

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18958

研究課題名(和文) 口腔がん進展におけるp62の分子機能の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular function of p62 in the progression of oral cancer

研究代表者

菅野 直美(石橋直美)(Kanno, Naomi)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：30738539

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：口腔がん切除マージン部分においてp62やLC3A、LC3Bが蓄積している状態は、オートファジーの異常を意味し、口腔がんの局所再発が発生した場合、病理学的に正常と診断された正常粘膜上皮にもオートファジー異常が発生している可能性が高いことを明らかにした。また、口腔白板症の悪性化に関するバイオマーカーとしてのp62の臨床的実用化の可能性を示すとともに、p62核染色とp62凝集が認められた場合には、厳密な経過観察を必要とする知見を得た。そして、口腔がんにおいて著明に発現量が亢進しているがん促進型miRNAであるmiR-142-5pが、口腔がん細胞の浸潤・増殖に関与することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

酸化ストレス関連たんぱく質(p62、LC3A、LC3B)が口腔癌の外科的切除における新規マーカーとなり得る可能性を見出した。今後、前向き観察研究そして臨床研究を計画するのに役立つ基礎的な研究結果を得ることが出来た。
口腔白板症の悪性化に関するバイオマーカーとして、p62の臨床的実用化の可能性を示すことが出来た。
口腔癌における新規がん促進型miRNAとして、miR-142-5pを同定し、その機能について明らかにすることが出来た。

研究成果の概要(英文)：We revealed that if an abnormal accumulation of p62, LC3A, and LC3B occurs in the safety margin of oral cancer resection that pathologically diagnosed as normal mucosa, there is a possibility that an abnormal autophagy has occurred. In other words, if there is an abnormality in autophagy, there is a risk of cancer recurrence even if the mucosa is histopathologically diagnosed as normal mucosa. In addition, we showed the possibility of clinical application of p62 as a biomarker for the malignant transformation of oral leukoplakia, and if p62 nuclear staining and p62 aggregation are observed, strict follow-up is required. Then, it was clarified that miR-142-5p, which is a cancer-promoting miRNA whose expression level is remarkably increased in oral cancer, is involved in infiltration and proliferation of oral cancer cells.

研究分野：外科系歯科学

キーワード：口腔がん p62 LC3A LC3B 腫瘍周辺正常上皮 miRNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

口腔は常に酸化ストレスに暴露されており、活性酸素種による酸化ストレス状態の悪化による DNA 損傷および転写因子の活性化やサイトカイン等の過剰産生によるアポトーシス誘導によって口内炎が引き起こされている。一方で、生体防御機構であるオートファジーと Keap1-Nrf2 系は、酸化ストレス、代謝ストレス、あるいは細菌感染などに応答して誘導活性化されることで、その危機的状況を乗り越え、細胞の恒常性を維持している。Keap1-Nrf2 系は、転写因子 Nrf2 を制御するシステムである。細胞が通常状態にある時、Nrf2 は Keap1 と結合して、分解の目印となるユビキチン鎖が付加される。ユビキチン鎖で修飾された Nrf2 は細胞内分解装置のプロテアソームで恒常的に壊されるため、その転写活性は抑えられているが、細胞が酸化ストレスに曝されると Keap1 と Nrf2 の結合が弱まり、Nrf2 は安定して細胞核に移行することができるようになり、生体防御に関わる遺伝子群の転写が促進され、細胞は保護されている (*Moll Cell* 51:618-631, 2013)。p62 は、酸化ストレス等により細胞内に生じた異常たんぱく質凝集体、異常ミトコンドリアや細胞内侵入細菌に集積するとリン酸化を受け、その結果 p62 と Keap1 との結合が著しく増強され Keap1 が不活性化し、Nrf2 が活性化する。その後、細胞毒性のある異常たんぱく質凝集体、異常ミトコンドリアや細胞内侵入細菌はオートファジーにより排除される (*Moll Cell* 51:618-631, 2013)。このように、p62 が細胞内に過剰に蓄積すると、抗酸化たんぱく質群の遺伝子発現が誘導されるが、癌細胞でも p62 が過剰に蓄積し、自身を酸化ストレスから守る生存戦略をとっている (*Nat Cell Biol* 12:213-223, 2010)。そして、p62 の肝細胞癌、乳癌等での過剰蓄積については報告されていたが (*Am J Pathol* 159:945-53, 2001、*Oncogene* 22:2322-33, 2003)、最近になり頭頸部癌において p62 の過剰蓄積は放射線治療に対する抵抗性を惹起し、予後を悪化させていることも報告された (*PLoS One* 8:e74398, 2013)。我々の研究室でも、口腔癌における p62 の発現状態を評価したところ、癌組織部では約 8 割の症例で p62 の異常集積が認められたが、その発現状態と予後についての関連性は認められなかった。しかし、癌部分周辺の正常上皮に p62 が発現している症例では、再発と転移例が少なからず存在した。癌に対する外科的切除に際しては、十分な安全域を設けても術後の局所再発・転移を認める症例も存在する。そのような症例では、正常組織と考えられた癌周辺の正常上皮で p62 の異常集積が起こっており、癌細胞の特徴がなくとも、異常たんぱく質凝集体、異常ミトコンドリアや細胞内への細菌侵入などが起こっており、将来的に癌化する可能性があると考えられる。従って、癌周辺の正常上皮での p62 の発現状態と予後との関連性が明らかにできれば、癌の外科的切除における新規マーカーとなり得ること、さらには予後予測マーカーとしても応用できる可能性が考えられた。

2. 研究の目的

口腔癌の外科的切除後の局所再発や転移が起こるメカニズムを酸化ストレス応答に着目して明らかにすることである。癌周辺の正常上皮に着目し、

- (1) 癌周辺の正常上皮で p62 が発現するのはなぜか？
- (2) 癌周辺の正常上皮での p62 の発現状態と予後との関連性があるのか？
- (3) 関連性が確認できれば癌の外科的切除における新規マーカーとなり得るのか？

上記について明らかにすることを目的とした。

さらには、p62 を target とする miRNA の発現動態を評価することで、p62 を介する miRNA の発癌への関与についても明らかにすることを目的とした。

miRNA はゲノムから転写されるが、mRNA のようにたんぱく質に翻訳されることはなく、主に翻訳阻害と mRNA の切断 (分解) というふたつのプロセスで標的となる複数の遺伝子を制御している。さらに、miRNA 調節遺伝子発現は細胞系に保存されており、一般に発癌により制限が解除される。従って、組織内・体液中の miRNA の反応促進や抑制を特定することで、診断に利用することが可能となる特徴がある。miRNA の mRNA への結合にはミスマッチが含まれることや 1 つの miRNA は複数の mRNA の翻訳制御に関与しており、miRNA の標的 mRNA の同定は困難であるが、本研究では、p62 に着目しているため、網羅的な発現解析は必要とならず特定の miRNA での解析を行う事が出来る。

癌周辺の正常上皮での p62 の発現状態と予後との関連性が明らかに出来れば、外科的切除にて腫瘍を取りきれているはずの症例における局所再発の原因を特定でき、p62 が腫瘍の外科的切除における新規マーカーや予後予測マーカーへの応用にも発展しうる将来性を秘めている。口腔は特に酸化ストレスに暴露されやすい臓器であるため、口腔粘膜の癌化へのメカニズムが酸化ストレスによるものであることが解明出来れば、発癌の臓器特異性についての研究基盤の確立へも寄与できる創造性があると考えた。

3. 研究の方法

(1) 71 例の口腔癌患者のホルマリン固定パラフィン包埋組織ブロック標本を試料として、口腔扁平上皮癌切除マージン部分におけるオートファジーおよび酸化ストレス関連たんぱく質 (p62、LC3A、LC3B、p53、 γ H2AX、8-OHdG) の発現を免疫組織染色にて解析し、その臨床病態との関連を検討した。

(2) 50 例の口腔白板症患者のホルマリン固定パラフィン包埋組織ブロック標本を試料として、オートファジーおよび酸化ストレス関連たんぱく質の発現を免疫組織染色にて解析し、その臨

床病態との関連を検討した。

(3) miRNA ターゲット探索データベースより、p62、LC3A、LC3B の遺伝子発現を制御する miRNA として、p62;miR-7-5p、LC3A;miR-140-3p、LC3B;miR212-5p を抽出した。我々が持っている口腔癌に関する miRNA マイクロアレイデータベースと照会した。p62 や LC3A、LC3B はいわゆるがん遺伝子という性質を持つことになるため、がん遺伝子を標的とする miRNA(がん抑制型 miRNA)の発現が低下し、がん遺伝子の発現が増加することで、がん促進的に働くメカニズムを想定していたが、miR-7-5p はがん抑制遺伝子の発現を制御するがん促進型 miRNA として同定された。また、miR-140-3p、miR212-5p もがん抑制型 miRNA として同定されなかった。そこで、我々の miRNA マイクロアレイデータベースより、口腔癌において著明に発現量が亢進しているがん促進型 miRNA である miR-142-5p についての発現および機能解析を行った。

4. 研究成果

(1) オートファジー関連たんぱく質である p62、LC3A、LC3B の発現は、いずれも口腔癌の局所再発の有無との間に有意差を認めた。一方で腫瘍関連死については、LC3A および LC3B の発現との間には有意差を認めたが、p62 との間には有意差が認められなかった(表1)。p62 は細胞内に発生した異常たんぱく質に対し、ユビキチンたんぱく質を介して結合し、さらに LC3A および LC3B と結合することでオートファジーの一部である選択的オートファジーが進行し、異常たんぱく質が分解されると報告されている。この際 p62 および多くの LC3A、LC3B も分解されるが、何らかの原因で選択的オートファジーが停滞すると分解されず蓄積する。つまり p62 や LC3A、LC3B が蓄積している状態は、オートファジーの異常を意味する可能性があると考えられた。口腔癌の局所再発が発生した場合、病理学的に正常と診断された正常粘膜上皮にもオートファジー異常が発生している可能性が高いことを明らかにした。また腫瘍関連死については、選択的オートファジーに特異的なたんぱく質である LC3A、LC3B の発現との間に有意差を認めたが、多機能のたんぱく質である p62 の発現との間には優位差を認めなかったことから、特に選択的オートファジーの異常が予後不良に導いている可能性が示唆された。従って、「口腔癌の外科的切除における新規マーカーとなり得るか」の問いに関して、前向き観察研究そして臨床研究を計画するのに役立つ基礎的な研究結果を得ることが出来た。

表1. 疾患特異的生存率の単変量コックス比例ハザード分析

Variable	HR	95% CI	P value
LC3A expression Positive vs negative	10.86	2.24-94.9	0.001
LC3B expression Positive vs negative	1.78	1.10-3.17	0.042
p62 expression Positive vs negative	2.31	0.93-6.21	0.072

(2) 口腔白板症患者のうち、上皮異型を有するものは18例であり、上皮異型と臨床項目の関連性を評価した。口腔白板症において、上皮異型を認める部位は舌が有意に多いこと、上皮異型部位には p62 の核局在が有意に多いことを明らかにした。また、8-OHdG の染色状態から、口腔白板症組織には広範囲に酸化ストレスが存在していることが示唆された。多変量名義ロジスティック回帰分析にて、上皮異型と p62 の核局在性、p62 凝集との関連性も確認された(表2)。p62 核局在性と p53 の有意な関連性が示されたが、その他の p62 関連マーカーと 8-OHdG、Ki-67、p53 の関連性に有意差は認められなかった。p62 の異常な蓄積を介したシグナル制御は、がんの形成や増殖を促進するため、口腔白板症の悪性化においても同様の機序が考えられる。口腔白板症を外科的に摘出した場合の病理組織標本にて、p62 核染色と p62 凝集が認められた場合には、今後再発や口腔癌発癌の可能性が考えられるため、厳密な経過観察を必要とする知見が得られたと共に、口腔白板症の悪性化に関するバイオマーカーとして、p62 の臨床的実用化の可能性を示すことが出来た。

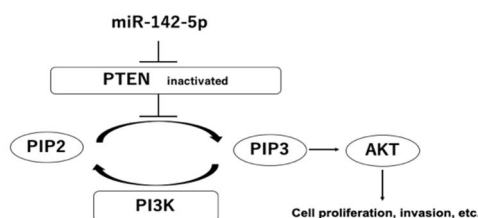
表2. 口腔白板症における上皮異型と各バイオマーカーのロジスティック回帰分析

Parameter	Odds ratio	95% CI	P value
Univariate logistic regression analysis			
p62 in nucleus	3.46	[1.02, 11.56]	.044*
p62 aggregation	3.47	[0.96, 12.54]	.058
p62 in cytoplasm	1.22	[0.38, 3.97]	.738
8-OHdG	2.72	[0.73, 10.11]	.135
Ki67	1.24	[0.30, 5.13]	.769
p53	1.76	[0.53, 5.87]	.354
Multivariate logistic regression analysis			
p62 in nucleus	5.75	[1.26, 26.19]	.024*
p62 aggregation	6.16	[1.01, 37.42]	.048*
p62 in cytoplasm	1.90	[0.42, 8.62]	.403
8-OHdG	5.31	[0.96, 29.46]	.056
Ki67	1.46	[0.27, 7.76]	.658
p53	2.35	[0.57, 9.76]	.240

*P < 0.05 significant.

(3) 口腔扁平上皮癌由来細胞株を用いた機能解析で浸潤能および増殖能が有意に亢進し、miR-142-5p が発現制御をしているがん抑制遺伝子 PTEN の発現量も減弱することが確認された。miR-142-5p は口腔癌において、がん促進型 miRNA として働き、がん細胞の浸潤・増殖に関与していることが示唆された。本研究で、口腔癌において p62 を介する miRNA の発癌への関与について明らかにすることはできなかったが、口腔癌における新規がん促進型 miRNA として、miR-142-5p を同定し、その機能について明

図1. miR-142-5p の PTEN/PI3K Pathway の作用機序



らかにすることが出来た。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Toshio Yoshida, Takehito Terabe, Hiroki Nagai, Fumihiko Uchida, Shogo Hasegawa, Toru Nagao, Satoru Miyabe, Naomi Ishibashi-Kanno, Kenji Yamagata, Eiji Warabi, Masahiko Goshu, Toru Yanagawa, Hiroki Bukawa	4. 巻 5(4)
2. 論文標題 Association between p62 expression and clinicopathological characteristics in oral leukoplakia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clin Exp Dent Res.	6. 最初と最後の頁 389-397
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cre2.193.	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 該当する

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

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