

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861711

研究課題名(和文)ASCが癌治療を変える～ASCの発現、分化のメカニズム～

研究課題名(英文)ASC change the chemotherapy -the regulation of ASC expression-

研究代表者

伊藤 隆一 (ITO, Ryuichi)

信州大学・医学部附属病院・特任研究員

研究者番号：70646661

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：アポトーシスと炎症シグナル制御蛋白質(以下ASC)はp53の下流にあり、Baxとの結合を介してアポトーシスに関与することが報告された。また、免疫細胞に発現して抗腫瘍的に働いて、抗癌剤の感受性にも関連していることが報告された。当科の研究により口腔扁平上皮がん患者の組織(n=119)を用いた研究ではASC発現は、口腔扁平上皮癌の組織学的分化度と関連があることが示された。また口腔扁平上皮癌患者の5年生存率とも相関があり、相対危険度が上昇することが多変量解析で示された。口腔粘膜ケラチノサイトの分化マーカーとアポトーシスとの間に相関があることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：To assess apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain (ASC) expression in oral squamous cell carcinoma (OSCC) and analyze its clinical and pathological significance. ASC expression was studied using immunohistochemistry in 119 OSCCs patients. The relationships between ASC expression and clinical and pathological parameters were statistically analyzed. In addition, the relationships between ASC expression and cell differentiation marker expression and apoptosis cells were investigated. ASC expression showed significant correlations with parameters including clinical tumor stage, mode of invasion, and histological differentiation, and had a significant impact on survival of OSCC. ASC expression was significantly correlated with the apoptosis cells.

Lower ASC expression correlates with clinical and pathological malignancy and, consequently, poor prognosis of OSCC. ASC has a close association with cell differentiation and apoptosis.

研究分野：口腔癌

キーワード：ASC 口腔癌 扁平上皮癌 apoptosis cell differentiation TUNEL

1. 研究開始当初の背景

インフラマソーム構成タンパクであるアポトーシスと炎症シグナル制御蛋白質 (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD、以下 ASC) は、インフラマソームにおいては受容体とカスパーゼ-1 の介助を助ける連結因子として炎症で重要な働きをすることが明らかになっている。

インフラマソームが形成される際に自身が凝集化して別のタンパク複合体を形成することが報告されている。ASC スペックは、インフラマソームと同様にカスパーゼ-1 を呼び寄せてカスパーゼ-1 活性化の場として働くことから、インフラマソームを介した炎症応答で重要な役割を果たしている。インフラマソーム形成を中心とした炎症での役割はこれまで明らかとなっている。

アポトーシスや悪性腫瘍での ASC については、これまで ASC は p53 の下流にあり、Bax との結合を介してアポトーシスに関与することが報告されている。また、免疫細胞に発現して抗腫瘍的に働いて、抗癌剤の感受性にも関連していることが報告されている。

また当科の研究により ASC 発現は、口腔扁平上皮癌の組織学的分化度と関連があることや、口腔粘膜ケラチノサイトの分化度との間に相関があるが、また口腔扁平上皮癌患者の 5 年生存率とも相関があり、相対危険度が上昇することが多変量解析で示されていて、今後、口腔扁平上皮癌患者の生命予後や治療成績を示す指標となることが期待されている。

また ASC は DNA のメチル化により発現が低下する腫瘍抑制遺伝子であり信州大学分子腫瘍学講座において悪性黒色腫細胞、大腸癌細胞では DNA メチル化により ASC 発現が低下することが報告されている。

2. 研究の目的

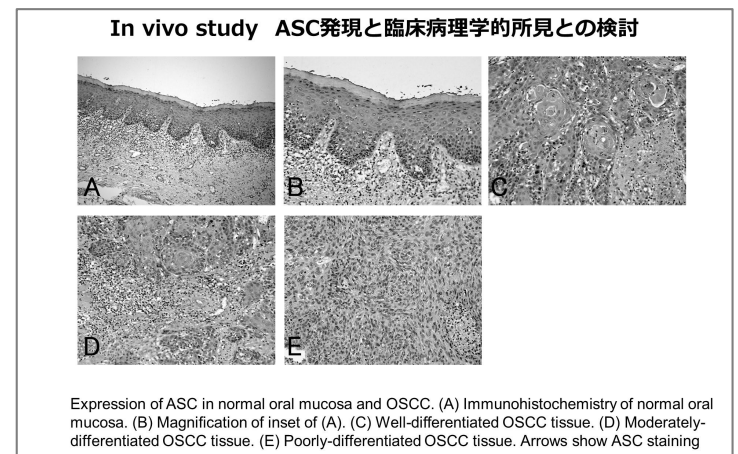
口腔扁平上皮癌は頭頸部領域において主要な悪性腫瘍であり、今後は効果的な抗癌剤や分子標的薬が望まれる。ASC はアダプター分子でありアポトーシスを誘導し、免疫細胞に発現して抗腫瘍的に働き、抗癌剤の感受性にも関連していることが報告されている。ASC の発現は口腔扁平上皮癌の組織学的分化度および口腔粘膜ケラチノサイトの分化度と関連があること、さらに ASC の発現は 5 年生存率と関連があり、相対危険度が上昇することが示されている。一方、他の癌腫において DNA メチル化により ASC 発現の低下が示されており、本研究では口腔扁平上皮癌の ASC 発現と DNA メチル化との関連性を検討し、口腔扁平上皮癌における ASC 分化制御のメカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

1. in vivo 対象は 1990~2005 年に信州大学医学部附属病院特殊歯科・口腔外科にて OSCC と診断された未治療例 119 例。抗 ASC

抗体により免疫組織化学的手法 (IHC) により病理組織切片上の ASC 陽性細胞数を算出し、同症例の臨床病理学的所見 (性別、年齢、T 分類、N 分類、病期、原発部位、病理学的分化度、リンパ細胞浸潤、浸潤様式) および予後 (5 年生存率) との関連を統計学的に解析 (単変量および多変量解析) した。また、ASC 発現と上皮細胞の分化との関連を明らかにするため、ASC および粘膜上皮細胞の分化マーカーである involucrin (IVL) 発現を IHC と蛍光抗体法により染色し、比較検討を行った。加えて、ASC とアポトーシスとの関連を検討するため、アポトーシス発現状況を TUNEL 染色で調べ、ASC 発現状況との比較検討を行った。高分化な口腔扁平上皮癌では発現が高いことが示唆され、TUNEL 解析でも高分化扁平上皮癌では高発現であることが認められた。(Fig1)

Fig1



**In vivo study ASC発現と臨床病理学的所見との検討**

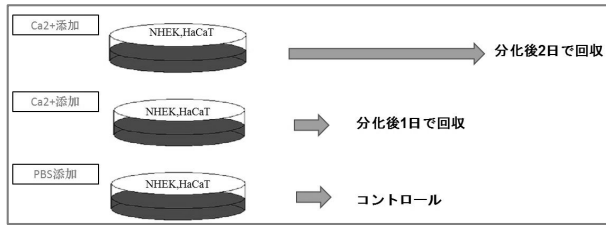
Cox proportional-hazards regression model predicting disease-specific survival

	P-value	hazard-ratio(95%CI)
ASC score(1/2/3)	.0135	
3		1.000
2	.0866	3.118(.849-11.454)
1	.0048	6.825(1.803-26.356)
Gender(M/F)	.6317	.881(.344-1.911)
Age	.1764	1.739(.780-3.877)
Clinical stage	.0261	1.593(1.057-2.2402)
Lymphocytic infiltration	.5188	.846(.846-1.406)
Primary site	.7394	
Buccal		1.000
Mouth floor	.5159	1.865(.283-12.341)
Tongue	.3931	1.956(.419-9.130)
Gum	.2837	2.465(.473-12.839)
Others	.8948	1.139(.165-7.846)

likelihood ratio test=0.0031  
C.I.:Confidence interval

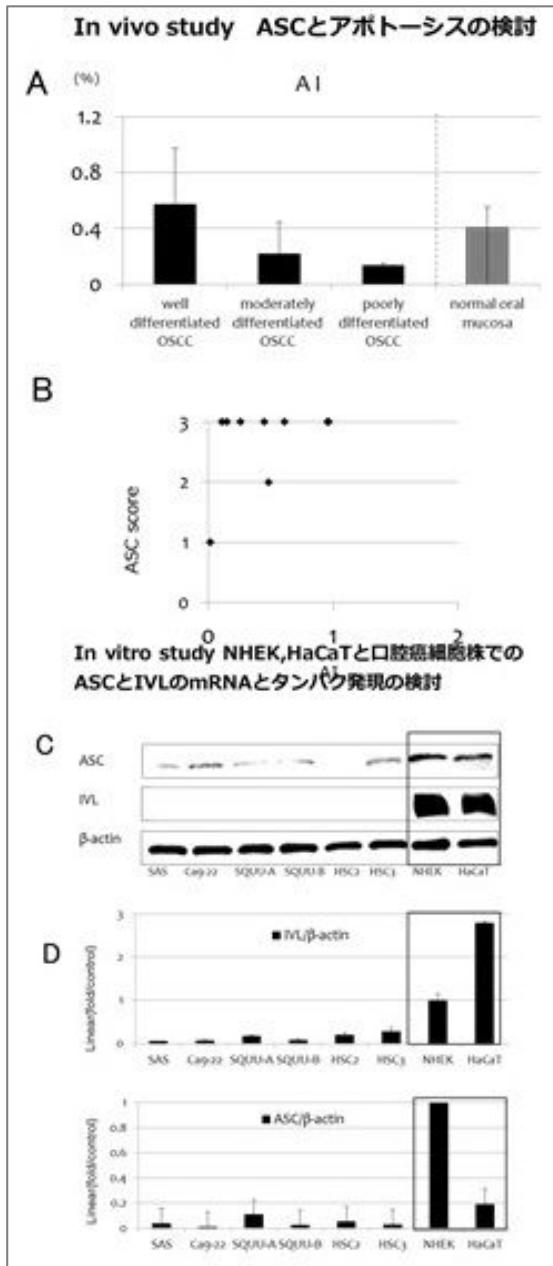
2. In vitro ASC と分化との関連を検討するために以下の実験を行った。正常細胞における分化前後での ASC の変化を検討するために正常ヒト角化細胞 (NHEK) と不死化ヒト角化細胞 (HaCaT) を用い分化誘導を行った。NHEK と HaCaT の分化前、分化後 1 日目と 2 日目の mRNA とタンパク質を採集し、ASC と IVL の mRNA 発現を定量的 PCR でタン

パク質発現とを western blot 法でそれぞれ検討した。また正常細胞と口腔癌細胞株での比較を行うため NHEK、HaCaT と口腔癌細胞株の ASC と IVL の mRNA 発現を定量的 PCR でタンパク質発現とを western blot 法と同様に検討した。



#### 4. 研究成果

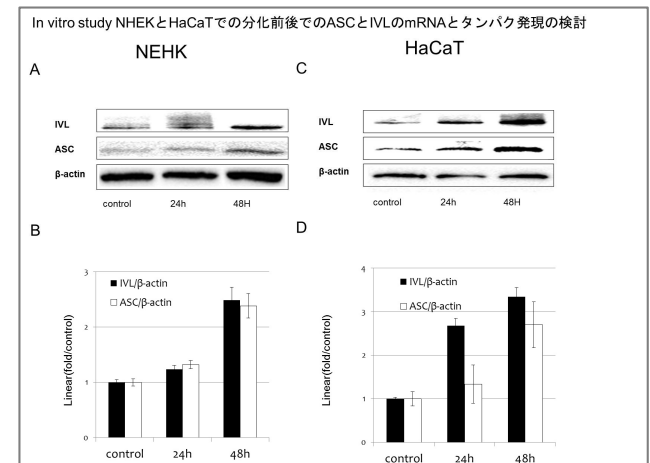
1. In vivo IHC により正常口腔粘膜では ASC は分化が進行した顆粒層から有棘細胞層に多く発現していた。OSCC では cancer pearl 周囲に多く発現しており、低分化 OSCC では発現はほとんど認められなかった。単変量解



析の結果では ASC は原発部位、T 分類、病期、病理学的分化度、浸潤様式とリンパ細胞浸潤と統計学的有意な相関が認められた。Kaplan-meier 法では ASC 発現レベルの違いは 5 年生存率で統計学的有意差が認められた。疾患特異的生存率を end-point とした多変量解析では ASC 発現は独立した予後因子であり ASC 高発現群は生存率が高いこと統計学的に認められた。IHC と蛍光抗体法により ASC と IVL の共在が観察された。TUNEL 法の結果からは ASC の発現が多い OSCC はアポトーシスが多いことが認められた。

2. In vitro NHEK と HaCaT を用いた分化誘導実験からは ASC と IVL は共に分化後では mRNA 量もタンパク量も増加することが認められた。NHEK、HaCaT と口腔癌細胞株を使用した定量的 PCR と western blot 法では NHEK、HaCaT で ASC と IVL が口腔癌細胞株に比較し発現が高かった。

本研究において正常口腔粘膜では分化進行に伴い ASC の発現が増加することが認められた。OSCC において ASC は cancer pearl 周辺に発現していた。正常な大腸と皮膚では表層で ASC 発現が認められたことが報告されている。皮膚の癌化の過程で ASC は癌抑制遺伝子として作用することが報告されており、大腸癌、前立腺癌と悪性黒色腫では DNA メチル化により発現低下し結果としてアポトーシスに対し抵抗する可能性が示唆されている。本研究では ASC 発現減少は病理学的悪性度と相



関し、予後不良とも相関していた。ASC 発現は細胞分化とアポトーシスと関連していることが示され、なんらかの役割を果たしている可能性が考えられた。ASC 発現は OSCC のアポトーシスを誘導する可能性が考えられ ASC は OSCC において予後や悪性度の指標として有用であることが示唆された。

#### 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 4 件)

1. Construction and characterization of

- human oral mucosa equivalent using hyper-dry amniotic membrane as a matrix. Qi F, Yoshida T, Koike T, Itoh R, Aizawa H, Shimane T, Li Y, Yamada S, Okabe M, Nikaido T, Kurita H. Arch. 2016 May;65:26-34.(査読あり)
2. Oral cancer intraoperative detection by topically spraying a  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase-activated fluorescent probe. Shimane T, Aizawa H, Koike T, Itoh R, Kamiya M, Urano Y, Kurita H. Oral Oncol. 2016 Mar;54:e16-8.(査読あり)
  3. Estimation of the width of free margin with a significant impact on local recurrence in surgical resection of oral squamous cell carcinoma. Yamada S, Kurita H, Shimane T, Kamata T, Itoh R, Uehara S, Tanaka H, Yamamoto T. Int J Oral Maxillofac Surg. 2016 Feb;45(2):147-52.(査読あり)
  4. Predictability of staged localized alveolar ridge augmentation using a micro titanium mesh. Uehara S, Kurita H, Shimane T, Sakai H, Itoh R, Kamata T, Teramoto Y, Yamada S. Oral Maxillofac Surg. 2015 Dec;19(4):411-6.(査読あり)

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

伊藤 隆一 ( ITOH , Ryuichi )

信州大学・医学部附属病院・特任研究員

研究者番号 : 70646661