

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K19202

研究課題名(和文) 口腔扁平上皮癌の悪性度に関わるバイオマーカーとしてのWnt5a/Ror2の有用性

研究課題名(英文) Usefulness of Wnt5a and Ror2 as the biomarkers related to malignancy in oral squamous cell carcinoma

研究代表者

坂本 泰基 (Sakamoto, Taiki)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：10805261

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)：本研究では、口腔扁平上皮癌(OSCC)の転移プロセスへのWnt5a-Ror2シグナル経路の関与について検討を進め、OSCCの診断・治療における新規バイオマーカーの確立を目的として研究を行った。その結果、Wnt-カテニン経路のアンタゴニストであるDickkopf(Dkk)ファミリーであり、乳癌などでは癌抑制遺伝子としての機能が報告されているDkk1とDkk3が、Wnt5a-Ror2シグナル経路によるOSCCの悪性度の進展へ関与していることが示唆された。これは、Wnt5a-Ror2シグナル経路とDkkとの関連を示す新知見であり、経路の解明から新規バイオマーカー確立の基盤となり得る研究成果である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

OSCCの治療成績は伸び悩んでいるのが現状であり、その診断・治療に関わる有用なバイオマーカーの確立が望まれている。OSCCの治療を困難にしている最大の要因である転移のプロセスに関与する分子機構を解明することが新規バイオマーカーの確立へつなげると考えられる。本研究では、OSCCの悪性度の進展にWnt5a-Ror2シグナル経路とDkk1・Dkk3が共役して機能していることが示唆され、転移プロセスの解明の一歩となり、新規バイオマーカー確立の基盤となり得るといふ社会的意義を持つ。また、Wnt5a-Ror2シグナル経路とDkkが関与しているという新知見を示すものであり、学術的意義も大きいと考える。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the roles of Wnt5a-Ror2 signaling in the metastasis of oral squamous cell carcinoma (OSCC) to establish the novel biomarkers in the diagnosis and treatment of OSCC. The results suggest that Dkk1 and Dkk3, which are antagonists of Wnt/-catenin signaling and act as tumor suppressor genes in breast cancer, are involved in the malignancy of OSCC through Wnt5a-Ror2 signaling. This is a new finding that shows the relationship between Wnt5a-Ror2 signaling and Dkk, and it can be a foundation for the establishment of the novel biomarkers.

研究分野：口腔外科

キーワード：口腔扁平上皮癌(OSCC) 転移 Wnt5a Ror2 Dkk1 Dkk3 バイオマーカー

## 1. 研究開始当初の背景

がんは、現在も日本における死亡原因の第1位であり、生存率向上のための研究が日々行われている。癌治療において、近年の診断技術の進歩により早期発見が可能となっており、また、新規の分子標的治療薬や免疫チェックポイント阻害薬等の開発により治療成績は徐々に向上している。しかし、口腔扁平上皮癌 (OSCC) を含む頭頸部領域の癌においては、他の臓器の癌と比較して新規治療薬の適応承認が遅れており、治療成績も伸び悩んでいるのが現状である。特に、OSCC においては、**有用なバイオマーカーが確立されていないことが、治療成績の向上を困難と**している一因と考えられ、**早急な対応が望まれている**。OSCC の診断・治療に関わるバイオマーカーを確立するためには、その治療を困難にしている最大の要因と思われる**転移のプロセスにどのような分子機構が関与しているかを解明することが重要な課題である**。

OSCC は、局所浸潤傾向が強く、周囲血管やリンパ管へ侵入し、所属リンパ節である頸部リンパ節への転移や肺などへの遠隔転移を生じやすく、転移を伴う場合にはその生存率は著しく低下する。そのため、**転移の制御が OSCC 患者の生存率の向上に必要不可欠であり、OSCC の浸潤・転移のメカニズムを解明することが、OSCC の診断・治療に関わる新たなバイオマーカーの確立へとつながり、治療成績向上に寄与すると考える**。

近年、癌の浸潤および転移には、**上皮細胞が間葉系細胞のような形質を獲得する、上皮-間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition: EMT) が関与していることが明らか**となってきた。これまでにわれわれは、Np63 のスプライシングバリエーションの1つである **Np63** の発現減弱が EMT を誘導し、OSCC の浸潤・遊走を亢進することを示してきた。しかし、その詳細な分子機構は不明であったため、申請者は Np63 の下流で浸潤・遊走に関与する遺伝子を同定するために、Np63 の発現をほとんど認めない高転移 OSCC 細胞株 (SQUU-B) に Np63 を過剰発現させた細胞株 (SQUU-B0) およびそのコントロールとして空ベクターを導入した細胞株 (SQUU-BC) を用い、DNA マイクロアレイ解析を行った。その結果、発現変動率が有意に高かった Wnt5a をその候補遺伝子として同定した。Wnt5a は、乳癌などにおいて発現が認められ、その受容体である Ror2 を介して浸潤・遊走に関与することが示唆されているが、詳細は明らかではない。申請者は、OSCC の浸潤・遊走における Wnt5a-Ror2 シグナル経路の関与について研究を行ってきた。その結果、Wnt5a および Ror2 の発現はともに、いくつかの OSCC 細胞株の中で、SQUU-B 細胞において最も強く、Np63 過剰発現により Wnt5a および Ror2 の発現は減弱し、逆に Np63 ノックダウンによりこれらの発現は亢進した。さらに、EMT との関連を検討するために、SQUU-B 細胞において Wnt5a または Ror2 のノックダウンを行ったが、ほとんどの EMT 関連遺伝子は発現変動を認めなかった。また、wound healing assay および Matrigel™ invasion assay を用いて浸潤能および遊走能について検討を行ったところ、Wnt5a または Ror2 ノックダウンにより遊走能および浸潤能の有意な低下を認めた。さらに、浸潤・遊走に関連する分子として、細胞外基質の分解に関与する matrix metalloproteinase (MMP) の発現を検索したところ、MMP-2 の発現が SQUU-B 細胞で最も強く、その発現は Np63 過剰発現および Wnt5a または Ror2 ノックダウンで減弱し、Np63 ノックダウンで亢進した。また、Wnt5a および Ror2 の発現を免疫組織化学的に検索したところ、隣接口腔粘膜上皮と比較して、Wnt5a および Ror2 とともに OSCC 組織で高発現していた。一方、OSCC 組織での Wnt5a および Ror2 の陽性細胞率は症例によって様々であり、Wnt5a または Ror2 が高発現している群は、低発現群と比較して有意に悪性度が高かった。

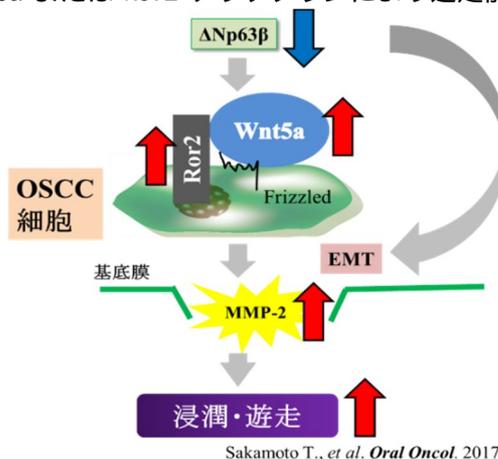


図1 OSCCにおけるWnt5a-Ror2シグナル経路の機能

以上の結果より、**Np63** の発現減弱は EMT を誘導する一方で、Wnt5a-Ror2 シグナル経路を介して MMP-2 を活性化し、OSCC の浸潤・遊走を亢進することが明らかとなった (図1)。また、**Wnt5a および Ror2 の発現は OSCC の悪性度と関連していることが示唆されたため、さらなる研究・解析を行うことで、OSCC の悪性度を示す新規バイオマーカーとして確立できるのではないかと考えた**。

## 2. 研究の目的

本研究は、これまでの研究成果および臨床経験をもとに着想したもので、OSCC の治療における予後不良因子である「浸潤」および「転移」のメカニズムを解明していく上で、OSCC への関与がほとんど研究されていない Wnt5a および Ror2 に着目して、そのシグナル経路に関連する分子を同定する。さらに、Wnt5a、Ror2 および関連分子の OSCC における詳細な機能を解明すること

で、未だ確立されたバイオマーカーが存在しない OSCC における診断・治療のための新規バイオマーカーを確立することを最終的な目的とし、その基盤となる研究を行う。

### 3. 研究の方法

#### 口腔扁平上皮癌細胞株における Wnt5a-Ror2 シグナル経路に関連する分子の検索

これまでの研究で、Wnt5a-Ror2 シグナル経路において、MMP-2 の活性化が浸潤に關与することを明らかにしたが、そのシグナル経路のさらに詳細なメカニズムを解明することで、OSCC の浸潤・転移プロセスを明らかにする。

5 種類の OSCC 細胞株 (HSC-2、HSC-3、SQUU-A、SQUU-B、SAS) およびヒト正常角化上皮細胞株 (HaCaT) (図 2) を用いて、Wnt5a-Ror2 シグナル経路で機能していると報告されている分子 (図 3) および Wnt- カテニン経路のアンタゴニストとして報告されている Dkk と sFRP (図 4) の発現を RT-PCR 法および real-time PCR 法にて検索した。

細胞株	由来組織	転移能	細胞形態
HSC-2	口底 SCC 転移巣	—	多角形
HSC-3	舌 SCC 転移巣	低転移	多角形
SQUU-A	舌 SCC 再発巣	低転移	多角形
SQUU-B	舌 SCC 再発巣	高転移	紡錘形
SAS	舌 SCC 原発巣	±	多角形
HaCaT	ヒト正常角化上皮	—	多角形

図 2 使用した細胞株

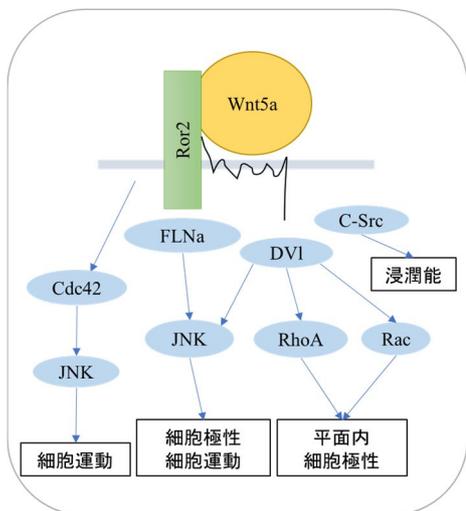


図 3 Wnt5a-Ror2 シグナル経路

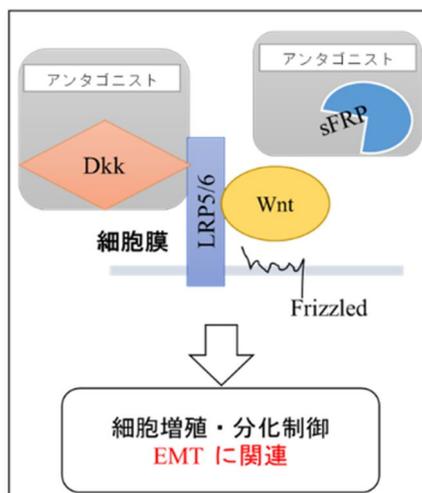


図 4 Wnt- カテニン経路のアンタゴニスト

#### OSCC 組織における Wnt5a、Ror2 および で同定した分子の発現検索と臨床病理組織学的所見との関連

OSCC の生検組織および原発巣組織を用いて、Wnt5a、Ror2 および で同定した分子の発現局在を免疫組織化学的染色法にて検索する。また、それぞれの陽性細胞率を算出し、臨床病期、臨床発育様式、分化度、浸潤様式、頸部リンパ節転移・遠隔転移の有無との関連について臨床病理組織学的に解析する。

### 4. 研究成果

#### -1 OSCC 細胞株における Wnt5a、Ror2 および Wnt5a-Ror2 シグナル経路関連分子の発現

Wnt5a と Ror2 は高転移株 SQUU-B 細胞において強く発現しているのに対し、Wnt5a-Ror2 シグナル経路に関連していると報告のある分子はいずれも各細胞間での発現に差は認められなかった (図 5)。

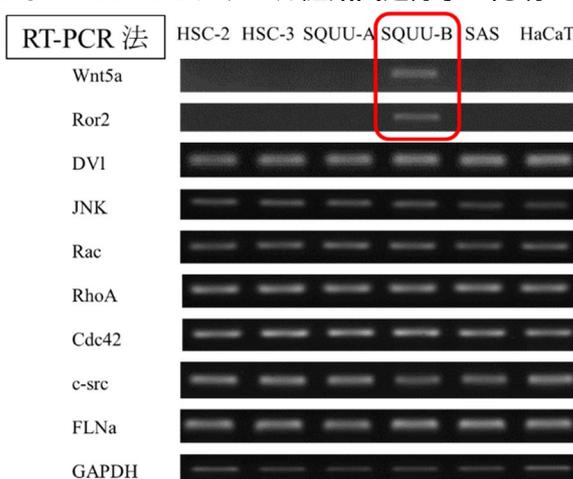


図 5 Wnt5a-Ror2 シグナル経路関連分子の発現

-2 OSCC 細胞株における Wnt5a、Ror2 および Wnt- カテニン経路のアンタゴニストの発現  
 Wnt5a と Ror2 は高転移株 SQUU-B 細胞において強く発現しているのに対し、アンタゴニストのうち Dkk1 と Dkk3 が SQUU-B 細胞においてほとんど発現していなかった (図 6)。

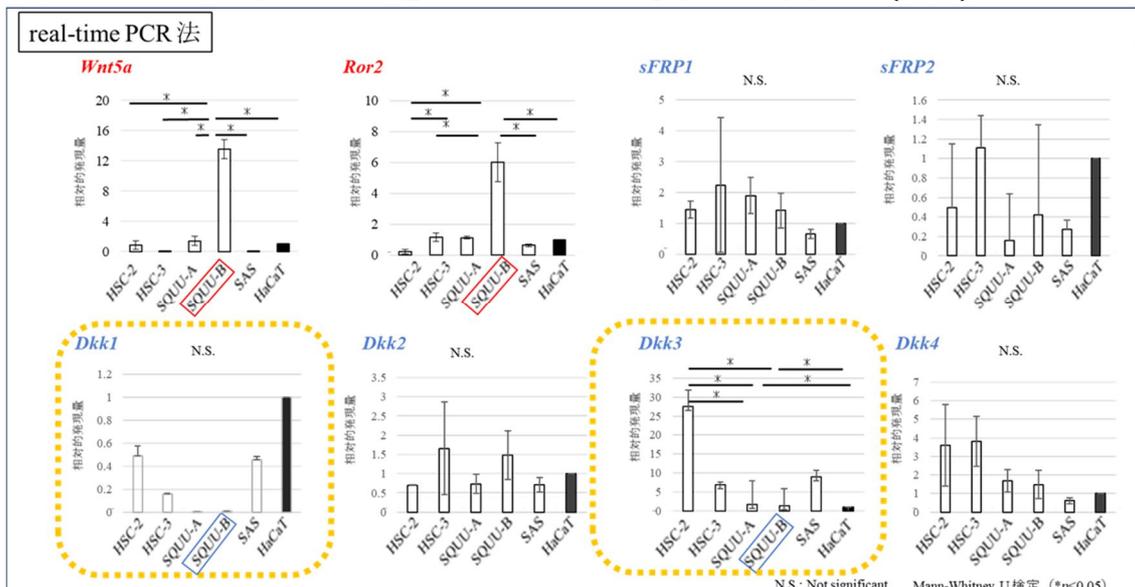


図 6 Wnt- カテニン経路のアンタゴニストの発現

Dkk1 および Dkk3 は、Wnt- カテニン経路にてアンタゴニストとして機能する分泌型糖タンパク質である Dickkopf (Dkk) ファミリーの一員であり、乳癌などでは癌抑制遺伝子としての機能が報告されている。しかし、OSCC における詳細な機能や Wnt5a-Ror2 シグナル経路への関与の報告はない。本研究の real-time PCR の結果より、OSCC において Dkk1 および Dkk3 が Wnt5a-Ror2 シグナル経路にも抑制的に働く可能性が考えられたため、OSCC 組織での発現を検索することとした。

### OSCC 組織における Wnt5a、Ror2、Dkk1 および Dkk3 の発現様式と臨床病理組織学的所見との関連

隣接口腔粘膜上皮において、Wnt5a、Ror2、Dkk1 および Dkk3 はほとんど発現を認めなかった (図 7)。一方、OSCC において、Wnt5a、Ror2、Dkk1 および Dkk3 は強く発現していた (図 8)。

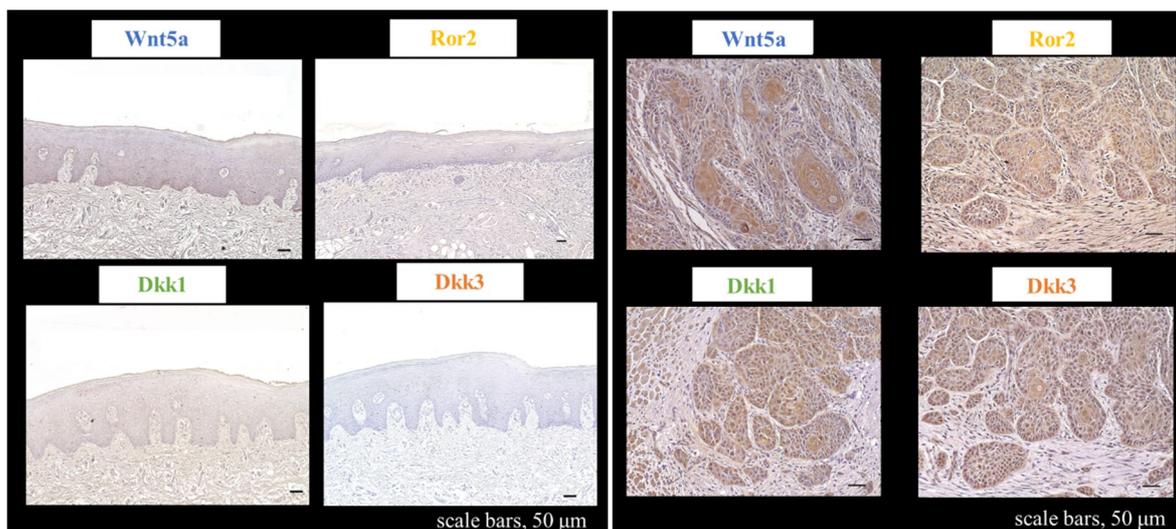


図 7 隣接口腔粘膜上皮における発現

図 8 OSCC 組織における発現

しかし、陽性細胞率は症例によって様々であった。そこで、それぞれの分子の陽性細胞率のカットオフ値を受信者動作特性曲線 (ROC 曲線) によって算出し、高発現群と低発現群に分けて臨床病理組織学的所見との関連を検討した。その結果、Wnt5a 高発現群では局所再発の発生頻度が有意に高く、Ror2、Dkk1 および Dkk3 高発現群では頸部リンパ節転移の発生頻度が有意に高かった。この結果から、Dkk1 および Dkk3 は OSCC においては悪性度を亢進させる働きがあることが

示唆された。

また、Wnt5a と Dkk1 がともに高発現している群は局所再発と頸部リンパ節転移の発生頻度が有意に高いことがわかった。さらに、Ror2 と Dkk1 がともに高発現している群は頸部リンパ節転移の発生頻度が有意に高く、Ror2 と Dkk3 がともに高発現している群は頸部リンパ節転移と遠隔転移の発生頻度が有意に高かった。これらの結果から、OSCC において Dkk1 および Dkk3 は Wnt5a-Ror2 シグナル経路に対して抑制的ではなく、共役して悪性度の亢進に関わっている可能性が考えられた。

現状では、Dkk1 と Dkk3 の OSCC における機能としては、細胞での研究結果と組織での研究結果では相反する結果となっているが、今後も細胞および動物における研究を進めることで Dkk1 と Dkk3 の詳細な機能が明らかとなり、それが OSCC の浸潤・転移における Wnt5a-Ror2 シグナル経路の詳細なメカニズムの解明へとつながり、OSCC の新規バイオマーカーの確立に貢献できるものと考ええる。

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 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shoichi Tanaka, Shintaro Kawano, Taichi Hattori, Ryota Matsubara, Taiki Sakamoto, Yuma Hashiguchi, Naoki Kaneko, Yurie Mikami, Masahiko Morioka, Yasuyuki Maruse, Ryoji Kitamura, Eiki Hamada, Megumi Hiwatashi, Kazunari Oobu, Tamotsu Kiyoshima, Seiji Nakamura	4. 巻 32
2. 論文標題 Cytokeratin 19 as a marker of highly invasive oral squamous cell carcinoma with metastatic potential	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajoms.2019.10.007	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7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 濱田栄樹・坂本泰基・川野真太郎・丸瀬靖之・橋口有真・服部多市・田中翔一・白石由梨香・樋渡萌美・大部一成・中村誠司
2. 発表標題 Refeeding syndrome を疑った口底癌術後患者の 1 例
3. 学会等名 第88回日本口腔外科学会九州支部学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shoichi Tanaka, Shintaro Kawano, Taichi Hattori, Taiki Sakamoto, Yuma Hashiguchi, Naoki Kaneko, Yurie Mikami, Masahiko Morioka, Yasuyuki Maruse, Ryoji Kitamura, Eiki Hamada, Megumi Hiwatashi, Kazunari Oobu, Tamotsu Kiyoshima, and Seiji Nakamura
2. 発表標題 Involvement of increased cytokeratin 19 expression via down-regulation of Np63 in invasion and metastasis of oral squamous cell carcinoma
3. 学会等名 7thWorld Congress of the International Academy of Oral Oncology (IAOO) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中翔一・川野真太郎・服部多市・坂本泰基・金子直樹・橋口有真・大部一成・中村誠司
2. 発表標題 cytokeratin 19の発現亢進が口腔扁平上皮癌の浸潤・遊走能に与える影響 Np63との関わりについて
3. 学会等名 第29回 日本口腔内科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中翔一・川野真太郎・坂本泰基・金子直樹・橋口有真・森岡政彦・服部多市・濱田栄樹・大部一成・中村誠司
2. 発表標題 高浸潤性口腔扁平上皮癌マーカーとしてのcytokeratin 19の有用性
3. 学会等名 第64回（公社）日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 樋渡 萌美・坂本 泰基・川野 真太郎・丸瀬 靖之・金子 直樹・橋口 有真・服部 多市・田中 翔一・濱田 栄樹・白石 由梨香・大部 一成・中村 誠司
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌におけるDkk1およびDkk3の発現に関する研究 ~Wnt5a-Ror2シグナル経路との関連について~
3. 学会等名 第40回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坂本 泰基・川野 真太郎・内田 千裕・金子 直樹・中村 誠司
2. 発表標題 下顎神経支配領域の知覚鈍麻を契機に発見された多発性脳静脈性血管奇形の1例
3. 学会等名 第66回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮原 佑佳・坂本 泰基・森山 雅文・鮎田 亜実・鎮守 晃・中村 誠司
2. 発表標題 自己免疫性後天性凝固第XIII因子欠乏症（AiF13D）患者の抜歯経験
3. 学会等名 第66回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2021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
---------	---------