

平成 21 年 5 月 12 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007-2008
 課題番号：19592279
 研究課題名（和文） 口腔扁平上皮がん再発のリスクファクターとしての p53 ファミリーの意義
 研究課題名（英文） Roles of p53 family proteins on the risk-factor of recurrence in oral squamous cell carcinomas.
 研究代表者
 石川 誠（ISHIKAWA MAKOTO）
 北海道大学・北海道大学病院・准教授
 研究者番号：10202970

研究成果の概要：

腫瘍の転移と再発は予後を左右する大きな要因であり、その防止対策が急務である。がん抑制遺伝子である p53 は多くの腫瘍でその変異がみられ、がん抑制遺伝子としての機能を喪失するだけでなく、より悪性度の高い腫瘍としての形質を獲得することが示され始めている。p53 変異の導くリスクファクターとしての意義を明らかにし、腫瘍の再発の防止の一助とすることを目的に検索を行った。

11 例の口腔扁平上皮がん患者について病理学的検索を行った。免疫染色で p53 異常タンパクの蓄積が 9 例に認められ、変異型 p53 をゲノムにもつ可能性が示唆された。これらの症例から DNA および RNA を抽出し、遺伝子変異について検索したところ、全例で p53 の変異が確認された。

抗がん剤は癌細胞にアポトーシスを引き起こし細胞死誘導を生じさせる。野生型 p53 はこの機構に重要な役割を演じているが、口腔がんの多くは変異型 p53 をゲノムにもち抗がん剤の効果を高める必要がある。ゲノムに変異型 p53 をもち抗がん剤シスプラチンに抵抗性をもつ口腔がん細胞株 HSC3 を対象としてシスプラチンの細胞死誘導に及ぼすポリリン酸の影響について検索した。ポリリン酸は 10 数個から数百個の正リン酸が直鎖状に結合したポリマーで、ほとんど全ての生物に存在することが知られているが生物学的機能については不明な点が多い。その結果、ポリリン酸がシスプラチン処理により細胞に生じた細胞死誘導をさらに活性化し、低濃度のシスプラチンでも細胞死を誘導できることが明らかになり、この際には p53 被依存的に Bax の転写活性化にともなう Caspase9、PARP の活性化が生じていた。このような所見は、ポリリン酸が p53 以外の転写因子の安定化にはたらきストレス経路によるアポトーシス誘導経路を刺激したものであると思われる。

さらに患者血清中の p53 タンパクの発現について ELISA 法を用いて検討を行った。その結果、血清中に p53 タンパクの発現がみられた症例では二次的なリンパ節転移の頻度が高く、予後との相関が得られた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：口腔扁平上皮がん、腫瘍再発、p53 ファミリー

1. 研究開始当初の背景

腫瘍の転移と再発は予後を左右する大きな要因であり、その防止対策が急務である。が

ん抑制遺伝子である p53 は多くの腫瘍でその変異がみられ、がん抑制遺伝子としての機能を喪失するだけでなく、より悪性度の

高い腫瘍としての形質を獲得することが示され始めている。

2. 研究の目的

p53 変異の導くリスクファクターとしての意義を明らかにし、腫瘍の再発の防止の一助とすることを目的に検索を行った。

3. 研究の方法

(1) 口腔がんの術前治療と p53 の関連
北海道大学病院口腔外科で術前に化学療法あるいは放射線療法を行った口腔扁平上皮がん 11 例を対象にした。これらの術前生検標本に対して、p53, MIB-1 の免疫染色を行い、その発現と術前治療への感受性との関連について検索した。術前治療効果は大星・下里分類に従って判定し、有意差の検定には Fischer の直接法を用いた。

(2) ポリリン酸による口腔扁平上皮がん細胞の抗がん剤感受性増強効果

細胞培養:

舌扁平上皮がん由来細胞株 HSC-3 (RIKEN Cell Bank) を実験に用いた。細胞は 10% FBS (fetal bovine serum) と抗生物質を含んだ DMEM を用いて 37°C, 5% CO₂ で培養した。

ポリリン酸とシスプラチンの調整:

ポリリン酸は、柴博士 [リジェンティス株式会社] の供与による平均鎖長 100 のポリリン酸ナトリウムを純水に溶解、250mM pH 7.4 になるよう調整し 0.45 μm フィルターで濾過滅菌した。シスプラチンは、協和製薬から購入した。

細胞増殖活性および細胞毒性の検索:

① MTS アッセイ: HSC-3 細胞が 80-90% コンフルエント時にトリプシン処理し、剥離した細胞を回収後、96 穴ウェルあたり 5000 個の細胞をプレーティングした。1mM の濃度のポリリン酸と、0, 0.5, 1, 2.5, 5 μg/ml の濃度のシスプラチンを加え、24 時間後に Cell Titer 96 AQ assay solution (プロメガ) で処理し、96 穴マイクロプレートリーダー (Bio-Rad) で吸光度を測定した。

② コロニーフォーメーションアッセイ: HSC-3 細胞を 6 穴ウェルに 3000 個ずつまき、培養 48 時間後に 1mM のポリリン酸、5 μg/ml シスプラチン、ポリリン酸とシスプラチンの両者を加えてさらに 48 時間培養を行い、固定後にギムザ染色を行った。

Western blot

HSC-3 細胞の培養液中に 5 μg/ml のシスプラチン単独あるいはシスプラチンと 1mM のポリリン酸を加え、 $\cdot\cdot$ 時間後に細胞を回収し、プロテアーゼ阻害剤、脱リン酸化防止剤を含む細胞 lysis buffer (Cytoskeleton, Inc., USA) に溶解し、BCA protein assay kit でタンパクを定量した。等量のタンパクを SDS-PAGE により電気泳動を行い Immobilon-P membrane (Millipore) に転写した。ブロッキングは 0.01% Tween 20 を含む TBS に溶解した 5% スキムミルクで一時間行い、DO-7 (抗 p53)、Bax, Apo-1/Fas (DAKO)、活性型 Caspase-3、-9 (Cell Signaling Technology) の 1 次抗体で 4°C、overnight の反応を行った。二次抗体は抗マウスおよびラビットの HRP-conjugated 2 次抗体を、室温で 1 時間反応した。洗浄後に Western Lightning Chemiluminescence (Perkin Elmer) で発光させ X 線フィルムに感光した。

(3) Serum p53 antibodies as a prognostic

indicator in oral squamous cell carcinoma

Patient clinical information and collection of blood samples

A total of 113 previously untreated patients with primary oral SCC who underwent treatment between January 1996 and June 2003 at Hokkaido University Dental Hospital, Sapporo, Japan, were enrolled in this study. The present protocol was approved by the Ethics Committee of Hokkaido University. The median follow-up time for survivors was 51 months (range, 7-104 months). The patients consisted of 70 men and 43 women, with a mean age of 64 years (range, 28-91 years). The tumor sites were the tongue in 54 patients, the gingiva in 32, the cheek in 16, the floor of the mouth in nine, and the hard palate in two patients. All tumors were classified according to the TNM system of the International Union Against Cancer (UICC).¹⁵ Eighteen tumors were stage I, 43 were stage II, 20 were stage III, and 32 were stage IV. Serum samples were collected from all 113 patients at routine blood sampling, prior to any treatment after diagnosis. Whole blood was centrifuged at 800 g for 15 min, and the supernatant was stored at -80°C until analysis. Clinical outcomes of 102 patients who were followed for more than 36 months after surgery were evaluated. When possible, postoperative titration of p53 Abs was re-evaluated every 3 months in the preoperatively seropositive patients.

Enzyme immunoassay for serum p53 antibodies

Serum p53 Abs were assessed by ELISA with an ANTI-P53 ELISA II Kit (Pharmacia, Paris, France). In brief, the samples were added to the wells of a microtiter plate coated with recombinant wild-type human p53 or a control protein and were incubated for 1 h at 20-25°C. The plates were washed four times with a wash solution. Peroxidase-conjugated goat antihuman immunoglobulin G-binding anti-p53 Ab was added to each well, and the plate was incubated for 1 h at 20-25°C. The washing procedure was repeated, and then the substrate 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine was added, followed by a 10-min incubation at 20-25°C. After addition of a stop solution (2 N H₂SO₄), the color reaction was measured immediately by absorption at 450 nm with a photospectrometer (model 680, BioRad, Hercules, CA, USA). A calibration curve was constructed from the specific signals of standards and from the levels of Abs indicated on the standard vials. The calibration curve was a linear regression curve that intersected the x axis at 0. Levels of anti-p53 Abs were then determined from the calibration curve. The cut-off value was determined as 1.3 U/ml, as previously reported by Shimada et al.⁸ Seven of the 153 healthy control donors were positive for p53 Abs (specificity, 95.5%) according to the study.

Enzyme immunoassay for squamous cell carcinoma antigen

SCC Ag in serum was tested with a radioimmunoassay kit (SCC-RIABEAD, Dainabot, Tokyo, Japan). The cut-off concentration of 1.5 ng/ml was in accordance with the manufacturer's instructions.

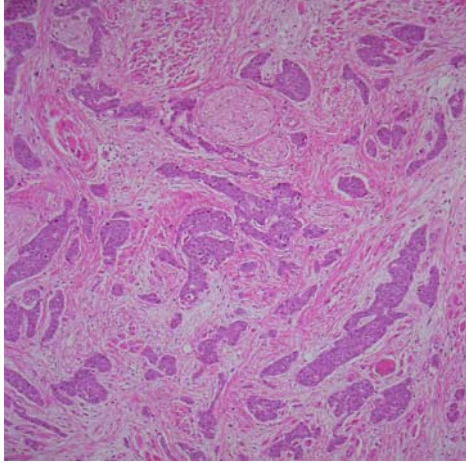
Statistical analyses

The χ -squared test and Fisher's exact test were used to determine significance levels between the two groups. The Kaplan-Meier method was used to generate survival curves, which were evaluated by the log-rank test. The clinicopathological variables associated with cause-specific survival were evaluated first in a univariate analysis and then in a multivariate analysis using the Cox proportional hazards model. All P values less than 0.05 were considered statistically significant.

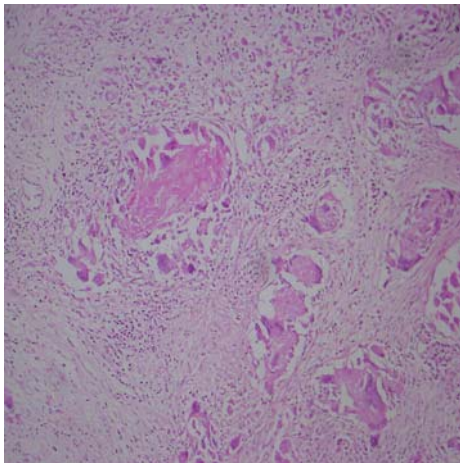
4. 研究成果

(1) 大星・下里分類では 11 例中、4 例は術前治療に抵抗性だったが、7 例は抗がん剤と放射線療法のコブネーションセラピーにより治療効果が得られた。

術前治療効果の認められなかった Grade I 症例を示す。腫瘍細胞は術前とほぼ同様に小型の胞巣を形成しながら増殖し、腫瘍細胞の変性の傾向は全くみとめられない (図 1)。



術前治療が奏効した症例を示す。Active な腫瘍細胞は完全に消失し、角質変性物を囲んで多核巨細胞が認められる (図 2)。

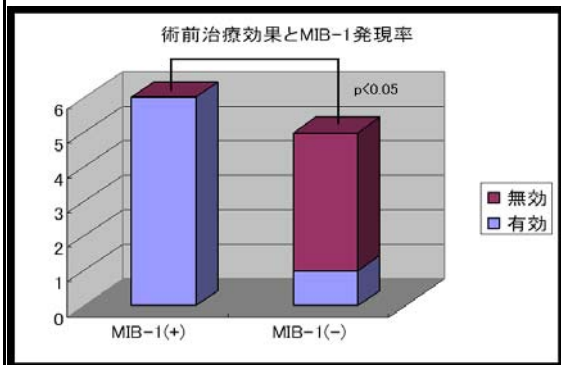


これらの症例の術前試験切除標本に対して抗ヒト p53 遺伝子産物モノクローナル抗体 (DO-7) を用い、p53 タンパクの免疫染色を行った (図 3)。野生型 p53 はがん抑制遺伝子で、DNA が損傷されるとリン酸化され安定化し、細胞周期を調節する p21 や DNA 修復を行う GADD45 などの転写を亢進する転写因子であるが、野生型ではユビキチン化されほとんどタンパクを検出することはできない。これに対して、多くのがん細胞でみられる変異型 p53 はユビキチン化されずタンパクが蓄積することが知られている。今回、核に陽性所見を示すがん細胞は変異型 p53 をゲノムに持つものと考えた。その結果、変異型 p53 症例では術前治療有効 6 例、無効 3 例、野生型 p53 をゲノムに持つと考えられる 2 例では術前治療有効 1 例、無効 1 例だった。野生型 p53 症例が少なく、有効群と無効群の間には有意差は見られなかった。しかし、今後症例

を増やすことによって p53 の変異と術前治療効果との関連性をさらに検討したいと考えている。

次に、Ki-67 抗原を認識する MIB-1 抗体を用いた免疫染色を行った。Ki-67 抗原は G0 以外の細胞周期に入った増殖細胞の核に発現するため、MIB-1 抗体は増殖中の細胞のマーカーとして頻用されている。今回、200 倍視野下でがん細胞の陽性率を測定し、60%以上を MIB-1 (+) 群とした。その結果、MIB-1 (+) 群では、6 例全てにおいて術前治療が有効であったのに対し、MIB-1 (-) 群では、術前治療が有効だったのは 1 例のみで、4 例は効果が認められなかった。有為差検定の結果を示す。MIB-1 の発現頻度の高さは危険率 5% と有意に差をもって術前治療効果と関連していることが示された。11 例の口腔扁平上皮がん患者試料を用いて術前放射線治療、化学療法に対するがん細胞の感受性について検討したところ、11 例中 7 例は術前治療効果奏効群であった。

これらの術前治療に感受性を示す腫瘍は、細胞増殖因子マーカー MIB-1 が高発現している症例が有意に多い傾向を示した。このような結果は、増殖能が高いがん細胞は放射線や化学療法による DNA の障害を受けやすいためと考えられた。



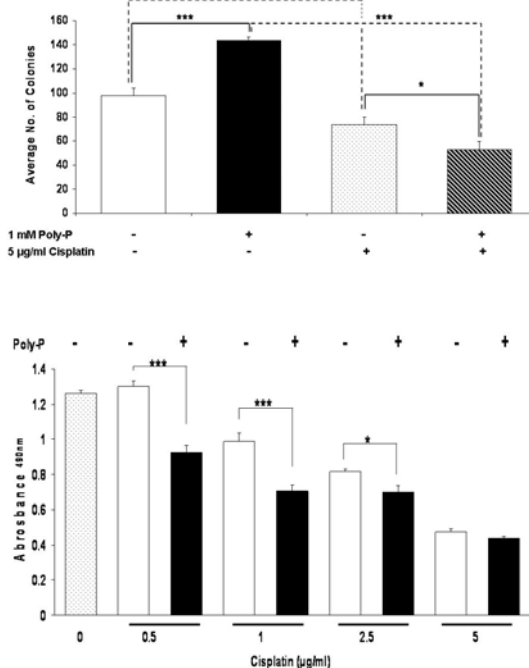
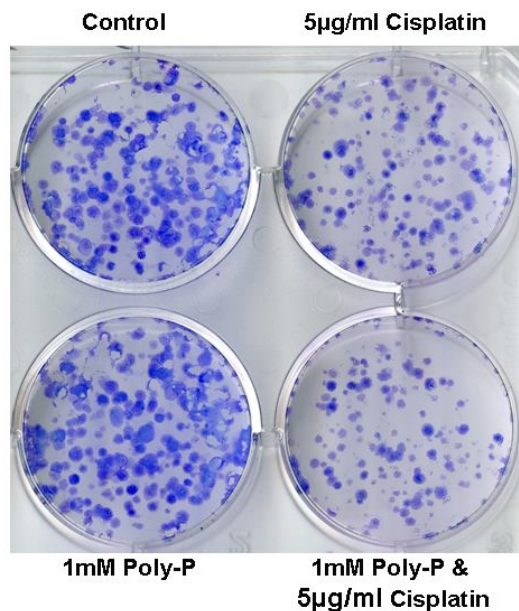
(2)

①シスプラチンとポリリン酸による細胞死の誘導効果

コロニーフォーメーションアッセイでゲノムに変異型 p53 をもつ口腔扁平上皮がん細胞株 HSC3 のシスプラチンによる細胞増殖におよぼすシスプラチンとポリリン酸の効果を検討した。通常の培養を行った際、6 穴ウェル 1 個当たり 3000 個の HSC-3 細胞をまき時間培養した際には 97.6 ± 6.1 個のコロニーが認められた。1mM のポリリン酸を培養液に加えるとコロニー数は 143.3 ± 3.1 個と有意に増加した。5 $\mu\text{g/ml}$ の濃度のシスプラチン単独処理では、コロニー数は 73.8 ± 5.9 に有意に減少し、ポリリン酸とシスプラチンの共処理でコロニー数は 52.8 ± 6.9 個とさらに有意の減少をみた (図 1)

MTS アッセイにより、HSC3 のシスプラチンの濃度による細胞死誘導および、この細胞死におよぼすポリリン酸の影響について検索した。その結果、HSC-3 細胞はシスプラチンの濃度が 0.5 $\mu\text{g/ml}$ ではシスプラチ

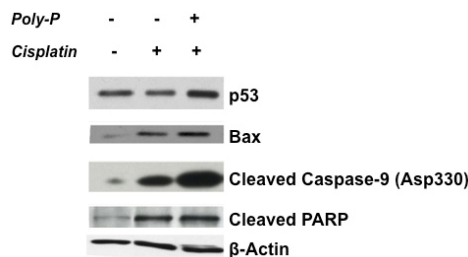
ンに抵抗性を示したが、 $1 \mu\text{g/ml} \sim 5 \mu\text{g/ml}$ ではシスプラチンの濃度依存性に細胞死が誘導された。ポリリン酸との共処理ではシスプラチン単独では抵抗性を示した $0.5 \mu\text{g/ml}$ の濃度でもシスプラチン単独処理に比べて有意に低値を示し、ポリリン酸処理によりシスプラチンが低濃度でも細胞死の誘導が生じることが明らかになった。(図 2)。



②シスプラチンとポリリン酸によるアポトーシス誘導タンパクの発現

抗がん剤による細胞死誘導にはアポトーシスが関与している。シスプラチン処理およびシスプラチンとポリリン酸で共処理した HSC-3 細胞から抽出したタンパクの Western

blot でアポトーシス関連タンパクの発現について検索した。シスプラチン単独処理で、HSC-3 細胞での変異型 p53 の発現は軽度減少したが、Bax は 1.2 倍に発現が亢進し、活性型 Caspase-9、PARP もそれぞれ 2.9 倍、1.4 倍に増加した。ポリリン酸との共培養では、変異型 p53 の発現が軽度に亢進したが、Bax はシスプラチン単独処理の 1.2 倍、活性型 Caspase-9 の発現は 1.9 倍、活性型 PARP の発現も 1.2 倍に増加した。



(3) Serum p53 antibodies as a prognostic indicator in oral squamous cell carcinoma

Eighteen (16%) of the 113 patients with primary oral SCC were positive for serum p53 Abs. This positivity rate was significantly higher ($P = 0.002$) than that of healthy control donors (control data previously reported⁸). Table 1 shows the clinicopathological factors in oral SCC patients with and without p53 Abs in the serum. There was no association of p53 Abs with any of these parameters (age, sex, primary tumor site, stage, TN classification, World Health Organization histological grade, or mode of invasion¹⁶). Table 2 shows clinical outcomes according to p53 Ab status. A significant difference was observed between p53 Ab status and

secondary cervical lymph node metastases ($P = 0.029$); secondary cervical lymph node metastases were present in four of ten (40%) patients positive for p53 Abs, but in only seven of 69 (10%) patients negative for p53 Abs. There was a significant relationship between the p53 Ab status and the cause-specific cumulative survival rate ($P = 0.018$); 5-year survival rates were 56.2% and 80.7% in p53 Ab-positive and negative patients, respectively (Fig. 1). Locoregional failure and distant metastases without locoregional failure were unrelated to p53 Ab status.

We evaluated the effects of a number of prognostic variables on overall survival. Tumor stage, nodal involvement, and p53 Ab status were found to be significant prognostic factors in a univariate analysis (Table 3). Multivariate analysis using the Cox proportional hazards model showed the presence of p53 Abs to be an independent prognostic factor ($P = 0.020$, hazard ratio = 3.509), as was nodal involvement ($P = 0.039$, Table 4).

Of the 18 patients positive for serum p53 Abs preoperatively, we were able to follow periodically 12 patients postoperatively; 11 of these patients underwent surgery alone, and one patient had preoperative radiotherapy (Fig. 2). Three of the 12 seropositive patients became seronegative

postoperatively, and one of these three became seropositive again 3 months later. This patient had a disease recurrence 2 months after the re-elevation of p53 Abs was found. Six of nine patients who remained seropositive throughout the treatment developed treatment failure: recurrence of the primary tumor in one, secondary cervical lymph node metastases in three, and multiple primary cancers (colorectal adenocarcinoma or lung adenocarcinoma) in two patients. Two patients with seronegative conversion and

three of nine patients remaining seropositive had no evidence of disease.

Figure 3 shows the changes in p53 Ab and SCC Ag serum values in a particular tongue cancer patient during the 13-month follow-up period. This 71-year old man had received neoadjuvant chemotherapy with tegafur/uracil for a month before the surgery, and the p53 Ab level slightly decreased during this treatment period. Although the value fell to four U/ml within a month after tumor resection

(hemiglossectomy), it increased to almost the preoperative level subsequently. Four months after the surgery, neck ultrasonography and computed tomography showed submandibular and upper and middle neck lymph node metastases, and he received a radical neck dissection. The p53 Ab value became negative 7 months after the second operation. Throughout the follow-up period, he remained negative for SCC Ag.

Table 1. Clinicopathological factors in oral squamous cell carcinoma with or without p53 antibodies in the serum

Clinicopathological factor	No. of patients n=113	p53 Ab positive (%) n=18	p53 Ab negative (%) n=95	P value χ ² -squared test
Age (years)				
<65	50	6 (33)	44 (46)	0.309
≥65	63	12 (67)	51 (54)	
Sex				
Male	70	10 (56)	60 (63)	0.542
Female	43	8 (44)	35 (37)	
Primary site				
Tongue	54	8 (44)	46 (48)	0.729
Gingiva	32	5 (26)	27 (28)	
Cheek	16	3 (17)	13 (14)	
FOM	9	1 (6)	8 (8)	
Hard palate	2	1 (6)	1 (1)	
Stage				
I	18	2 (11)	16 (17)	0.299
II	43	6 (33)	37 (39)	
III	20	6 (33)	14 (15)	
IV	32	4 (22)	28 (29)	
T				
T1	19	3 (17)	16 (17)	0.653
T2	54	8 (44)	46 (48)	
T3	15	4 (22)	11 (12)	
T4	25	3 (17)	22 (23)	
N				
N0	88	12 (67)	76 (80)	0.216
N+	25	6 (33)	19 (20)	
Histological grade				
G1, G2	55	8 (47)	47 (51)	0.560
G3, G4	54	9 (53)	45 (49)	
Unknown ^a	4	1	3	
Mode of invasion				
1, 2	28	3 (19)	25 (30)	0.496
3	39	6 (38)	33 (40)	
4C, 4D	52	7 (44)	45 (50)	
Unknown ^a	14	2	12	

Ab, antibody; FOM, floor of mouth
^aUnknown cases were excluded from the statistical analysis

Table 2. Clinical outcomes in patients with oral squamous cell carcinoma in relation to p53 Ab status

	p53 Abs positive (%) n=16	p53 Abs negative (%) n=86	P value Fisher's test
Locoregional failure	6/16 (38)	17/86 (20)	0.188
Secondary cervical lymph node metastasis without locoregional failure	4/10 (40)	7/69 (10)	0.029
Distant metastasis without locoregional failure	0/10 (0)	2/69 (3)	>0.999
5-year cumulative survival rate	56.2	80.7	0.018*

*Calculated by log-rank test

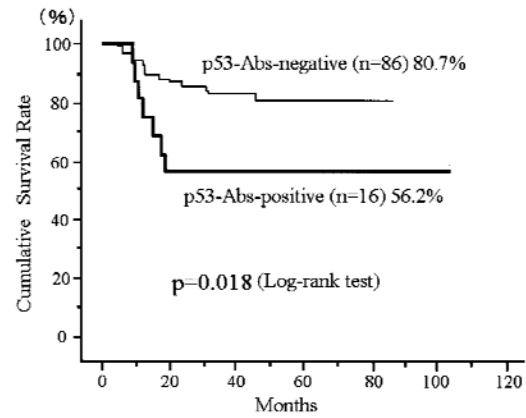


Fig. 1. Kaplan-Meier survival curves of patients with oral squamous cell carcinoma in relation to preoperative p53 antibody (Ab) status. Patients positive for p53 Abs had a poorer prognosis than those negative for p53 Abs ($P = 0.018$)

Table 3. Univariate analysis of 102 patients with oral squamous cell carcinoma

Variable	No. of patients	5-year survival rate (%)	P value log-rank test
Age (years)			
<65	45	79.5	0.598
≥65	57	75.1	
Sex			
Male	64	72.4	0.277
Female	38	84.1	
Stage			
I, II	56	86.9	0.007
III, IV	46	64.2	
T			
T1, T2	67	82.9	0.054
T3, T4	35	65.0	
N			
N0	80	84.3	<0.001
N1-N3	22	48.5	
Grade (WHO) ^a			
1	50	79.4	0.629
2, 3	48	74.6	
Mode of invasion ^b			
1-3	60	82.3	0.131
4C, 4D	29	70.4	
p53 Ab status			
Negative	86	80.7	0.018
Positive	16	56.2	

WHO, World Health Organization

^aAnalyzed in 98 of 102 patients

^bAnalyzed in 89 of 102 patients

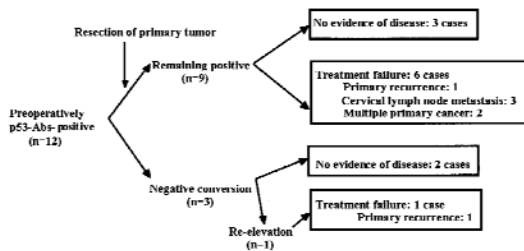


Fig. 2. Postoperative changes in p53 Abs and outcomes of patients preoperatively positive for p53 Abs

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)

1. Yamazaki Y, Chiba I, Ishikawa M, Satoh C, Notani K-I, Ohiro Y, Totsuka Y, Mizuno S, Kitagawa Y: Serum p53 antibodies as a prognostic indicator in oral squamous cell carcinoma. *Odontol*, 96:32-37, 2008.
(査読有)

[学会発表] (計 3 件)

1. Totsuka Y, Kitamura T, Hida K, Higashino F, Shindoh M: Inorganic polyphosphate (poly-P) induces EGF-mediated cell proliferation by activating ERK phosphorylation. The 13th World Congress on Advances in Oncology and 11th International Symposium on Molecular Medicine. 2008/10/9-11 Hersonissos, Crete, Greece
2. El-Beialy W, Kitamura T, Hida K, Higashino F, Totsuka Y, Shindoh M: Enhancing Chemosensitivity of Oral Squamous Carcinomas by Inorganic Poly-Phosphate. 第97回日本病理学会総会 5/15-17 2008 金沢
3. 山本栄治、樋田京子、東野史裕、戸塚靖則、進藤正信: ポリリン酸の細胞増殖に及ぼす役割. 第96回日本病理学会総会 3/13-15 2007 大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石川 誠 (ISHIKAWA MAKOTO)
北海道大学・北海道大学病院・准教授
研究者番号：10202970

(2) 研究分担者

進藤 正信 (SHINDOH MASANOBU)
北海道大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：20162802
小林 正伸 (KOBAYASHI MASANOBU)
北海道医療大学・看護福祉学研究科・教授
研究者番号：80241321
東野 史裕 (HIGASHINO FUMIHIRO)
北海道大学・大学院歯学研究科・准教授
研究者番号：50301891
大廣 洋一 (OHIRO YOICHI)
北海道大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：40301915

(3) 連携研究者

なし