

令和元年6月16日現在

機関番号：33303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20444

研究課題名（和文）口腔癌の浸潤性増殖における細胞膜活性脂質の役割

研究課題名（英文）Role of cell membrane of proliferation and invasion in oral squamous cell carcinoma from sphingolipid

研究代表者

加藤 晃一郎 (KATO, Koichiro)

金沢医科大学・医学部・助教

研究者番号：30719373

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：口腔扁平上皮癌69例において免疫染色におけるスフィンゴシンキナーゼ1（SphK1）発現と浸潤および予後との関連性を検討した。腫瘍浸潤先進部において38例にSphK1高発現を認め、さらに高い浸潤能を示す浸潤様式と一致してSphK1の高発現がみられた。また予後に関しては、高発現群が有意に予後不良であった。これらの結果から口腔扁平上皮癌におけるSphK1高発現は浸潤および予後に関連することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SphK1の高発現が強い浸潤能を示す口腔扁平上皮癌と一致してみられた。SphK1は独立した予後決定因子ではなかったものの、臨床的に生命予後へ影響を及ぼすと考えられる転移の有無と関連性がみられた。SphK1高発現が口腔扁平上皮癌の腫瘍進展を評価するうえで重要な客観的因子となり、また生命予後を推測し得る可能性が考えられた。以上のことからSphK1高発現は、口腔扁平上皮癌患者の適切な治療選択の指標に役立ち、さらに治療抵抗性患者に対する今後の標的因子となり得る可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Expressions of sphingosine kinase-1 (SphK1) was examined in 69 OSCC tissues immunohistochemically, and correlations between their expressions and relationships with tumor invasiveness and prognosis were analyzed. SphK1 was expressed in the tumor cells of 38 of 69 OSCCs, particularly at the invasion front. Patients with OSCCs with high SphK1 expression showed higher invasive grades and unfavorable survival rates. These results demonstrate the involvement of SphK1 in the invasiveness of OSCC and in unfavorable prognosis.

研究分野：口腔がん

キーワード：口腔がん

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

口腔癌は、診断と治療法の進歩により5年生存率は近年飛躍的に向上した。しかし、治療抵抗性患者の予後は未だ不良であり、新たな治療法の開発が切望されている。近年、他臓器の癌では、抗癌剤の改良に加え分子標的薬も積極的に導入されてきているが、口腔原発扁平上皮癌に対する有効な分子標的薬の開発は停滞している。口腔癌の予後の決定因子である浸潤・転移の分子機構の解明とそれに基づいた新規治療法の開発は口腔外科領域の重要研究課題である。がん細胞の特徴は無限の増殖と浸潤・転移能であり、増殖性に対する制御に関しては、抗癌剤に加え、分子標的治療の開発が精力的に展開されている。一方、浸潤・転移能に関しては、関係する複数の分子経路が明らかにされてきたが、制御法の確立には未だ至っていない。その原因は、浸潤・転移は複数のステップからなる複雑な現象であり、癌腫の増殖抑制における driving mutation のようにピンポイントで制御可能な点がこれまで明らかでなかったためと考えられる。

### 2. 研究の目的

がん細胞の浸潤・転移に関係する多くの分子は細胞膜あるいはその近傍に存在する。それらが有効に機能するためには単なる発現亢進だけでなく、細胞膜上での再分配による多量体形成を介した活性化、同部位を中心とした複数の細胞内シグナル伝達の集約、その結果としての細胞局所での lamellipodia/filopodia 形成などの形態変化に必要な細胞骨格の再構成が生じて、はじめて細胞移動や浸潤能亢進に連なる。機能分子の細胞膜上での再分配という浸潤性発育に関わる複数の異なるパスウェイの統合に関わる細胞膜構成成分である sphingolipid, 特に sphingosin 系による ERM 活性化を介した細胞骨格再構成と sphingomyelin 系による脂質ラフト構造の細胞内シグナル集積のプラットフォーム機能に着目して、口腔原発扁平上皮癌の浸潤・転移におけるその役割の解明と新たな制御法の確立を目指すことが本研究の目的である。

### 3. 研究の方法

口腔扁平上皮癌 69 例の治療前生検組織を対象とし、10%ホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いて SphK1 の免疫組織化学染色を行った。評価方法は、腫瘍浸潤先進部における SphK1 発現陽性の腫瘍細胞の割合 (%) と感度をそれぞれ 0~3 点の 4 段階 (図 1) で評価し、乗じた数値 (0, 1, 2, 3, 4, 6, 9) をその腫瘍のスコア (SIS: Staining index score) とした (Liu et al., 2010)。SIS が 6 点以上を高発現群、4 点以下を低発現群に分類した。Epithelial mesenchymal transition (EMT) を検証するため E-cadherin と Vimentin も同様の評価方法で行った。Ki-67 は腫瘍細胞の標識率を算出した。腫瘍の浸潤様式は、Grade1、2、3、4C、4D の 5 段階で分類し、Fibroblastic reaction は腫瘍先進部で強弱を評価した。SphK1 の高発現群と低発現群における病理組織学的特徴をそれぞれ統計的に検討した。予後を含め臨床的特徴も同様に 2 群間で統計的に検討を行った。

### Staining intensity scores of immunostaining for sphingosine kinase-1

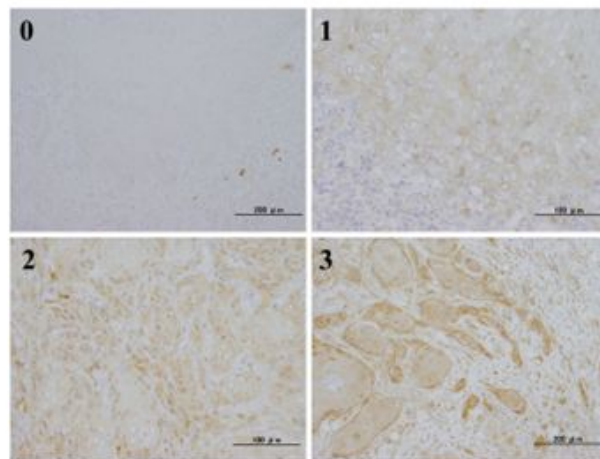


図 1

### 4. 研究成果

SphK1 の高発現群 (n=38) と低発現群 (n=31) における比較検討では、臨床的に年齢、性別、原発部位およびステージ分類に有意差は認めなかったが、リンパ節転移の有無に有意差が認められた ( $p=0.016$ )。また病理組織学的に浸潤様式 (grade1~4D) と強い相関を認め ( $p<0.001$ ) SphK1 発現と浸潤様式 (Grade1~4D) を系統的に検討すると、grade 2 などの低 grade では腫瘍浸潤先進部の腫瘍細胞に弱く発現するのに対し、

grade 4C などの高 grade では索状に浸潤する腫瘍細胞に一致して強い発現が認められた。SphK1 の高発現が特に grade3 ~ 4D のような浸潤能の強い腫瘍と一致しており、SphK1 発現が腫瘍浸潤と関連を有することが示唆された。腫瘍細胞の増殖に関し、SphK1 は相関がみられるとされるが、本研究では SphK1 と Ki-67 の標識率に関連性を見出すことができなかった ( $p=0.0599$ )。これは腫瘍巣を取り囲む腫瘍細胞や正常基底細胞などで算出に影響が生じた可能性も要因の一つと考えられた。生命予後は SphK1 の高発現群と低発現群を 5 年生存率 (Kaplan-Meier 解析) で検討した結果、SphK1 の高発現群は 45.1% で低発現群の 73.1% と比較して有意に予後が不良だった ( $p=0.0156$ , by log-rank test) (図 2)。その他にステージ分類、浸潤様式、Vimentin も単変量解析では影響因子 (それぞれ  $p=0.0077$ ,  $p=0.0245$ ,  $p=0.0261$ ) にあげられたが、多変量解析 (Cox 比例ハザード回帰) によるとステージ分類のみがハザード比 1.78 (95% 信頼区間 1.110 ~ 2.855,  $p=0.017$ ) で独立した予後決定因子であった。SphK1 は独立した予後決定因子ではなかったものの ( $p=0.102$ )、SphK1 の高発現群が浸潤様式やリンパ節転移とそれぞれ相関しており臨床病理学的にも重要な影響因子の一つであると考えられた。EMT に関しては、SphK1 の高発現群と低発現群における E-cadherin の喪失と Vimentin の発現誘導に有意差が認められ (それぞれ  $p=0.0073$ ,  $p=0.0092$ )、口腔扁平上皮癌の腫瘍浸潤先進部において、腫瘍細胞の EMT に関連する可能性が示唆された。また SphK1 の高発現群において腫瘍先進部で Fibroblastic reaction が強く認められ ( $p=0.043$ )、腫瘍関連の間質線維芽細胞の集積と SphK1 発現との関連を解明することも今後の検討課題と思われた。

### Survival curves of patients with oral squamous cell carcinoma with low and high expressions of sphingosine kinase-1

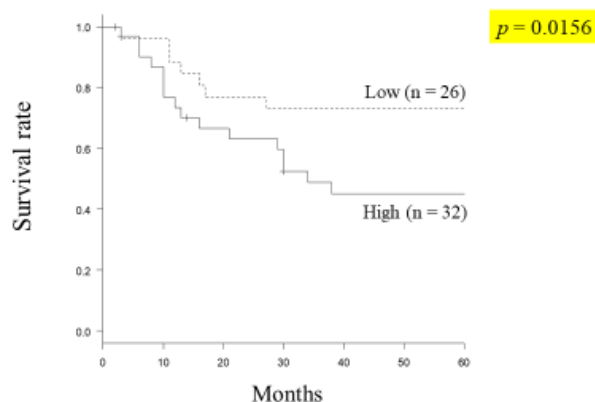


図 2

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Koichiro Kato, Miyako Shimasaki, Takao Kato, Natsuki Segami, Yoshimichi Ueda : Expression of Sphingosine Kinase-1 is Associated with Invasiveness and Poor Prognosis of Oral Squamous Cell Carcinoma : ANTICANCER RESEARCH 38, 1361-1368, 2018. 査読あり

〔学会発表〕(計 1 件)

第 63 回 (公社) 日本口腔外科学会総会・学術大会・千葉市・2018 年 11 月 2 日・口腔扁平上皮癌におけるスフィンゴシンキナーゼ-1 の腫瘍進展と予後への関与・加藤 晃一郎

〔その他〕

ホームページ等

<http://medicine-stoma.kanazawa-med.labos.ac/one/>

#### 6. 研究組織

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：上田 善道

ローマ字氏名：(UEDA, Yoshimichi)

研究協力者氏名：岡崎 俊朗

ローマ字氏名：(OKAZAKI, Toshiro)

研究協力者氏名：島崎 都

ローマ字氏名：(SHIMASAKI, Miyako)

研究協力者氏名：瀬上 夏樹

ローマ字氏名：(SEGAMI, Natsuki)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。