

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861593

研究課題名(和文) 頭頸部扁平上皮癌多段階発生におけるNiban遺伝子の機能解析

研究課題名(英文) Analysis of Niban function in multistep head and neck squamous cell carcinogenesis

研究代表者

伊藤 伸 (ITO, SHIN)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：80365577

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：Nibanの機能はまだまだ未知な部分が多い。我々は、マウス頭頸部癌モデルを作成し発癌各段階で腫瘍のサンプルを採取しパラフィン包埋した組織切片をヒトと同様に作成し、Nibanの免疫組織染色を施行した。結果、マウス切片でも、ヒトと同様にNibanの発現を認めた。次にNibanが分子標的薬セツキシマブの標的となりうるのかEGFRとNibanの免疫組織染色を比較検討した。口腔癌症例でEGFRとNibanの免疫組織染色を施行したところ細胞内局在の相違により癌細胞における役割は異なりNibanがセツキシマブの効果判定因子になる可能性が低いことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The cellular function of Niban are largely unknown. The purpose of this study is to clarify Niban functions.

First, we evaluated the immunohistochemistry of Niban using paraffin-embedded tissue sections from oral cancer model mice. As a result, Niban increased in all cases like human oral cancer cases. Next, we evaluated the cetuximab sensitivity of human oral cancer to compare Niban expression with EGFR expression using immunohistochemistry method. As a result, Niban expression was mainly seen in cancer cytoplasm, the other side EGFR expression was seen in cancer cell membrane. This results suggest that Niban effect is different from EGFR effect in oral cancer cell and that Niban probably impossible to detect cetuximab sensitivity in oral cancer.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：頭頸部癌 Niban EGFR

1. 研究開始当初の背景

頭頸部癌は、過度の喫煙や飲酒による慢性的な炎症と、近年では HPV をはじめとするウイルスの関与が、その原因となることは広く知られている。医療技術の進歩にもかかわらず、ここ 20 年間は、長期予後の著明な改善を認めていない。その要因としては、早期診断、再発の発見につながる腫瘍マーカーが存在しないのも要因の一つである。我々の研究グループでは Tsc 2 mutant である Eker ラット腎癌の多段階発癌モデルから新規な腫瘍マーカーとして Niban 遺伝子を発見している。(Majima S, et al. Jpn J Cancer Res, 91: 869-874, 2000; Hino O. Genes Chromosomes Cancer, 38: 357-67, 2003; Adachi H, et al. Oncogene 23: 3495-3500, 2004)

Niban はヒトでは、正常腎には発現していないが、ヒト散発性腎癌に発現がみられている。同遺伝子の機能は未知ではあるが、ストレスタンパクの一種と推定されている。そこで、申請者らはヒト Niban の N 末ペプチドに対する、ウサギ抗ヒト Niban 抗体を作成し、免疫組織染色で各種腫瘍組織での発現を予備研究的にスクリーンしている。すでに、我々の研究グループは、甲状腺乳頭癌では、発癌の早期から Niban の発現が確認されており、癌化のプロセスに重要な役割を果たしていると報告してきた。(Matsumoto F, et al. A novel tumol marker Niban is expressed in subsets of thyroid tumors and Hashimoto's thyroiditis, Hum.Pathol. 2006; 37: 1592-600) さらに申請者らは、上・中・下咽頭、喉頭、鼻・副鼻腔、口腔などの頭頸部癌においても Niban 遺伝子が高レベルに発現していることを発見した。(Ito S, et al. Frequent expression of niban in head and neck squamous cell carcinoma and squamous dysplasia, Head Neck 32: 96-103, 2010)

咽頭、喉頭粘膜をはじめとして、頭頸部領域の上皮でも、Niban は、正常組織には発現しないが、dysplasia から扁平上皮癌までの郭段階で発現を認め、癌化のプロセスに重要な役割を果たしていることが予想され、本研究を企画するに至った。

背景に記した如く Niban は細胞のストレスに関係すると想定されているタンパクをコードする遺伝子と予想されているが、その機能に関して詳細は不明である。

そこで今回、頭頸部扁平上皮癌 (HNSCC) の発生過程における Niban 遺伝子の発現、細胞内局在、タンパク機能解析を検索することを計画する。

現在までの経過として免疫組織化学染色、RT-PCR 法では mRNA レベルでの Niban の発現をすでに確認はしている。今後は症例を積み重ねるとともに、DNA 変異、転写パターン解析、メチル化解析、予後検索などの臨床的検索を組み合わせて総合的に検討する。

前癌病変から腫瘍発生過程における Niban 発現の意味を明らかにし、新しい腫瘍マーカーや分子標的薬などの新規薬剤創案としての可能性を検討したい。

現在、当大学は地域がん拠点病院に指定され、頭頸部癌の新患も年間 100 例を超えており豊富な治療経験と症例を維持している。また、Niban 遺伝子は、共同研究者である樋野らが、ラット腎発癌モデルから発見した遺伝子であり世界的にも同遺伝子の解析は、殆ど行われておらず、申請者らの研究グループがリードしている分野である。また、抗 Niban 抗体は当大学病理・腫瘍学講座グループが開発した抗体であり、世界的にも他では入手不可能である。

申請者らはすでに頭頸部扁平上皮癌における Niban 遺伝子の発現を確認しており (Ito S, et al. Head Neck 32: 96-103, 2010) 今後の本研究における特徴としては、細胞における酸化ストレスに起因する前癌病変と Niban 遺伝子発現との関係に主眼をおいて解析すること、さらに核酸レベルでの解析に加えて詳細な形態学的レベルでの細胞異常、発現パターンの検索を組み合わせることで見ていくことである。それにより前癌病変から発癌に至る過程での臓器組織における Niban 遺伝子発現の意味が明らかになると考える。

甲状腺癌をはじめ、食道癌、前立腺癌においても Niban の発現における研究は進められており、本研究により Niban 遺伝子の機能解析が進み HNSCC の癌化早期から関与する新規腫瘍関連マーカーとして Niban が位置づけられることが予想できる。また、頭頸部癌領域でも分子標的薬が導入されており、EGFR が標的分子とされるセツキシマブが実臨床でも使用頻度を上げている。Niban に関しても発癌の多段階発生に関与していることが明白であり、標的分子となりうるかの検討も試みる。

2. 研究の目的

Niban 遺伝子はストレスタンパクの一種をコードする遺伝子であると推定され、癌化、特に癌化の早期に重要な役割をはたしていることが我々の研究グループにより示されている。(Adachi H, et al. Oncogene 23: 3495-3500, 2004)

一方、本邦において頭頸部癌は、年間約 2 万人が罹患しており、新規に分子標的治療や強力な放射線化学療法、再建手術が開発されているにもかかわらず、ここ 20 年間で著明な予後の改善は認められていない。研究代表者らは多種の頭頸部癌においても Niban 遺伝子が高レベルに発現していることを発見し報告した。(Ito S, et al. Head Neck 32: 96-103, 2010) 本研究では Niban 遺伝子の癌化における役割を解明することを継続目的としている。マウスの口腔癌モデルを作成し、それぞれの発癌過程における原発巣、転移巣での Niban の発現を確認する。頭頸部癌領域

でも分子標的治療薬が続々と臨床へ導入されている。EGFR が標的分子とされるセツキシマブが実臨床でも使用頻度を上げている。Niban に関して多段階発生に関与していることが明白であり、標的分子となりうるかの検討も試みる。

3. 研究の方法

A) 免疫組織化学染色

これまでと継続して、新規頭頸部癌症例に対してヒト Niban の N 末ペプチドに対する、ウサギ抗ヒト Niban 抗体を作成し、免疫組織化学染色を施行して Niban 遺伝子の発現を確認していく。顕微鏡下に発現程度を評価して 3 段階に振り分ける。

B) 臨床学的検討

免疫組織化学染色等を施行した症例に関し、再発、転移、予後等の臨床情報と Niban の発現状況を照らし合わせ評価する。また、分化度と遺伝子発現レベルなどのデータベース化を行う。

C) Laser capture microdissecti : 及び

Semiquantitative duplex RT-PCR :

摘出標本の病変部および非病変部からマイクロディセクションを行い、核酸を抽出し、mRNA より cDNA を得る。これを鋳型とし Niban 遺伝子の発現解析を行う。

D) 電子顕微鏡、免疫電子顕微鏡解析 :

電顕用にグルタルアルデヒドにて組織固定、LR white にて包埋を行い、正常と癌症例につき、組織内の Niban タンパクの局在およびその変化を観察する。

E) Niban 遺伝子プロモーター領域のメチル化解析 :

現在のところメチル化は確認されず、癌抑制遺伝子の範疇に入る可能性は低いと考えられるが、さらに凍結標本などを使用してメチル化の追試を行う。

F) Niban タンパクの機能解析の工夫

ヒト頭頸部癌症例からの検体のみではなく、多くの検体を得るため頭頸部癌の実験モデルを作成し効率よく実験を進める。当科にて継代培養を行っているヒト口腔癌扁平上皮癌細胞株である KB 細胞を細胞密度が 8.0×10^6 細胞/ml に調整しヌードマウスの BALB/c-nu/nu の舌縁に 26G 針で移植し口腔癌モデルを作成する。前癌病変から進行癌までのモデルを作成し、免疫染色にて Niban の発現がヒトと同様なのかを確認し、制御タンパク質のリン酸化を測定することによりタンパク機能解析を行う。

G) 口腔癌における EGFR と Niban 発現の比較検討

頭頸部扁平上皮癌では 50% ~ 90% で EGFR が

過剰発現しており、EGFR の過剰発現が予後不良因子であることも知られていた。そこで治療標的として注目され、EGFR を標的とするキメラ抗体薬であるセツキシマブが日本でも保険適応となった。Niban がセツキシマブの標的となりうるのか EGFR と Niban の免疫組織染色を比較検討する。EGFR の免疫組織染色は EGFR pharmDx 「DAKO」を使用して施行し大腸がんの結果判定に従って評価した。

4. 研究成果

2011、2012 年度において、当科では約 60 件程度の新規頭頸部扁平上皮癌症例の手術摘出病理検体を回収した。

臨床統計学的検討を行った結果、TNM 分類(癌の進行度)と Niban の発現度、放射線治療や化学療法などの治療後の症例における Niban の発現度、Niban の免疫組織学的検討における発現強度と予後の相関関係、それらすべてにおいて統計学的有意差は認められない結果であった。

頭頸部癌患者は日本のがん罹患全体でも比較的稀であり、一般的にはなじみの低い疾患である。それらを考慮して、ヒト頭頸部癌症例からの検体は当施設でも限られた検体量となっておりヒト頭頸部扁平上皮癌検体のみではなく、効率よく研究を進めるために、マウス頭頸部癌の実験モデルを作成した。継代培養を行っているヒト口腔癌扁平上皮癌細胞株である KB 細胞を細胞密度が 8.0×10^6 細胞/ml に調整しヌードマウスの BALB/c-nu/nu の舌縁に 26G 針で移植し、観察を続け、各段階の口腔癌モデルを作成し腫瘍のサンプルを採取し冷凍およびパラフィン包埋保存した。マウス検体においてパラフィン包埋した組織切片をヒトと同様に作成し、すべて同様の手法で、Niban の免疫組織染色を施行した。マウスの切片に関して、人と同様に Niban の染色を認めた。原発巣に加え、リンパ節転移巣に関して同様の結果であった。結果として頭頸部癌マウス検体でもヒトと同様に Niban の発現が認められることが証明された。

以前の検証からも、Niban 遺伝子のメチル化解析では、現在のところメチル化は確認されず、癌抑制遺伝子の範疇に入る可能性は低い。最近それらの解析を、米国を代表する癌専門施設である MD アンダーソンがんセンターでも研究されており、世界規模で Niban は注目されている。前施設の Haitao Ji らは、人の肺癌細胞と脳腫瘍である glioblastoma 細胞に紫外線で外的ストレスを与え Niban の機能解析を行った。その内容として、紫外線照射によって AKT が活性化され Niban のリン酸化が引き起こされる。リン酸化された Niban は nucleophosmin (NPM) と結合し NPM と murine double minute 2 (MDM2) の結合を妨げる。その結果フリーな MDM2 が増加し、がん抑制遺伝子である p53 と結合することによって p53 を分解する。p53 が分解され、その機能

が抑制されることにより、細胞のアポトーシスが阻害され、がん細胞が無秩序に増加するというメカニズムが解明されてきている。(AKT-dependent phosphorylation of Niban regulates nucleophosmin-and MDM2-mediated p53 stability and cell apoptosis:Haitao Ji et al.EMBO reports VOL13.N06 2012)

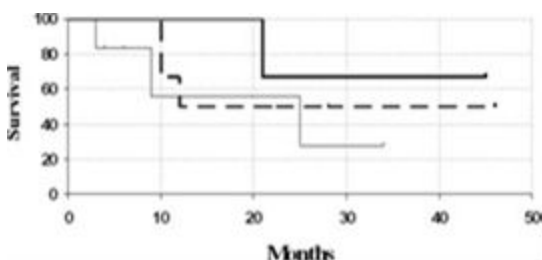
頭頸部扁平上皮癌では50%~90%でEGFRが過剰発現しており、EGFRの過剰発現が予後不良因子であることも知られていた。そこで治療標的として注目され、EGFRを標的とするキメラ抗体薬であるセツキシマブが日本でも保険適応となった。Nibanがセツキシマブの標的となりうるのかEGFRとNibanの免疫組織染色を比較検討した。

口腔癌8症例でEGFRとNibanの免疫染色を施行した。EGFRは8症例すべてで陽性であり、細胞膜に陽性シグナルが認められた。Nibanもすべての症例で染色を認めたが強陽性は1例のみで、中等度陽性が6例、軽度陽性が1例であったが、すべての症例で細胞質への染色であった。EGFRとNibanの局在の相違により両遺伝子の癌細胞における働きは異なりNibanがセツキシマブの効果判定因子になる可能性が低いことが示唆された。

Nibanの発現と予後に関連する統計学的検討の一つを以下に示す。

Kaplan-Meier生存曲線:

ヒト頭頸部扁平上皮癌におけるNibanの免疫組織学的染色での発現強度(低度、中程度、高度)と予後の相関について検討した。図中細い実線:腫瘍のNiban発現が低度、太い点線:腫瘍のNiban発現が中程度、太い実線:腫瘍のNiban発現が高度。統計学的検討を行うとNibanの発現強度と予後には有意な相関関係が無かった。



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)

1、A feasibility study of NIR fluorescent image-guided surgery in head and neck cancer based on the assessment of optimum surgical time as revealed through dynamic imaging.

Yokoyama J, Fujimaki M, Ohba S, Anzai T, Yoshii R, Ito S, Kojima M, Ikeda K. Onco Targets Ther. 2013 Apr 8;6:325-30.

2、Radiotherapy with fraction size of 2.25 Gy in T1-2 laryngeal and hypopharyngeal cancer.

Karasawa K, Kunogi H, Hirai T, Hoji H, Hirowatari H, Izawa H, Ito K, Sasai K, Furuya T, Ozawa S, Matsumoto F, Ito S, Oba S.

J Radiat Res. 2013 Jul 1;54(4):684-9.

[学会発表](計1件)

頭頸部扁平上皮癌,異形上皮における Niban 遺伝子の高発現

伊藤 伸,池田 勝久

第33回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会

2014年2月28日

東部ホテルレバント東京(東京都墨田区)

6. 研究組織

(1)研究代表者

伊藤 伸 (ITO SHIN)

順天堂大学 医学部・准教授

研究者番号: 80365577