

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16838

研究課題名(和文) 早期舌扁平上皮癌における後発頸部リンパ節転移予測の新規マーカーの解析

研究課題名(英文) Analysis of new prediction marker for prognosis of early stage lingual squamous cell carcinoma

研究代表者

伊藤 有未 (Ito, Yumi)

福井大学・学術研究院医学系部門(附属病院部)・特命助教

研究者番号：00646458

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：早期舌扁平上皮癌におけるFrizzled7(FZD7)、Interleukin-1 receptor antagonist protein(IL1RN)の発現と予後の関係を解析した。免疫組織化学では、FZD7の発現は早期舌癌の予測マーカーの一つとして臨床応用できる可能性が見出された。またFZD7の機能解析として、口腔癌細胞株T3M-1でFZD7の発現を抑制してinvasion assayを行うと、浸潤能が有意に低下した。FZD7の発現抑制は、上皮系マーカー、間葉系マーカーの両方の発現を上昇させることも分かった。これは癌細胞が上皮間葉移行の中間の状態にあることを示唆するものであると推察する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

舌扁平上皮癌は早期でも後に頸部リンパ節転移を生じて予後不良となる例がしばしば認められる。このことが予測できるマーカーが発見されれば、初回治療時に予防的頸部郭清を行ったり、頸部郭清を行わない場合にも再発に厳重に注意して経過観察することができる。今回の研究によってFZD7が予後予測マーカーの一つとなりうる可能性が示された。さらなる研究によって臨床応用できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We investigated the expression of Frizzled7(FZD7), and Interleukin-1 receptor antagonist protein(IL1RN) and clinical data in early stage lingual squamous cell carcinoma (SCC). In immune-histochemical staining, the results demonstrate that the expression of FZD7 can be a novel marker to predict recurrence of T1N0M0 or T2N0M0 lingual cancer. Next, we examined function of FZD7 in invasion of cancer. Suppression of FZD7 by si RNA decreased significantly invasive capacity of T3M-1 cells, oral SCC cell line. We hypothesized suppression of FZD7 could induce the epithelial-mesenchymal transition (EMT) in cancer cell line. Suppression of FZD7 increased expression of E-cadherin, epithelial cells marker in T3M-1. However, FZD7 suppression also increased expression of N-cadherin and Vimentin, markers of mesenchymal cells. In epithelial-mesenchymal transition, cells can be in various state from epithelial to mesenchymal, therefore our results may show the intermediate state.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：早期舌扁平上皮癌 後発リンパ節転移 FZD7 IL1RN

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

舌癌 T1、T2 症例の後発頸部リンパ節転移については、局所コントロール良好にも関わらず後発リンパ節転移を認める例が存在する。この原因として初回治療時にすでに微小リンパ節転移が存在する可能性が考えられ予防的頸部郭清術が検討されてきた。しかしながら、予防的頸部郭清の有効性については未だ見解が分かれるところである。後発リンパ節転移予測因子については、組織学的悪性度、浸潤様式、脈管浸潤や神経浸潤、CD105、VEGF の発現などが報告されているが、より高精度な予測マーカーが発見されれば、実臨床に寄与すると考える。すなわち後発リンパ節転移の可能性が高いかどうか予想できれば、侵襲性の高い予防的郭清術の必要性について適切に判断できるようになる。また予防的郭清を行わない場合でも、後発リンパ節転移の可能性が高い症例においては術後の経過観察の頻度を増やし、より詳細な検査を行うことによつて、転移の早期発見・予後改善に繋がれると考える。

### 2. 研究の目的

目的は早期舌扁平上皮癌症例において後発リンパ節転移予測に有用なマーカーを発見することである。

予後予測マーカーの候補を探すため初期実験を行った。舌癌 T1N0M0 症例で、舌部分切除後早期に頸部リンパ節転移をきたした 5 例と、術後 5 年間頸部リンパ節転移を認めなかった 5 例の舌癌のパラフィン包埋標本から RNA を抽出、cDNA を作成して上皮間葉移行 (EMT) に関与する遺伝子について PCR アレイを行った。発現変化の大きな遺伝子を抽出し、その中から FZD7 と IL1RN に注目した。これらを早期舌癌症例の後発頸部リンパ節転移予測マーカーの候補とし、予後予測マーカーとなりうるか検討を行った。また、in vitro で FZD7 の癌の転移における機能解析を行った。

### 3. 研究の方法

#### (1) 免疫組織化学を用いた検討

- 当院にて舌部分切除術を施行した早期舌癌症例で免疫組織化学的染色を用いて FZD7、IL1RN の発現を解析し、無再発生存率との関連を解析する。
- 早期舌癌のみならず、進行舌癌も含め当院で治療を行った舌癌症例全体において免疫組織化学的染色を用いて FZD7、IL1RN の発現を解析し、無再発生存率や全生存率など予後との関連を解析する。

#### (2) 口腔扁平上皮癌細胞株 T3M-1 において FZD7 の機能解析を行う

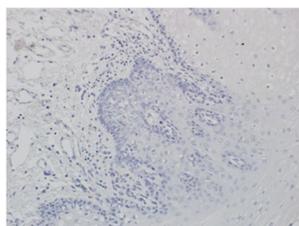
- siRNA で FZD7 の発現を抑制すると浸潤能が変化するか invasion assay を行う。
- FZD7 を抑制すると上皮間葉移行に関与する遺伝子の発現がどのように変化するか real time PCR で解析を行う。また、タンパクレベルでの発現変化をウエスタンブロットで解析する。

### 4. 研究成果

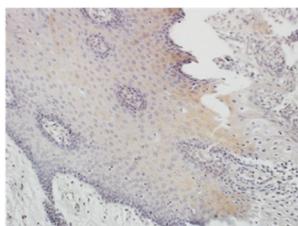
#### (1) a. 早期舌癌における FZD7、IL1RN の発現と後発頸部リンパ節転移

2006 年から 2016 年までに当院にて舌部分切除術を受け、48 か月以上観察した舌扁平上皮癌 T1N0M0 または T2N0M0 の 29 症例において免疫染色を用いて FZD7 の発現を検討した。

**FZD7 -**



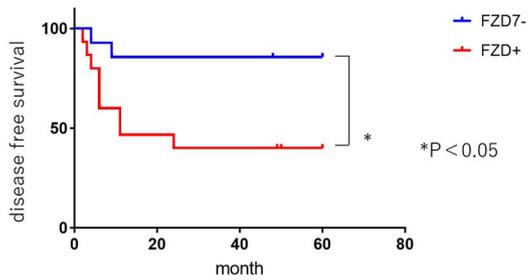
**FZD7 +**



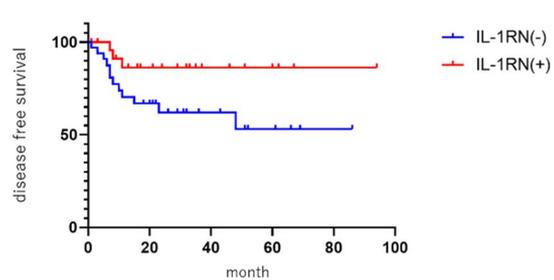
×200

FZD7 高発現群において、無再発生存率が有意に低下することが分かった。FZD7 高発現群においては、無再発生存率が有意に低下することが分かった (図 1)。IL1RN では低発現群において無再発生存率が低下する傾向が認められた (図 2)。この FZD7 の免疫組織化学による発現解析では、感度 82%、特異度 67% であり、FZD7 単独では予後予測マーカーとして臨床応用するには不十分であるが、さらに有用なマーカーと組み合わせることで予後予測に役立つ可能性があると考えられた。

( 図 1 ) FZD7 の発現と無再発生存率

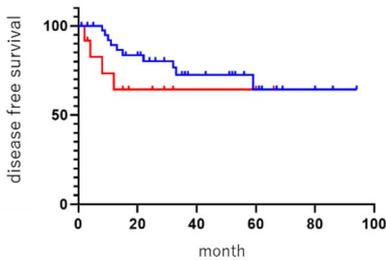


( 図 2 ) IL1RN の発現と無再発生存率

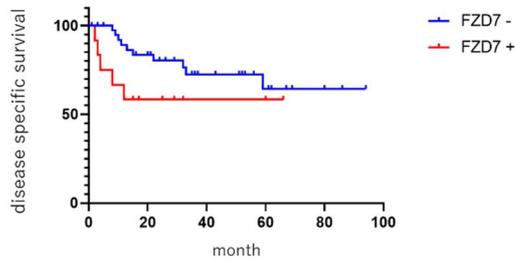


b. 進行舌癌も含め、FZD7 が舌癌の予後予測マーカーとなりうるかを免疫組織化学で検討した。2006 年から 2016 年までに当科で治療を行い、48 か月以上観察を行った、進行期癌も含む舌扁平上皮癌 56 症例において免疫染色を用いて FZD7 の発現を検討した。舌癌全体では FZD7 高発現群と低発現群の 2 群間で無再発生存率に差は認められなかった ( 図 3 )。また、疾患特異的生存率にも差は認められなかった ( 図 4 )。進行癌においては腫瘍の大きさ、転移の有無、手術治療や化学療法の成績が予後に影響を及ぼすため、FZD7 の発現の強さのみでは予後予測するのが困難になると考えられた。

( 図 3 ) FZD7 の発現と無再発生存率 ( 舌癌全体 )



( 図 4 ) FZD7 の発現と疾患特異的生存率 ( 舌癌全体 )

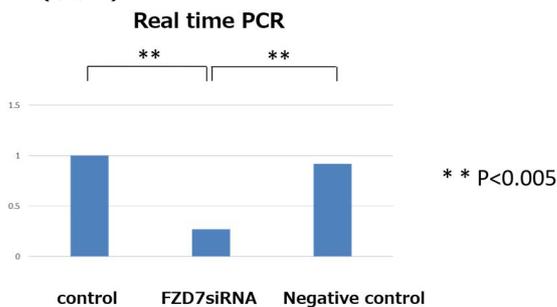


## ( 2 ) 口腔扁平上皮癌細胞株 T3M-1 を用いた FZD7 の機能解析

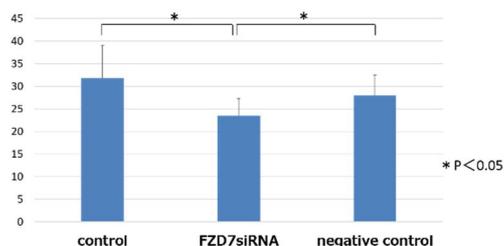
### a. invasion assay

T3M-1 において FZD7 の発現を siRNA で抑制し real time PCR で抑制を確認のうえ ( 図 5 ) 細胞の浸潤能が変化するかを検討した。FZD7 発現抑制株においては浸潤能が有意に低下することが分かった ( 図 6 )。

( 図 5 ) FZD7 の発現



( 図 6 ) invasion assay

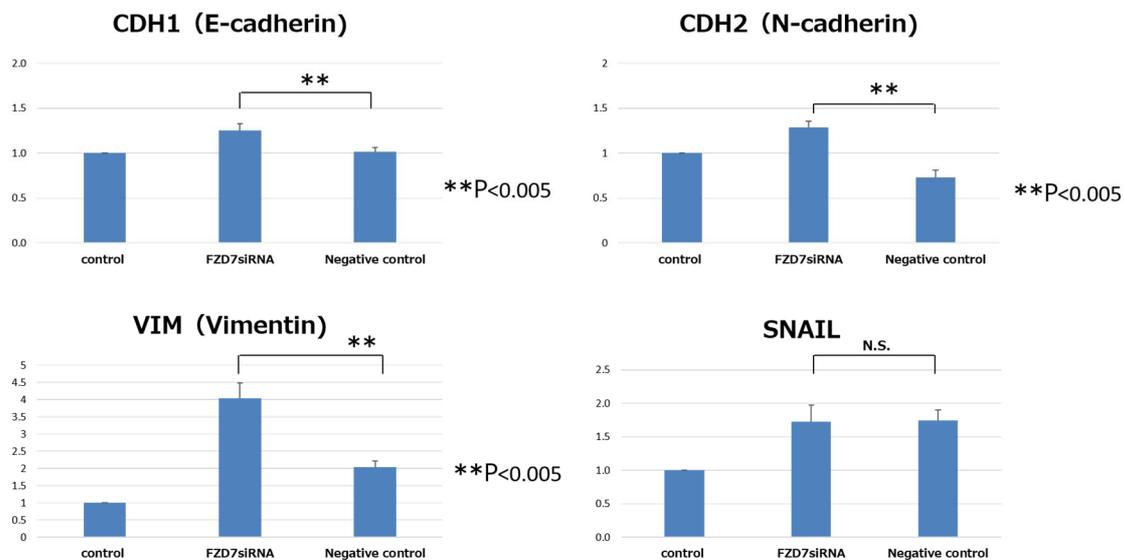


b. FZD7 を siRNA で抑制し、EMT に関与する分子の発現がどのように変化するか real time PCR で確認した。その結果、上皮系マーカーである E-cadherin の発現はやや上昇することが分かった。Invasion assay の結果から、FZD7 が EMT を促進する方向に働くという仮説をたてると、これに矛盾しない結果であった。しかしながら、間葉系マーカーである N-cadherin, Vimentin の発現も上昇しており、これは仮説と逆の結果といえる。Snail においては変化が認められなかった。( 図 7 )

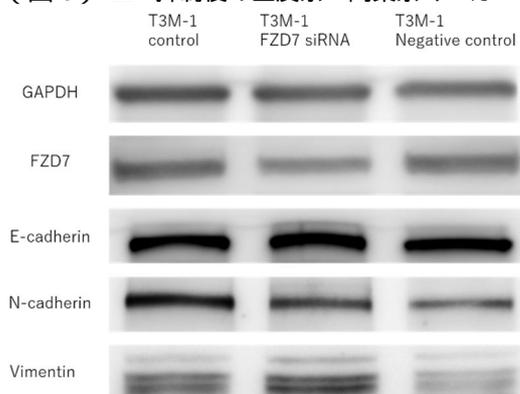
また、ウェスタンブロットでタンパクレベルの発現を確認した。タンパクレベルでは FZD7 の発現の抑制は 50% 程度でやや弱かった。上皮系マーカーの E-cadherin はやや発現上昇しており、予想と同じ結果となった。間葉系マーカーの N-cadherin, Vimentin は negative control よりも FZD7 抑制株の方が発現が上昇しており、これも real time PCR と同様の結果となった( 図 8 )。FZD7 を抑制すると間葉系マーカーが上昇するという結果になり、これは仮説と異なる結果であるが、その理由として上皮間葉移行においては細胞が上皮系から間葉系の様々な状態にあると言われており、今回の実験では細胞が完全に間葉系の状態にはなっていないことを示唆してい

るのではないかと推測する。ただ、siRNA では FZD7 の抑制が不十分であることも考えられる。FZD7 をノックダウンすることにより機能を完全に抑制して、同様の実験を行うことでその機能がさらに明らかになると考える。

( 図 7 ) FZD7 抑制後の上皮系・間葉系マーカーの発現 ( real time PCR )



( 図 8 ) FZD7 抑制後の上皮系・間葉系マーカーの発現(western blot)



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伊藤 有未
2. 発表標題 早期扁平上皮癌の予後予測因子としてのFZD7の解析
3. 学会等名 日本頭頸部癌学会
4. 発表年 2019年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------