、cadherin を指標にして口腔扁平上皮癌の予後予測モデルの作成を試みた。Cox 回帰分析において各因子を並列して解析する線形解析が有効であった場合 (podoplanin の成果) と、論理演算を応用したロジックモデルが有効であった場合 (炎症性反応及び cadherin の成果) があった。いずれにしても病理組織学的に悪性度と関連があると疑われている分子や現象については、他の臨床情報等を組み合わせ多変量解析することで、より精度の高い予後予測モデルを作成することが十分に可能であることが示唆された。

本研究成果をきっかけに、多施設での追試または、複数施設による大規模調査研究を経て、病理組織診断の情報を基にした予後予測モデルを確立する努力を今後も続けて行く必要があると判断された。

## 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2件)

Ikeda, T., Seki, S., Fujiwara, M., Matsuura, M., Ozaki, Y., Fujita, S., Ikeda, H., Umeda, M., Asahina, I. Low-risk population among patients with TNM stages III and IV oral squamous cell carcinoma. *Oncol. Lett.*, 2016, in press.

査読有

Seki, S., Fujiwara, M., Matsuura, M., Fujita, S., Ikeda, H., Umeda, M., Asahina, I., Ikeda, T. Prognostic value of podoplanin expression in oral squamous cell carcinoma a regression model auxiliary to UICC classification. *Pathol. Oncol. Res.* 20:521-528, 2014.

DOI: 10.1007/s12253-013-9723-0

査読有

[学会発表](計1件)

関 幸子, 藤原睦憲, 藤田修一, 池田 通. 舌扁平上皮癌における予後関連因子としての podoplanin の意義. 第 103 回日本病理学会総会, 2014 年 4 月 24-26 日, 広島国際会議場 (広島市).

[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

関 幸子 (Seki, Sachiko)  
長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・  
客員研究員  
研究者番号：90447491

##### (2) 研究分担者

池田 通 (Ikeda, Tohru)  
長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・  
教授  
研究者番号：00211029

松浦正明 (Matsuura, Masaaki)  
帝京大学・公衆衛生学研究科・教授  
研究者番号：40173794