

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26463039

研究課題名(和文) 口腔扁平上皮癌におけるFAK発現を中心としたシグナル伝達が浸潤・転移に及ぼす影響

研究課題名(英文) Influence of signal transduction on FAK expression on invasion of oral squamous cell carcinoma

研究代表者

吉澤 邦夫 (YOSHIZAWA, Kunio)

山梨大学・大学院総合研究部・講師

研究者番号：60452108

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：様々ながん関連タンパク質と浸潤様式との関連については不明な点が多い。その関連性を解明するために、FAKを中心としたターゲット分子のタンパク質を浸潤様式別に調べた。6つの細胞株を利用して、uPA, uPAR, Maspin, FAKの発現をWestern blotting法を用いて調べた。その結果、浸潤様式が高い細胞株においてはuPA, uPARが高かったが、浸潤様式が低い細胞株では反対にその発現量が低下し、Maspinの発現が高くなった。また、FAKの発現を調べると、病理組織切片の免疫染色結果において浸潤様式が高い細胞株で発現が亢進していた。uPA, uPAR, FAKが予後不良因子と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Mode of Invasion is a factor affecting the prognosis of oral squamous cell carcinoma (OSCC). Although various canceration related protein is concerned with cancer malignant alteration, the relation with mode of invasion is less well understood yet. To investigate the revelation between mode of invasion and canceration-related-protein, various target protein in connection with canceration was searched. Six cell lines with various invasive properties were investigated to compare the targeted protein levels (Maspin uPA, uPAR, FAK) using Western blotting method. First, expression of Maspin was lower, while uPA and uPAR was higher in high invasive cell lines compared with other low invasive cell lines. Second, positive cases of FAK showed higher local recurrence rate than negative case by immunohistochemical staining. It is necessary to clarify the furthermore underlying mechanisms between various canceration related protein and mode of invasive of OSCC.

研究分野：口腔腫瘍

キーワード：FAK 浸潤様式 口腔扁平上皮がん

1. 研究開始当初の背景

難治性口腔扁平上皮癌は、高度ながん浸潤・転移を来し、外科療法・放射線療法・化学療法を主体とした集学的治療を行ったとしても救命できない場合が多い。この難治性因子は様々な遺伝子の発現変化により引き起こされると報告されており、がんの悪性化においても浸潤、転移および薬剤耐性は個々に進行する面もあるが、一連の現象として遂行されている。その点からも色々な観点からがん細胞生成・進展のメカニズムを解明し、治療応用できるようにする必要がある。

これまで研究代表者らは、浸潤度が高くなるにつれて、抗がん剤 Cisplatin(CDDP)の細胞内輸送が膜輸送タンパク ATP7B が、CDDP を排出する方向に移行していること (Yoshizawa et al. Oncology Reports 18;987-91, 2007)、浸潤性が高いと、uPA, uPAR の細胞外マトリックス分解酵素が強く発現し、一方でその抑制化に働く Maspin が減弱していることを報告してきた (Yoshizawa et al. J Oral Pathol Med 39;535-9, 2009, Oncology Reports 26; 555-60, 2011)。その中でも、共通して、がん細胞が悪性化の最も強い要素である浸潤・転移能を強く持つ過程において、上皮間葉移行との関連が認められており、その上皮間葉移行のがん細胞性質が山本・小浜分類の Grade4D に相当し、細胞接着因子が減弱することが分かった (Taki et al., Cancer Sci 94; 593-7, 2003)。さらに裏付けをするように Tight Junction である Claudin-7 は Grade4D において明らかに減弱しており、高浸潤がんほど、接着因子が弱くなることを報告した。 (Yoshizawa et al., Oncol Rep 29;445-50, 2013)。

これらのことより、がん細胞の高度浸潤能・悪性化は、上皮間葉移行と密接に関与しており、とくに細胞間接着因子との関連性が強いことが判明してきている。がんの悪性化や抗がん剤耐性機構は様々な要素が複雑に相互作用して形成されていくものであり、臨床応用するためには統合的にがん化メカニズムを把握する必要があるため、細胞間接着因子の主要なシグナル伝達を担う FAK について、今までの研究のアプローチを発展させながら、浸潤や抗がん剤耐性化への関連性を解明していく所存である。

2. 研究の目的

本研究は口腔扁平上皮癌の悪性化の指標として有効で、国内で普遍的に広く用いられているがん浸潤様式山本・小浜分類を用いて、臨床医療にフィードバックしやすいように、病理組織切片および口腔癌由来細胞株の浸潤の程度を区別化し、FAK の細胞浸潤・転移および抗がん剤感受性に関わるメカニズムを解明することである。

FAK (Focal adhesion kinase) は、細胞質ドメインと会合している非受容体型のチロ

シンキナーゼで主要なシグナル分子の一つであり、接着斑の形成および細胞骨格の再構築を行い、運動能を持ち、とくにがん細胞に強く発現していることが分かっている。がん細胞の浸潤、転移する能力に FAK が重要かつ密接に関わっていることは明らかであるが、口腔扁平上皮癌において FAK 機能発現がどのように浸潤・転移に関与しているかは未だ不明な点が多い。そこで今回は、口腔扁平上皮癌においてがん化の様態をよく示すがん浸潤様式山本・小浜分類を用いて FAK 機能発現がどのようにがん細胞浸潤・転移に関わるかを調べ、そのメカニズムを解明することでがん浸潤・転移の抑制化を検討する。

3. 研究の方法

(1) 免疫組織化学的染色法：FAK を中心としたターゲット分子の発現と臨床病理組織学的因子との関連性の検討

FAK を中心として様々ながん関連タンパク質と浸潤様式との関連については不明な点が多いため、臨床病理組織学的因子と、各々のその発現について検討した。使用した病理組織切片は、口腔扁平上皮癌一次症例 70 例とした。FAK, FAKpy397 (FAK のリン酸化体), uPA, uPAR, Maspin の抗体を用いて、それぞれ免疫染色を行った。

(2) Western blotting 法：口腔扁平上皮癌由来細胞株における FAK を中心としたターゲット分子の発現と浸潤様式との関連性の検討

6 つの細胞株 (3 型由来: HSC-4, OSC-20, 4C 型由来: OSC-19, OTC-04, 4D 型由来 HOC313, TSU) を利用して、uPA, uPAR, Maspin, Integrin, FAK, FAKpy397 の発現を Western blotting 法を用いて調べた。

(3) PCR 法：口腔扁平上皮癌由来細胞株における FAK を中心としたターゲット分子の発現と浸潤様式との関連性の検討

6 つの細胞株を利用して、uPA, uPAR, Maspin, Integrin, FAK の発現を Western blotting 法を用いて調べた。

(4) 結果のまとめ

Western blotting 法、PCR 法の結果からは、ともに浸潤様式 4D 型由来細胞株では Maspin の発現低下を認めたが、一方で uPA, uPAR では高浸潤由来細胞株で発現が強くなった。また、FAKmRNA 発現は正常線維が細胞株に比べ癌細胞において発現強度が高く、FAK 高発現群は、低発現群に比べて予後不良であった。

上記から uPA, uPAR, FAK 発現亢進時は、浸潤能が高く予後不良であることが考えられ、予後予測因子として利用できる可能性が示唆された。

4. 研究成果

(1) 免疫組織化学染色

臨床病理組織学的因子とターゲット分子

との発現を比較検討したところ、uPA, uPAR, FAK, FAKpy397 にも発現しており、浸潤様式が高くなるにつれて、発現が強く認められ、生命予後不良因子であった。一方で Maspin においては逆相関の係にあり、浸潤様式の高い群では発現が弱く、高発現群では低発現群に比べて予後良好であった。

(2)Western blotting 法

uPA, uPAR においては、3 型よりも 4C 型、4D 型で発現量が高くなり、Maspin では逆相関を認めた。

(3)PCR 法

正常線維芽細胞の FAK 発現量に比べて、OSC-19, TSU はともにその発現量は 3-4 倍ほど高く認められたが、浸潤様式別に発現量の差は認めなかった。uPA, uPAR においては、Western blotting 法の結果と類似し、3 型よりも 4C 型、4D 型で発現量が高くなり、Maspin では逆相関を認めた。

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 5 件)

吉澤邦夫、堀田麻実、角田達哉、上木耕一郎
浸潤様式 4D 型におけるがん悪性化に関わる各タンパク発現についての検討
日本口腔組織培養学会 26 巻 1 号 19-20 頁
2016 年 査読無

Kimura I, Kitahara H, Ooi K, Kato K, Noguchi N, Yoshizawa K, Nakamura H, Kawashiri S.

Loss of epidermal growth factor receptor expression in oral squamous cell carcinoma is associated with invasiveness and epithelial-mesenchymal transition.

Oncology Letters 11(1):201-207, 2016 査読有

井上瑛広、安藤英俊、吉澤邦夫、上木耕一郎、加藤広祿、野口夏代、川尻秀一

口腔扁平上皮がん病理組織標本のデジタル画像による機械学習に基づくがん浸潤様式の自動判別法

Medical Imaging Technology 34(5) 279-286, 2015 査読有

加藤阿希、吉澤邦夫、吉本泰祐、北原寛子、加藤広祿、野口夏代、中村博幸、川尻秀一

口腔扁平上皮癌における Focal adhesion kinase (FAK)発現の臨床病理学的意義

日本口腔組織培養学会誌 24 (1): 27-28, 2014 年 査読無

Yanase M, Kato K, Yoshizawa K, Noguchi N, Kitahara H, Nakamura H.

Prognostic value of vascular endothelial growth factors A and C in oral squamous cell carcinoma. J Oral Pathol Med. 43(7):514-20, 2014. 査読有

〔学会発表〕(計 6 件)

吉澤邦夫、角田達哉、長田麻実、諸井明德、野口夏代、加藤広祿、川尻秀一、上木耕一郎
口腔扁平上皮癌病理組織切片のデジタル画像を用いた機械学習に基づくがん浸潤様式 (YK 分類) の自動判別法

第 36 回日本口腔腫瘍学会

2018 年 1 月 25 日-26 日新潟グランドホテル

吉澤邦夫、堀田麻実、角田達哉、上木耕一郎
浸潤様式 4D 型におけるがん悪性化に関わる各遺伝子発現についての検討

第 53 回日本口腔組織培養学会

2016 年 11 月 18 日 石川県立美術館

吉澤邦夫、能崎晋一、川尻秀一、上木耕一郎
口腔扁平上皮がん由来細胞株における EMT とセリンプロテアーゼ因子の発現

第 34 回日本口腔腫瘍学会

2016 年 1 月 21 日-22 日横浜記念港会館

Kunio Yoshizawa, et al

Association between the expression of various cancer-related proteins, including FAK, and mode of invasion in oral squamous cell carcinoma

The 20th World Congress on Advances in Oncology, and 18th International Symposium on Molecular Medicine.

8-10 Oct, 2015, Metropolitan Hotel, Athens, Greece 招待講演

井上瑛広、安藤英俊、吉澤邦夫、上木耕一郎、加藤広祿、野口夏代、川尻秀一

口腔扁平上皮癌病理組織標本のデジタル画像による機械学習に基づくがん浸潤様式 (YK 分類) の自動判別法

第 34 回日本医用画像工学会

2015 年 7 月 30 日-8 月 1 日 金沢歌劇座

加藤阿希、吉澤邦夫、吉本泰祐、北原弘子、加藤広祿、野口夏代、中村博幸、川尻秀一

口腔扁平上皮癌における Focal adhesion kinase (FAK) の発現の臨床病理学的意義

第 51 回日本口腔組織培養学会

2014 年 11 月 15 日 九州歯科大学

6 . 研究組織

(1)研究代表者

吉澤 邦夫 (YOSHIZAWA, Kunio)
山梨大学・大学院総合研究部・講師
研究者番号 : 60452108

(2)研究分担者

川尻 秀一 (KAWASHIRI, Shuichi)
金沢大学・医学系・教授
研究者番号 : 30291371

加藤 広禄 (KATO, Koroku)
金沢大学・附属病院・講師
研究者番号 : 30444201

(3)連携協力者 なし

(3)研究協力者 なし