

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K11845

研究課題名(和文) 口腔癌の発生と浸潤・転移に関わる上皮間葉転換の制御因子 Np63の分子機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation on the molecular mechanisms of the carcinogenesis, invasion, and metastasis of oral cancer via DeltaNp63-mediated epithelial-mesenchymal transition

研究代表者

松原 良太 (Matsubara, Ryota)

九州大学・歯学研究院・共同研究員

研究者番号：60615798

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：今回、Np63とGタンパク共役7回膜貫通型受容体の1つで、thrombin receptorとも言われており、いくつかの癌種で発現していることが報告されている protease-activated protein (PAR) 1との関連について検討した。その結果、腫瘍細胞および間質細胞に PAR1 の発現を認めた症例では、頸部リンパ節転移の発生率や組織学的悪性度が有意に高く、また、浸潤先端部の腫瘍細胞におけるPAR1の発現は、Np63の発現と逆相関していた。以上より、Np63の発現減弱によりPARの発現が増強し、EMTを誘導することで、OSCCの進展に寄与してい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

口腔扁平上皮癌に特異的なマーカーを発見し、その機能を解明することで口腔扁平上皮癌患者の生存率を改善できること。

研究成果の概要(英文)：We investigated the relationship between Np63 and protease-activated protein (PAR) 1, a G protein-coupled 7-transmembrane receptor, also known as thrombin receptor, which has been reported to be expressed in several cancer types. As a result, the incidence of cervical lymph node metastasis and histological grade were significantly higher in cases with PAR1 expression in tumor and stromal cells, and PAR1 expression in tumor cells at the invasive tip was inversely correlated with Np63 expression. These results suggest that PAR expression is enhanced by reduced expression of Np63 and contributes to the progression of OSCC by inducing EMT.

研究分野：口腔外科学

キーワード：口腔扁平上皮癌 上皮-間葉転換 Np63 PAR1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、正常個体の器官形成期に必須の現象である上皮 - 間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition: EMT) が癌の浸潤・転移に関与していることが示唆されている。また EMT が癌細胞に誘導されることにより、癌幹細胞様の形質を獲得することも明らかにされつつある。しかしながら、癌の発生および浸潤・転移における EMT の詳細な分子機構についてはいまだ不明な点が多い。本研究では EMT を制御する分子として癌抑制遺伝子 p53 のホモログの一つである Np63 に着目し、これまで研究を遂行してきた。われわれは、過去に口腔扁平上皮癌 (oral squamous cell carcinoma: OSCC) において腫瘍中心部から浸潤先端部に向かうにつれて Np63 の発現強度が減弱し、間葉系マーカーである vimentin の発現が増強したことを示した。また、Np63 ノックダウンにより間葉系細胞様の性質を獲得し、運動能が亢進したことから、Np63 の発現減弱が EMT の誘導に関与していることが示唆された。われわれは口腔扁平上皮癌において Np63 の発現減弱が EMT を誘導する可能性があることを示したが、Np63 発現減弱がどのようなメカニズムで細胞に影響を与えているか不明であった。そこで、G タンパク共役 7 回膜貫通型受容体の一つで thrombin receptor とも言われており、乳癌、肺癌、卵巣癌、前立腺癌、膵臓癌などのさまざまな悪性腫瘍での発現が報告されている protease-activated receptor 1 (PAR1) という分子に着目した。先行研究で、われわれは、OSCC の腫瘍中心部から浸潤先端部にかけて PAR1 の発現が増強しており、Np63 と逆の発現を示したことを報告した。また OSCC 細胞を使用し、Np63 ノックダウンすると PAR1 の発現量の増加を認めた。このことから、Np63 を介した EMT の誘導には PAR1 が重要であることが示唆された。

2. 研究の目的

上記より、Np63 を介した EMT の誘導には PAR1 が重要であることが示唆されたが、PAR1 と EMT との関連性についての詳細は不明である。本研究では、Np63 と PAR1 との関連を検討し、これらによる EMT を介した口腔扁平上皮癌の発生および浸潤・転移能の獲得機構を分子生物学的に解明することを目的とする。

3. 研究の方法

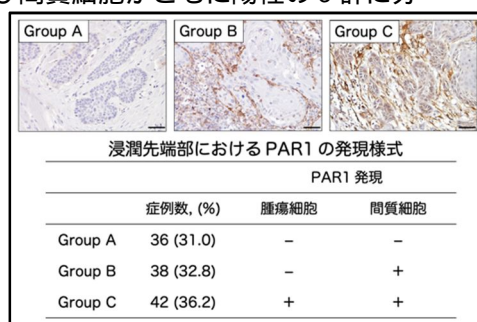
OSCC 生検標本における PAR1 の免疫組織化学的検討

OSCC 生検標本 116 例における PAR1 の発現を免疫組織化学的に検索し、PAR1 の発現様式と臨床病理組織学的所見との関連について解析を行った。

4. 研究成果

PAR1 の発現様式から全症例を、Group A: 腫瘍細胞および間質細胞がともに陰性、Group B: 腫瘍細胞が陰性かつ間質細胞が陽性、Group C: 腫瘍細胞および間質細胞がともに陽性の 3 群に分類した。(図 1)

PAR1 の発現様式と臨床病理学的所見との関連について検討したところ、Group C は、Group A および Group B と比較して組織学的悪性度の高い症例が多く、頸部リンパ節転移の発生頻度が有意に高かった。(図 2) また、頸部リンパ節転移の発生要因となりうる因子についてロジスティック回帰分析による多変量解析を行ったところ、PAR1 の発現様式にのみ統計学的有意差を認め、Group C では Group A と比較して頸部リンパ節転移の発生リスクが有意に高かった。(図 3)



(図 1) PAR1 の発現様式による分類

	PAR1 発現				p 値
	Group A	Group B	Group C	p 値	
性別	70 (60.3)	29	19	22	0.219
男性	46 (39.7)	13	19	14	
女性					
原発部位	64 (55.2)	26	17	21	0.157
舌	37 (31.9)	13	15	9	
嚙肉	5 (4.3)	3	1	1	
口腔底	10 (8.6)	0	5	5	
T 分類	90 (77.6)	36	28	26	0.283
T1/2	25 (22.4)	6	10	10	
T3/4					
臨床病期分類	79 (68.1)	35	25	19	0.015
stages I/II	37 (31.9)	7	13	17	
stages III/IV					
浸潤先端部	17 (14.7)	5	4	8	0.298
有	99 (85.3)	37	34	28	
無					
頸部リンパ節転移	30 (25.9)	5	6	19	<0.001
有	86 (74.1)	37	32	17	
無					
PAR1 発現	4 (3.4)	1	0	3	0.130
Group A	112 (96.6)	41	38	33	
Group B					
Group C					

カイ二乗検定; p<0.05

(図 2) 臨床病理組織学的所見との関連

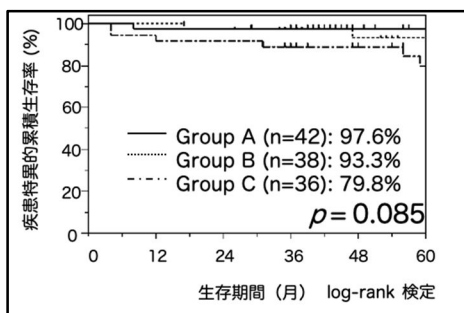
	頸部リンパ節転移		OR (95% CI)	p 値	OR (95% CI)	p 値
	有	無				
性別	17	53	Reference	Reference		
男性	13	33	1.23 (0.53-2.85)	0.633	1.46 (0.56-3.89)	0.444
女性	4	20				
T 分類	23	67	Reference	Reference		
T1/2	7	19	1.07 (0.38-2.80)	0.889	0.96 (0.30-2.88)	0.948
T3/4						
浸潤先端部 (YK 分類)	19	77	Reference	Reference		
grades 1/2/3	11	9	4.95 (1.80-14.01)	0.002	2.58 (0.75-9.06)	0.132
grades 4C/4D						
分化度 (WHO 分類)	14	62	Reference	Reference		
grade 1	16	24	2.95 (1.26-7.08)	0.013	1.50 (0.51-4.26)	0.456
grades 2/3						
PAR1 発現	5	37	Reference	Reference		
Group A	6	32	1.39 (0.38-5.23)	0.615	1.20 (0.30-4.87)	0.790
Group B	19	17	8.27 (2.64-25.87)	<0.001	5.56 (1.70-20.56)	0.004
Group C						

OR: odds ratio (オッズ比); 95% CI: 95% confidence interval (95%信頼区間)

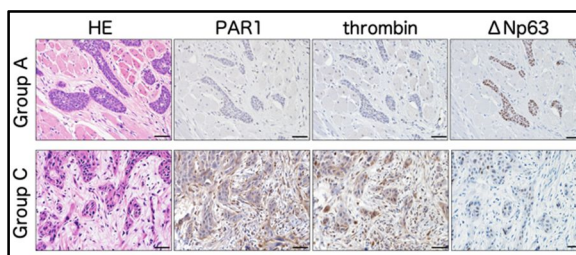
(図 3) 頸部リンパ節と PAR1 の発現との関連

PAR1 と予後との関連について検討したところ、有意差は認められなかったものの、Group C の生存率が最も低かった。(図 4)

次に、浸潤先端部における PAR1 の発現と thrombin および Np63 の発現を比較検討した。Group A では、thrombin は腫瘍細胞で発現を認めなかったのに対して、Np63 は強く発現していた。一方、Group C では thrombin は PAR1 の発現様式と同様に腫瘍細胞で強く発現していたが、Np63 の発現強度は逆に減弱していた。(図 5)



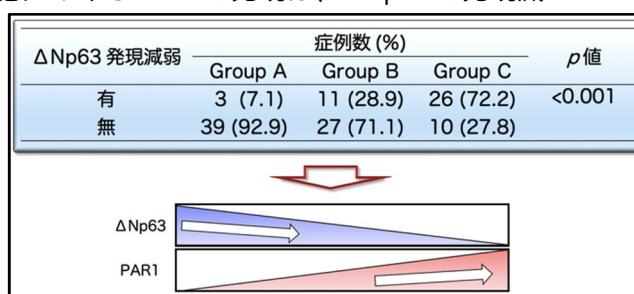
(図 4) PAR1 の発現と予後との関連



(図 5) 浸潤先端部における PAR1、thrombin、Np63 の発現

さらに、Np63 の発現減弱は、Group A で 3 例 (7.1%)、Group B で 11 例 (28.9%) および Group C で 26 例 (72.2%) に認められ、腫瘍細胞における PAR1 の発現は、Np63 の発現減弱と有意に関連していた ($p < 0.001$)。(図 6)

以上のことより、本研究では、浸潤先端部の腫瘍細胞における PAR1 の発現を認めた症例では、頸部リンパ節転移の発生率が高く、また Np63 の発現は、PAR1 の発現と関連していることが示唆された。



(図 6) 浸潤先端部における Np63 の発現減弱の有無と PAR1 発現様式との関連

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Maruse Y, Kawano S, Jinno T, Matsubara R, Goto Y, Kaneko N, Sakamoto T, Hashiguchi Y, Moriyama M, Toyoshima T, Kitamura R, Tanaka H, Oobu K, Kiyoshima T, Nakamura S.	4. 巻 -
2. 論文標題 Significant association of increased PD-L1 and PD-1 expression with nodal metastasis and a poor prognosis in oral squamous cell carcinoma.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ijom.2018.01.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Naoki Kaneko, Shintaro Kawano, Kaori Yasuda, Yuma Hashiguchi, Taiki Sakamoto, Ryota Matsubara, Yuichi Goto, Teppei Jinno, Yasuyuki Maruse, Masahiko Morioka, Taichi Hattori, Shoichi Tanaka, Hideaki Tanaka, Ryoji Kitamura, Tamotsu Kiyoshima, Seiji Nakamura	4. 巻 75
2. 論文標題 Differential roles of kallikrein-related peptidase 6 in malignant transformation and Np63 - mediated epithelial-mesenchymal transition of oral squamous cell carcinoma.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Oral Oncology	6. 最初と最後の頁 148-157
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.oraloncology.2017.11.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ryoji Kitamura, Takeshi Toyoshima, Hideaki Tanaka, Shintaro Kawano, Ryota Matsubara, Yuichi Goto, Teppei Jinno, Yasuyuki Maruse, Kazunari Oobu, Seiji Nakamura	4. 巻 14
2. 論文標題 Cytokeratin 17 mRNA as a prognostic marker of oral squamous cell carcinoma.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 6735-6743
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2017.7066	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yuma Hashiguchi, Shintaro Kawano, Yuichi Goto, Kaori Yasuda, Naoki Kaneko, Taiki Sakamoto, Ryota Matsubara, Teppei Jinno, Yasuyuki Maruse, Hideaki Tanaka, Masahiko Morioka, Taichi Hattori, Shoichi Tanaka, Tamotsu Kiyoshima, Seiji Nakamura	4. 巻 -
2. 論文標題 Tumor-suppressive roles of Np63 -miR-205 axis in epithelial-mesenchymal transition of oral squamous cell carcinoma via targeting ZEB1 and ZEB2.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Physiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jcp.26267	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Taiki Sakamoto, Shintaro Kawano, Ryota Matsubara, Yuichi Goto, Teppei Jinno, Yasuyuki Maruse, Naoki Kaneko, Yuma Hashiguchi, Taichi Hattori, Shoichi Tanaka, Ryoji Kitamura, Tamotsu Kiyoshima, Seiji Nakamura	4. 巻 69
2. 論文標題 Critical roles of Wnt5a-Ror2 signaling in aggressiveness of tongue squamous cell carcinoma and production of matrix metalloproteinase-2 via Np63 -mediated epithelial-mesenchymal transition.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Oral Oncology	6. 最初と最後の頁 15-25
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.oraloncology.2017.03.019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	川野 真太郎 (Kawano Shintaro) (00398067)	九州大学・大学病院・准教授 (17102)	
研究分担者	神野 哲平 (Jinno Teppei) (60755247)	九州大学・大学病院・助教 (17102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------