

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20791530

研究課題名（和文） 口腔自己免疫疾患発症における樹状細胞の役割に関する研究

研究課題名（英文） Study on the role of dendritic cells in oral autoimmune diseases

研究代表者

梯 裕恵（かけはし ひろえ）

九州大学病院・顎口腔外科・医員

研究者番号：30452775

研究成果の概要（和文）：

本研究では正常口腔粘膜の上皮幹細胞マーカーである Δ Np63 に着目し、口腔扁平上皮癌(OSCC)の発生や分化および増殖にどのように関与しているかについて検討を行い、さらに、樹状細胞を用いた免疫療法につながるターゲットをしぼるための研究を進めてきた。結果、上皮性異形成の程度が重度になるにつれ、 Δ Np63 の発現が高くなっていたこと、またその発現が高い上皮性異形成は OSCC へと癌化しやすいことから、 Δ Np63 の発現が OSCC の発生に関与していることが示唆された。また、 Δ Np63 は OSCC 細胞における分化および増殖に関与していると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

For target lead to immunotherapy using dendritic cells, or how to get involved in the occurrence of oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC), differentiation and proliferation, recognizing Δ Np63 normal oral mucosa epithelial stem cell markers in the research and study, the research has been conducted. As a result, heavy degree of epithelial dysplasia suggested that from easy-to-cancer by OSCC to Δ Np63 appearance are involved in the occurrence of OSCC are higher degrees as the expression of Δ Np63 higher was also the expression of epithelial dysplasia. In addition, was considered Δ Np63 is involved in OSCC cell differentiation and proliferation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,100,000	0	1,100,000
2009年度	1,100,000	0	1,100,000
2010年度	1,000,000	0	1,000,000
年度			
年度			
総計	3,200,000		3,200,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：(1) 樹状細胞 (2) 自己免疫疾患 (3) 扁平苔癬 (4) シェーグレン症候群
(5) 白板症 (6) 扁平上皮癌 (7) 免疫療法 (8) 癌幹細胞

1. 研究開始当初の背景

近年、癌は initiation (起始)、promotion (促進)、progression (進行) という過程を経て、長期間かけて遺伝子変異が蓄積され、徐々に癌化が

進んでいく多段階発癌説 (multi step carcinogenesis) に基づいて発生すると考えられている。組織幹細胞は自己複製能を有するため、生体内に長期間存在し、遺伝子変異が多段階的に

蓄積していく可能性がある。そのため、組織幹細胞は多段階発癌説における標的細胞として注目すべき細胞であると考えられる。

さて、口腔扁平上皮癌の前癌病変であると考えられている口腔白板症は、その癌化率が約10%前後である。口腔白板症は上皮内に様々な程度の異形成が認められるものもあり、WHO分類では基底層が数層にわたって肥厚するほど異形成が強く、癌化する可能性が高いとされている。この「基底層の肥厚」という現象が組織幹細胞である上皮幹細胞の維持や分化の制御機構に何らかのシステム障害が生じ、分化の方向が決定されず、基底層の細胞が増殖したものの結果であると考えられ、さらに、分化制御機構の破綻が生じると細胞は癌化し、基底膜を破壊して浸潤すると推測される。この分子メカニズムについては以前より p53 の発現および機能を中心に研究が行われてきたが、いまだ明らかにされていない。近年、p53 の homologue である p63 が正常皮膚や消化管粘膜の基底細胞層に発現しており、上皮幹細胞の維持、分化の制御に深く関与している可能性が示唆されている。

2. 研究の目的

本研究では、前癌病変である口腔白板症における p63 の発現様式を検索するとともに、口腔扁平上皮癌における p63 の機能について検討し、癌形成メカニズムについて解析を行っている。

3. 研究の方法

(1) 正常口腔粘膜上皮から口腔白板症への移行過程における分子機構の解析

口腔白板症患者の生検材料における p63 の発現を検索した。また、細胞増殖活性マーカーである Ki-67、上皮基底細胞マーカーである cytokeratin (CK) 5 および CK14 についても同様に検索した。検索方法として免疫組織化学染色法を用いた。

(2) 口腔白板症から口腔扁平上皮癌への移行過程における分子機構の解析

口腔白板症から口腔扁平上皮癌患者の生検材料における p63 の発現を検索した。また、Ki-67、CK14 および CK5 についても同様に検索した。検索方法としては、上記と同じく免疫組織化学染色法を用いた。

(3) 口腔扁平上皮癌細胞株における細胞生物学的解析

① 口腔扁平上皮癌細胞株における p63 の発現解析

口腔扁平上皮癌細胞株 (HSC-2、HSC-3、SQUU-A、SQUU-B、SAS) における p63、CK5 および CK14 の発現を RT-PCR 法、Real-time PCR 法および Western Blot 法を用いて検索した。

② 口腔扁平上皮癌細胞株への siRNA 導入による p63 ノックダウン

口腔扁平上皮癌細胞株においてリポフェクション法による p63 siRNA 導入を行い、以下について検索した。

各種分子マーカーの発現の検索

p75NTR : 上皮幹細胞マーカー

BMI-1、OCT3/4 : stemness gene

CD44 : 頭頸部扁平上皮癌の幹細胞表面マーカー

p27b^{kip1} : cyclin dependent kinase (CDK) inhibitor

細胞増殖活性の検索

WST-1 assay および BrdU incorporation assay

4. 研究成果

(1) 正常口腔粘膜上皮から口腔白板症への移行過程における分子機構の解析

正常口腔上皮において p63 は基底層および傍基底層に発現が認められた。また、口腔白板症において p63 は mild dysplasia では未分化である上皮基底層より 2、3 層に局限して発現が認められたが、上皮異形成が重度になるにつれ、上皮のほぼ全層にわたり発現を認め、その陽性率は Ki-67 陽性率と同様、有意に上昇していた。CK5、CK14 においては p63 と同様の発現パターンを呈していた。

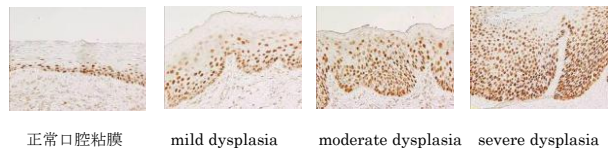


Fig. 1 正常口腔上皮および口腔白板症における p63 の発現 (免疫組織化学染色 : ABC 法)

(2) 口腔白板症から口腔扁平上皮癌への移行過程における分子機構の解析

口腔扁平上皮癌においては、高分化型では癌細胞の最外層から 2、3 層に局限して発現が認められたが、中～低分化型ではほぼすべての癌細胞に発現が認められた (Fig. 2)。また、その陽性率は Ki-67 陽性率と同様、低分化なものほど有意に上昇しており (Fig. 3)、CK5 および CK14 も同様の発現パターンを呈していた。

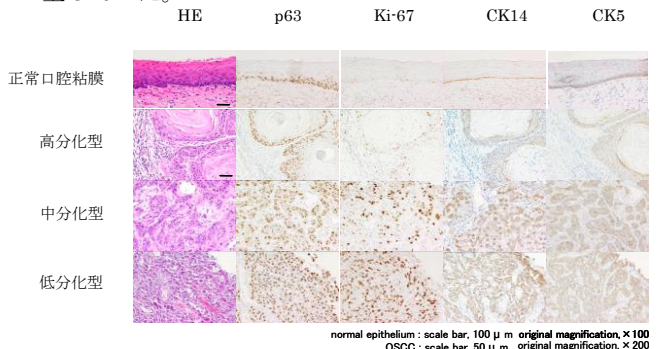


Fig. 2 正常口腔粘膜上皮および OSCC における免疫組織化学染色

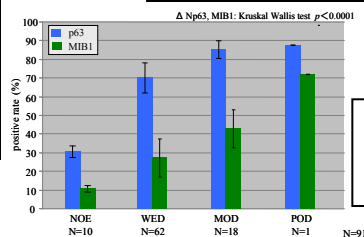


Fig. 3 正常口腔粘膜上皮および OSCC における p63 および Ki-67 陽性率と分

(3) 口腔扁平上皮癌細胞株における細胞生物学的解析
 全ての口腔扁平上皮癌細胞株において p63 の発現が認められた (Fig. 4)。また発現量の高かった HSC-2 細胞に siRNA 導入を行い、p63 をノックダウンさせると CK14、p75NTR、BMI-1、CD44 の発現量が有意に減少した (Fig. 5, 6)。

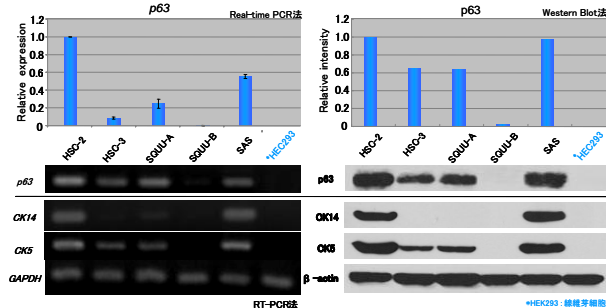


Fig. 4 OSCC細胞株における ΔNp63、CK14、CK5の発現

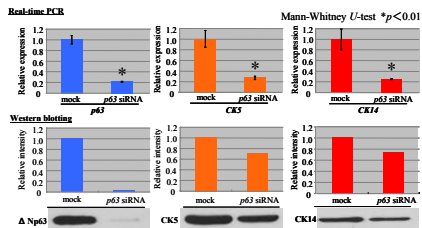


Fig. 5 siRNA導入によるp63ノックダウン細胞のCK5、CK14の相対的発現量

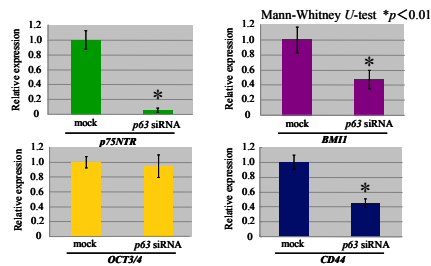


Fig. 6 siRNA導入によるp63ノックダウン細胞のp75NTR、BMI1、OCT3/4、CD44の相対的発現量

さらに p63 siRNA 導入群では WST-1 assay、BrdU incorporation assay において細胞増殖が抑制され、CDK inhibitor である p27^{kip1} の発現量は有意に増加していた (Fig. 7, 8)。

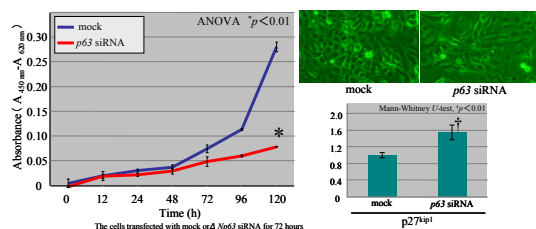


Fig. 7 WST-1 assay による細胞増殖活性の解析および p27^{kip1} の発現量

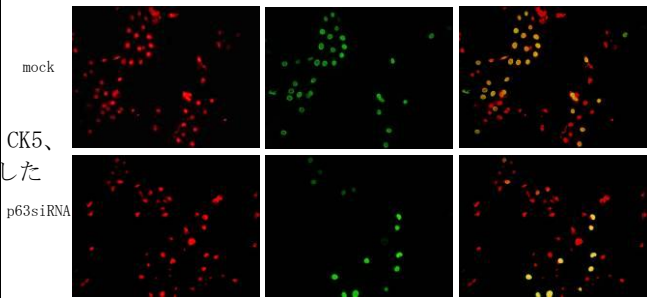


Fig. 8 BrdU incorporation assay による細胞増殖活性の解析

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 0 件)

[学会発表] (計 5 件)

- ① Ryota MATSUBARA, Shintaro KAWANO, Hiroe KAKEHASHI, Seiji NAKAMURA *et al.*

Possible involvement of ΔNp63 in proliferation and differentiation of OSCC.

10th Congress of the European Association of Oral Medicine incorporating the World Workshop on Oral Medicine (London, England), 21st -25th September, 2010

- ② Takahiro KIYOSUE, Shintaro KAWANO, Hiroe KAKEHASHI, Seiji NAKAMURA *et al.*

Immunohistochemical localization of p75NTR in oral leukoplakia and OSCC.

10th Congress of the European Association of Oral Medicine incorporating the World Workshop on Oral Medicine (London, England), 21st -25th September, 2010

- ③ 松原良太、川野真太郎、梯 裕恵、中村誠司ら

口腔扁平上皮癌における上皮幹細胞マーカー (p63、p75NTR) に関する研究

第 54 回 日本口腔外科学会総会・学術大会、(北海道)、2009 年 10 月 9 - 11 日

④ 松原良太、川野真太郎、梯 裕恵、
中村誠司ら

口腔扁平上皮癌における Δ Np63 の発現
と機能

第 64 回 日本口腔科学会総会・学術大会 (北海道)、2010 年 6 月 24 - 25 日

⑤ 松原良太、川野真太郎、梯 裕恵、
中村誠司ら

口腔扁平上皮癌における Δ Np63 の発現
と機能

第 55 回 日本口腔外科学会総会・学術大会 (千葉)、2010 年 10 月 16 - 18 日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梯 裕恵 (KAKEHASHI HIROE)
九州大学病院・顎口腔外科・医員
研究者番号：30452775

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

川野真太郎 (KAWANO SHINTARO)
九州大学病院・顎口腔外科・助教
研究者番号：00398067