

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：32710

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20570

研究課題名(和文) 口腔癌発生に関わる腫瘍免疫学的解明と早期診断法の確立

研究課題名(英文) Establishment of early diagnosis and immunological oral cancer

研究代表者

熊谷 賢一 (KUMAGAI, Kenichi)

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号：10518129

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：口腔扁平上皮癌の腫瘍周囲のTCR遺伝子ライブラリは原発巣とリンパ節転移巣で異なっていたことより、転移に伴う腫瘍抗原性の変化が示唆された。一方、含関連遺伝子である上皮増殖因子(EGFR)関連遺伝子の発現解析により、口腔扁平上皮癌原発組織におけるErbB1の有意な高発現を認めた。また、リンパ節転移陽性群での有意な低生存率が確認されたため、リンパ節転移陽性群で強発現を呈したErbB4は口腔癌の予後予測を直接反映する有用なバイオマーカーとなり得ることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The host immune responses reflected by the TCR repertoire, differed between primary tumors and metastatic lymph nodes. Overexpression of the epidermal growth factor receptor (EGFR) family is common in oral squamous cell carcinoma (OSCC). These results suggest that lymph node metastasis might be associated with changes in the nature of the primary tumor antigens. The expression level of ErbB1 messenger RNA (mRNA) was markedly increased in OSCC. By comparing the gene expression levels of EGFR family members in OSCC tissues that had lymph node metastasis with those in the absence of lymph node metastasis, we found that ErbB4 mRNA expression was increased significantly. Moreover, we confirmed protein expression of ErbB4 in the cytoplasm and membrane of tumor cells, which was stronger in cases with lymph node metastasis. ErbB4 is an independent marker for lymph node metastasis in OSCC.

研究分野：口腔外科

キーワード：口腔癌 前癌病変 T細胞受容体 EGFR 上皮増殖因子

### 1. 研究開始当初の背景

近年の口腔癌検診の普及に伴って早期発見の重要性が啓蒙されている。初期の口腔癌では5年生存率は約90%と高いが、進行性の口腔癌では病態制御困難で予後不良となることが多く、60%以上を大きく改善することが困難であるため、口腔癌の早期発見に関わる診断体系の確立が急務となっている。これまでの口腔前癌病変における生検時の病理組織学的検査では、主に上皮の異型性度が悪性度の診断基準となっているが、臨床学的には異型を伴わない場合においても癌化する症例も存在すること、さらには異型度の診断基準が主観的な要素があるため病理医によって変化することから絶対的な指標とは成りえないとされている。一方、初期の口腔がんでは、発生した腫瘍性上皮に対しての免疫応答がリンパ球浸潤によって行われているが、通常の病理組織学的検査では異型上皮以外に腫瘍上皮としての評価や、周囲に浸潤しているリンパ球の解析については実施されていないため、癌化過程を腫瘍免疫学的見地から解析することがなされていないのが現状である。口腔粘膜の免疫システムは主に粘膜免疫によって制御されており、細菌、ウイルス、真菌と多岐にわたる外来性の病原微生物の侵入および定着を自然免疫系の働きによって防御している。口腔粘膜疾患が癌化する過程ではその自然免疫系を破綻させてT細胞を主体とした獲得免疫機構が挙動しているが、疾患の排除には至らない場合に腫瘍上皮が発生するとされている。T細胞は生体内に発生した病変に対する生体防御機構の一つとしてT cell receptor(TCR)を介して抗原認識を行い、その病変に関与する抗原に応じたTCRの再構成を伴って免疫応答を行っている。

一方、口腔癌の中でも発癌・増殖に関与する癌遺伝子として知られている上皮増殖因子受容体(Epidermal growth factor receptor: EGFR/ErbB1)は、チロシンキナーゼ型受容体のひとつであり、構造上の類似性からEGFRファミリーとよばれるErbB1(EGFR)、ErbB2、ErbB3、ErbB4の4つの受容体が存在する。EGFRは癌細胞の発生・増殖・転移にも関与するとされており、口腔癌においても同抗体薬が臨床応用されるに至り、放射線療法や他の抗癌剤との併用効果等が報告されている。しかしながら、口腔癌組織におけるEGFRファミリーの発現様式や、その臨床データとの相関性については不明な点が多い。

### 2. 研究の目的

本研究では、口腔粘膜疾患の発癌過程における獲得免疫機構の挙動を解析することで、口腔癌の早期発見・予後予測に関する新規診断法の確立を目指すこととし、異型上皮内の腫瘍性上皮を上皮関連遺伝子発現解析から探索し、またそれに相応して発生するTリン

パ球による免疫応答を網羅的T細胞受容体(TCR)解析を用いて行うことで、初期癌発生に関わる癌遺伝子発現解析と腫瘍抗原特異的免疫応答の有無を検索することを研究目標とした。

### 3. 研究の方法

口腔前癌病変のうち癌化した数症例を抽出し、患者背景調査を行った。術前に対象患者の年齢・性別・既往歴・現病歴・現症(全身、局所)についての詳細な調査を行うと同時に患者に本研究の意義を説明し、研究に関する遺伝子発現解析ならびに早期癌の検出のための臨床情報取得についての同意を得た。同意の得られた患者から採取した検体組織の一部を用いて、TCR解析および癌遺伝子発現解析を開始した。具体的には免疫組織学的側面からの予備検討を開始し、口腔粘膜疾患・口腔癌生検あるいは切除時の切除材料を用いてリンパ球浸潤度やモノクローナル抗体(EGFR関連遺伝子)を用いて腫瘍性上皮の免疫組織学的検索を行った。

TCR解析については、RNA安定化試薬に保存した組織からRNAを抽出しTCRレパトア解析に用いた。具体的には、RNAからcDNAを合成した後、Adaptor付加cDNAを適当な形にし、AdaptorおよびTCR定常領域にそれぞれ相補的なオリゴDNAプライマーセットとして用いてnestedPCRを行い、全てのTCRをコードする遺伝子を同一条件下で特異的に増幅する。得られたPCR産物を全てのTCRVファミリーにそれぞれ相補的なオリゴDNAを固層化したマイクロプレートに播種してハイブリダイゼーションを行った後、酵素反応を用いて発色させ吸光度を測定する。得られた吸光度から各TCRVファミリーの相対存在率を算出(TCRレパトア解析)し、T細胞のレパトアを比較検討することでTCR遺伝子発現ライブラリの構築を図った。

また、口腔扁平上皮癌原発組織におけるEGFRファミリーの発現量を、定量的PCR法および免疫組織化学染色を用いて正常組織における発現量と比較した。また、各種臨床データとEGFRファミリーの発現量との相関性についても検討した。

### 4. 研究成果

腫瘍浸潤リンパ球はおもにCD8陽性細胞であり、腫瘍周囲には特定のTCR遺伝子を有するT細胞が存在しており、腫瘍抗原特異的免疫応答を担当していると考えられた。

EGFR関連遺伝子の発現解析により、口腔扁平上皮癌原発組織におけるErbB1の有意な高発現を認めた(図1・2)。臨床データとの相関性において、リンパ節転移陽性群ではErbB4の有意な高発現を認めた。ErbB4はEGFRファミリーとヘテロ二量体形成し癌の浸潤や増殖に関与すると報告されているが、EGFRファミリーとの共過剰発現の様式について

は明確にされていない。さらにリンパ節転移陽性群では ErbB2 と ErbB4 および ErbB3 と ErbB4 間において有意な相関を認め、免疫組織化学染色における EGFR ファミリーの蛋白発現を確認したところ、mRNA レベルでの発現と相関する結果を得た。また、リンパ節転移陽性群での有意な低生存率が確認されたため(図3) リンパ節転移陽性群で強発現を呈した ErbB4 は口腔癌の予後予測を直接反映する有用なバイオマーカーとなり得ることが示唆された。

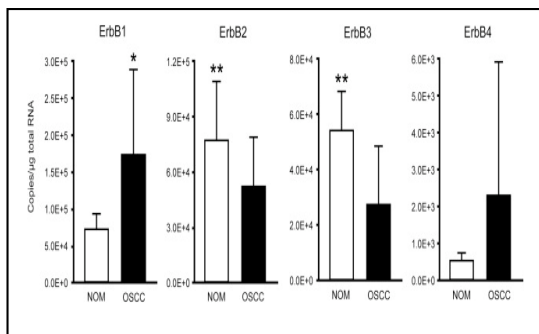


図1: OSCC における EGFR ファミリーの mRNA 発現量  
抗 ErbB1 抗体の臨床的有用性の証左の一つと考えられた。

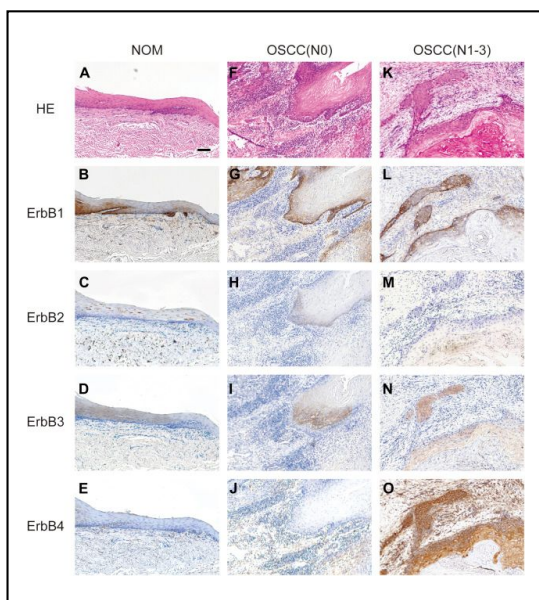


図2: 免疫組織化学染色による EGFR ファミリー蛋白の発現  
蛋白発現と mRNA 発現により相関する結果を得た。

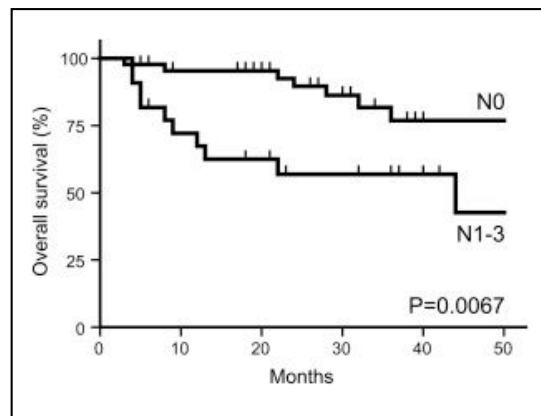


図3: 頸部リンパ節転移の有無による生存率への影響  
リンパ節転移を伴う症例群において予後不良因子となることが示された。

## 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1件)

Ohashi Y, Kumagai K, Miyata Y, Matsubara R, Kitaura K, Suzuki S, Hamada Y, Suzuki R. Overexpression of ErbB4 is an independent marker for lymph node metastasis in Japanese patients with oral squamous cell carcinoma. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. 査読有 2016, 122, 313-21  
doi: 10.1016/j.oooo.2016.04.017.

〔学会発表〕(計3件)

熊谷賢一, 川口浩司, 山田浩之, 斉藤智之, 大橋瑞己, 堀江彰久, 白石英馨, 岸晶子, 林伸和, 濱田良樹  
異型上皮を伴う扁平苔癬様病変から生じた下唇扁平上皮癌の1例  
第33回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会 2015年

秋谷勇介, 山田浩之, 中岡雅典, 山本那々美, 曾布川貴弘, 雨宮剛志, 熊谷賢一, 川口浩司, 濱田良樹  
初診から治療開始までに長期間を要した口腔がん症例の検討  
第33回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会 2015年

山本那々美, 川口浩司, 安川仁章, 藤原久子, 岡田奈穂子, 長谷部充彦, 馬杉亮彦, 熊谷賢一, 濱田良樹  
照射法による口腔粘膜上皮異形成の検出能について  
第33回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会 2015年

6 . 研究組織

(1)研究代表者

熊谷 賢一(KUMAGAI, Kenichi)

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号: 10518129