

平成 30 年 6 月 24 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20565

研究課題名(和文) 口腔がんの術中迅速可視化に関する研究

研究課題名(英文) study of intraoperative visualizing cancer cells detection

研究代表者

嶋根 哲 (Shimane, Tetsu)

信州大学・医学部附属病院・特任研究員

研究者番号：80714469

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)：蛍光プローブにより口腔癌組織と正常組織を区別するために研究を行った。正常組織と口腔扁平上皮癌組織ではいくつかのisotypeの発現に差がみられた。GGT4とGGTL1はKi67と共在し正常口腔粘膜組織では傍基底層に発現し、口腔扁平上皮癌では全体的に発現していた。口腔扁平上皮癌と正常組織のGGT4、GGTL1とGGT7で統計学的有意差を認めた。研究から細胞分裂が盛んな部位でGGT4とGGTL1発現が増強され、細胞活性が低い部位ではGGT7が発現していた。GGTファミリーはisotypeによって同じ組織内でも異なる部位で発現しており異なる役割をしている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：g-glutamyltranspeptidase (GGT) is a membrane-bound enzyme which plays a role in the metabolism of glutathione and facilitates amino-acid transport. They have become topical enzymes in cancer detection. New concept fluorescent probe revealed that GGT activity increased in ovarian cancer animal model. GGT enzymes have been founded that they formed family enzymes that including active isoforms and inactive isoforms. All samples presented GGT activity. Serial FFPE sections were cut and examined with hematoxylin, eosin and IHC staining for GGT1, GGT2, GGT4, GGT7, GGTLA1, and Ki67. GGT4 and GGTLA1 presented parabasal layer and OSCC tissue. The distributions of them were similar to Ki67. It is suggested that high cell proliferation induced elevated amino acid metabolism, resulting in an increasing GGT4 and GGTLA1. GGT7 might present in inactive tissue both normal oral mucosa and OSCC. GGT isoform might play different role each other.

研究分野：口腔癌

キーワード：口腔癌 扁平上皮癌 代謝 アミノ酸代謝 術中診断 分子標的薬

1. 研究開始当初の背景

-glutamyltranspeptidase (GGT)は細胞膜上に存在しアミノ酸代謝でグルタチオン合成に重要な酵素群である。これまでのわれわれの研究で、口腔がんにおいて GGT の活性が高まっていることが蛍光プローブ (gGlu-HMRG) を用いた臨床研究や metabolome analysis から示された。これらの GGT 活性の増強は口腔がん以外の多くのがんでも報告されており、GGT はがん進展等で重要な働きをしていると指摘されている。GGT は酵素群であり GGT family を形成している (図 1)。GGT の isotype は多数あり酵素活性がない isotype があることも知られている。がん組織で増強されている酵素活性を有する isotype を同定することはがん治療の標的となる可能性があり重要である。

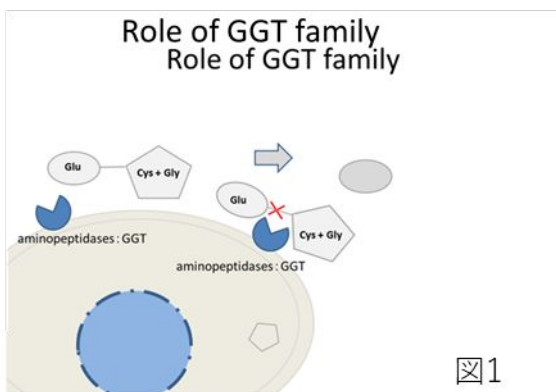


図1

Activation of g-Glu-HMRG

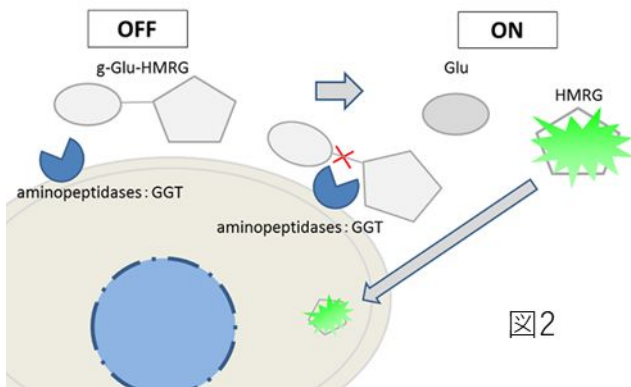


図2

2. 研究の目的

癌細胞は浸潤能を有しており周囲正常組織に浸潤し、正常組織との境界が不明瞭となっている。癌の範囲を正確に診断することは予後に重要な因子である。癌の範囲決定診断における生体染色の試みは古くからおこなわれており、有用性は認められるものの、深部浸潤癌範囲を診断することはできない。東京大学大学院医学系研究科で開発された蛍光プローブ -glutamyl hydroxymethyl rhodamine green (gGlu-HMRG) は、-glutamyltranspeptidase 活性が増大している癌細胞を特異的に発色させることができ、周囲正常組織との識別が可能であることが期待されている。本研究は口腔がんでの臨床応用を目的としてお

り、可能となれば癌治療における診断を飛躍的に改善することが期待される。そのため、臨床学的有用性を様々な研究により明らかにする (図 2)。

これまでの当科での研究では GGT 活性を中心とした深部口腔がんの診断では有意な結果を得ることができた。GGT の活性強度により手術断端の診断が可能となった (表 1)。

sex	age	site	grade	Y-K classification	stage	Relation of gGlu-HMRG and pathology
F	82	Gum	Well	2	I	clearly delineated
M	50	Tongue	Poor	4D	I	clearly delineated
M	79	Gum	Well	2	I	could not detect a part of OSCC
M	76	Floor of mouse	Well	3	II	Detected dysplasia as OSCC
M	77	Gum	Moderate	3	I	clearly delineated
F	75	Buccal mucosa	Well	3	III	clearly delineated
F	91	Gum	Well	3	III	clearly delineated
M	37	Tongue	Moderate	4C	I	clearly delineated
M	92	Tongue	Moderate	4C	II	could not detect a part of OSCC
F	26	Gum	Well	3	IV A	clearly delineated
F	65	Tongue	Well	3	I	clearly delineated
F	54	Floor of mouse	Moderate	3	I	clearly delineated
F	80	Tongue	Moderate	4C	IV A	clearly delineated
M	76	Gum	Well	2	I	clearly delineated
M	61	Tongue	well	2	I	could not detect a part of OSCC
F	62	Gum	Well	2	I	clearly delineated
F	82	Tongue	Well	4D	II	clearly delineated
M	51	Floor of mouse	Moderate	3	IV A	clearly delineated
F	47	Tongue	Poor	4D	IV A	clearly delineated
M	59	Tongue	Well	3	III	clearly delineated
M	86	Tongue	Moderate	4C	IV A	clearly delineated
M	54	Tongue	Well	3	2	clearly delineated

表 1: gGlu-HMRG を用いた深部断端診断の結果。

そこで今回、正常口腔粘膜と口腔扁平上皮癌組織を用い口腔癌組織で GGT family の isotype について検討を行うこととした。GGT family では活性がないものも多数報告されておりこれまでに活性が報告されている isotype について口腔扁平上皮癌や正常口腔粘膜組織を用いて GGT isotype の発現状況について免疫染色により検討を行った。

3. 研究の方法

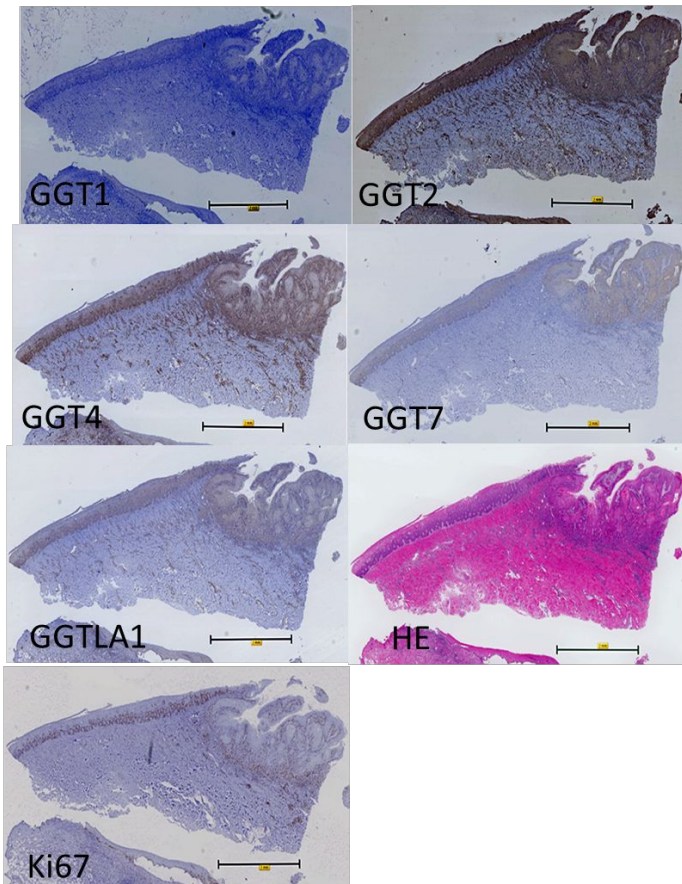
信州大学医学部附属病院歯科口腔外科で口腔扁平上皮癌と診断された一連の患者 (n=11) から得られた未治療口腔扁平上皮癌組織と、ボランティアの正常組織 (n=10) を用いて検討を行った。

口腔扁平上皮癌組織で GGT 活性を蛍光プローブで確認した後に FFPE より切片を作成し、GGT1, GGT2, GGT4, GGT7, GGTL1 と Ki67 に対する抗体で免疫組織学的手法により検討を行った。免疫組織学的所見は PC 顕微鏡システムを使用し病理医が分析した。発現状況に関して正常組織および癌組織で比較検討した (Mann Whitney test)。

正常口腔粘膜は basal cell layer, prickle cell layer と granule cell layer に分けて陽性細胞数をカウントした (Kruskal-Wallis

test)。

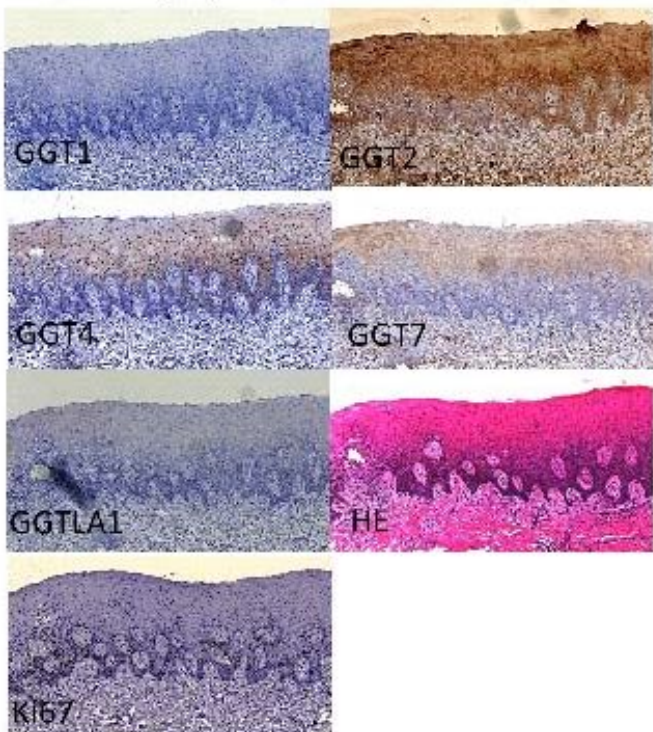
GGT family expression of normal tissue V.S. OSCC



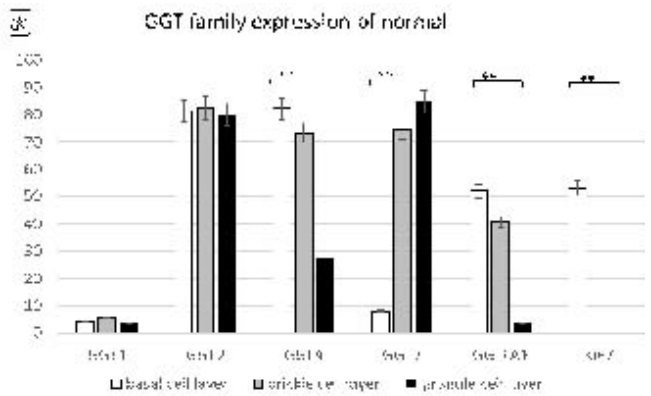
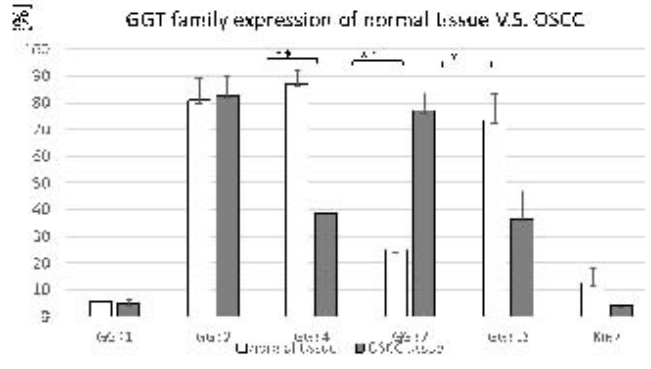
4. 研究成果

正常組織と口腔扁平上皮癌組織ではいくつかの isotype の発現に差がみられた。GGT4 と GGTL1 は Ki67 と共在し正常口腔粘膜組織では傍基底層に発現し、口腔扁平上皮癌では全体的に発現していた。GGT7 は正常組織では顆粒層と角化層に発現し、口腔扁平上皮癌では癌

GGT family expression of normal oral mucosa



真珠に発現していた。Mann Whitney test, Kruskal-Wallis test では口腔扁平上皮癌と正常組織の GGT4, GGTL1 と GGT7 で統計学的有意差を認めた ($p < 0.01$)。



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)

Human Papillomavirus 16 E6 Induces FoxM1B in Oral Keratinocytes through GRHL2. Chen W, Shimane T, Kawano S, Alshaikh A, Kim SY, Chung SH, Kim RH, Shin KH, Walentin K, Park NH, Schmidt-Ott KM, Kang MK. J Dent Res. 2018 Feb 1;22034518756071.

Grainyhead-like 2 regulates epithelial plasticity and stemness in oral cancer cells. Chen W, Yi JK, Shimane T, Mehrazarin S, Lin YL, Shin KH, Kim RH, Park NH, Kang MK. Carcinogenesis. 2016 May;37(5):500-10.

〔学会発表〕(計1件)

第61回日本口腔外科学会総会・学術大会 (2016年 千葉市)
アミノ酸代謝の基づいた口腔癌検出の新しい手法に関する研究。(優秀ポスター賞受賞)
嶋根哲

〔その他〕

ホームページ等 なし。

6 . 研究組織

(1)研究代表者

嶋根哲 (SHIMANE TETSU)

信州大学・医学部附属病院・特任研究員

研究者番号 : 80714469