

機関番号：17102

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20791531

研究課題名 (和文) p63 と Notch シグナル伝達系を介した口腔白板症の癌化に関する研究

研究課題名 (英文) Study on the mechanism of malignant transformation of oral leukoplakia mediated by p63 and Notch signaling pathway

## 研究代表者

川野 真太郎 (KAWANO SHINTARO)

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：00398967

研究成果の概要 (和文)：本研究は前癌病変である口腔白板症 (OL) が癌化する分子メカニズムを解明するために、p63 と Notch シグナル伝達系のクロストークに着目し、研究を行った。OL の上皮性異形成の程度が重度になるにつれて口腔粘膜上皮における p63 の陽性率は有意に高く、逆に Notch1 の発現率は低くなっていた。また、口腔白板症の癌化群は、非癌化群に比べ有意に p63 の陽性率が高かった。さらに、口腔癌細胞株を用いた実験では、p63 は癌細胞の増殖、分化に関与していた。

研究成果の概要 (英文)：This study was addressed to reveal the molecular mechanisms of malignant transformation of oral leukoplakia (OL) into squamous cell carcinoma (OSCC). In the OL, LI of p63 increased significantly according to the severity of epithelial dysplasia, though that of Notch1 decreased. p63-LI in the OL with malignant transformation was significantly higher than that in the OL without. In the OSCC, these LIs increased significantly in association with the histologic grade. Increased  $\Delta Np63$  expression was possibly involved in malignant transformation in epithelial dysplasia and proliferation and differentiation of OSCC.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：口腔外科学

科研費の分科・細目：外科系歯学

キーワード：口腔扁平上皮癌、癌化、白板症、p63、Notch シグナル

## 1. 研究開始当初の背景

口腔白板症は臨床的および病理組織学的に口腔扁平上皮癌の前癌病変と考えられており、その癌化率は 10% 前後である。口腔白板症の病理組織標本を観察すると、上皮内に様々な程度の異形成が認められ、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。本来、粘

膜基底層には組織型幹細胞である粘膜上皮幹細胞が存在しており、この『基底層の肥厚』という現象は粘膜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、分化の方向性が決定されず基底層の細胞が増殖したものと考えられる。しかしながら、この分子メカニズムについては、以前よりゲノムの守護神である p53 の発現および機能を中心に国内・国外の研

研究者が精力的に研究を行ってきたが、いまだ明らかにはされていない。最近の研究では、p53ファミリーである p63 が正常皮膚の基底細胞に発現しており、皮膚の上皮幹細胞の維持や分化の制御をしている可能性が示唆されている。また、p63 の生理的機能は不明であるが、転写因子として考えられており、Notch シグナル伝達関連遺伝子はそのターゲット遺伝子である可能性も示唆されている。すなわち、口腔粘膜上皮において、p63 と Notch シグナル伝達系のクロストークにより口腔粘膜上皮幹細胞の維持、分化の制御がなされている可能性が大きい。そこで、本研究は口腔粘膜の異形成をきたす分子メカニズムを解明するために、p63 と Notch シグナル伝達系のクロストークに着目し、研究を行う予定である。

## 2. 研究の目的

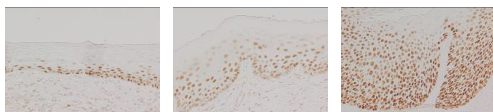
本研究の全体構想としては、正常口腔粘膜上皮から前癌病変である口腔白板症、さらに口腔扁平上皮癌へと移行する分子メカニズムについて解明するとともに、その調節機構を十分に理解し、その上で有効な治療法を確立することを目的とする。

## 3. 研究の方法

当科を受診した口腔白板症患者 112 例、口腔扁平上皮癌患者 81 例の生検材料を用いて、p63 および Notch シグナル関連分子の局在を免疫組織学的に検索した。また、口腔扁平上皮癌細胞株における p63 および Notch シグナル関連遺伝子の発現を RT-PCR 法にて検索した。さらに、p63 siRNA、Notch1 siRNA 導入がこれらの細胞株の増殖や分化に及ぼす影響について検討を行った。

## 4. 研究成果

### 1) 口腔白板症における p63 および Notch1 の局在 (免疫組織化学染色法)



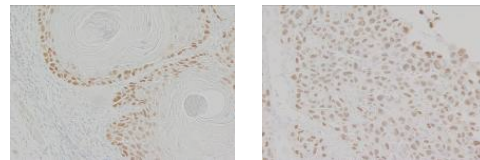
正常口腔粘膜    上皮性異形成 (軽度)    上皮性異形成 (重度)

口腔白板症において、p63 は細胞増殖マーカーである Ki-67 と同様に、上皮性異形成の程度が高くなるにつれて陽性率は有意に高くなっていった。一方、Notch1 は正常口腔粘膜上皮では p63 が発現していない有棘細胞層、顆粒細胞層などの分化した細胞に発現が認められた。口腔白板症では、上皮性異形成の程度が高くなるにつれて陽性率は有意に低くなっており、p63 と負の相関関係が認められた。

### 2) p63 陽性率と口腔扁平上皮癌への悪性転化との関連

口腔白板症の癌化群と非癌化群における p63 陽性率について比較検討した。癌化群では非癌化群に比べ p63 陽性率が有意に高かった。

### 3) 口腔扁平上皮癌における p63 および Notch1 の局在 (免疫組織化学染色法)



口腔扁平上皮癌 (高分化型)    口腔扁平上皮癌 (低分化型)

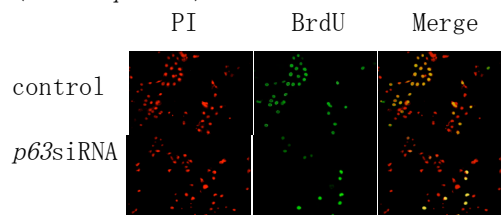
高分化型口腔扁平上皮癌では、p63 は高分化型 OSCC の癌巣の最外層から 2、3 層内に局在していたが、中-低分化型ではほぼ全ての癌細胞に発現を認め、その陽性率は低分化なものほど有意に上昇していた。細胞増殖活性のマーカーである Ki-67、上皮基底細胞のマーカーである CK5、CK14 も p63 と同様の発現様式であった。一方、Notch1 は高分化型では癌巣の中心部に発現を認めたが、低分化型ではほとんど発現を認めなかった。

### 4) 口腔扁平上皮癌細胞株における p63 および各種分化マーカーの発現 (real-time PCR 法)

p63 の発現量は、HSC-2 細胞において最も多かった。CK5 と CK14 は p63 の発現量が多い細胞株で強く発現しており、p63 と CK5、CK14 の発現量に正の相関性が認められた。また、vimentin の発現は p63 の発現が認められない SQUU-B 細胞と HEK293 細胞に認められた。Notch1 は高分化型口腔扁平上皮癌細胞株で有意に発現が高かった。

### 5) p63 siRNA 導入が HSC-2 細胞の細胞増殖に与える影響

WST-1 アッセイおよび BrdU ラベリングアッセイにおいて、 $\Delta Np63$  siRNA 導入群では対照群と比較して細胞増殖は抑制されていた。(ANOVA \* $p < 0.01$ )



## 6) p63 siRNA 導入による Notch1, CK5, CK14 の相対的発現量の変化

(real-time PCR 法)

p63 の発現量が最も高かった HSC-2 細胞に p63 siRNA の導入を行った (導入効率: 77.8%)。p63 のノックダウンにより、CK5 および CK14 の発現量は有意に減少した。しかしながら、Notch1 の発現量は有意に増加していた。

## 7) p63 siRNA 導入による p27<sup>kip1</sup> の相対的発現量の変化

ΔNp63 のノックダウンにより、CDK インヒビターである p27<sup>kip1</sup> の発現量は有意に増加した。(Mann-Whitney U-test \**p*<0.01)

## 8) ΔNp63 siRNA 導入が HSC-2 細胞の細胞遊走能に与える影響

ΔNp63 siRNA を導入した HSC-2 細胞は、対照群と比較して細胞の遊走能が亢進していた。(Mann-Whitney U-test \**p*<0.01)

### 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 4 件)

1. 松山美和、大部一成、川野真太郎、松下恭之、中村誠司、古谷野 潔  
舌可動部垂全摘症例に対するリハビリテーションとその治療効果  
-下顎歯槽堤形成術と最大舌圧の経時的変化-  
顎顔面補綴 33: 15-22, 2010
2. 後藤雄一、川野真太郎、大部一成、鈴木華子、松原良太、清末崇裕、小林家吉、白土雄司、中村誠司  
著明な嚢胞形成を伴った顎下腺多形腺腫の 1 例  
日本口腔腫瘍学会誌 23:17-23, 2011
3. Toru Chikui, Shintaro Kawano, Toshiyuki Kawazu, Masamitsu Hatakenaka, Syouzou Koga, Masahiro Ohga, Yoshio Matsuo, Syunya Sunami, Tsuyoshi Sugiura, Yoshiyuki Shioyama, Makoto Obara, Kazunori Yoshiura  
Prediction and monitoring of the response to chemoradiotherapy in oral squamous cell carcinomas using a pharmacokinetic analysis based on the dynamic contrast-enhanced MR imaging findings European Radiology: in press.
4. 川野真太郎、鈴木華子、松原良太、清末崇裕、清島 保、中村誠司

舌下腺に発生した多形腺腫の 1 例  
日本口腔外科学会雑誌: 印刷中.

[学会発表] (計 8 件)

1. Matsubara, R., Kawano, S., Kiyosue, T., Goto, Y., Nakao, Y., Toyoshima, T., Kakehashi, H., Kitamura, R., Yoshiga, D., Oobu, K., and Nakamura, S, Possible involvement of ΔNp63 in proliferation and differentiation of OSCC, 10th Biennial Congress of the European Association of Oral Medicine, 2010.09.23.
2. Kiyosue, T., Kawano, S., Matsubara, R., Goto, Y., Nakao, Y., Toyoshima, T., Kakehashi, H., Kitamura, R., Yoshiga, D., Oobu, K., and Nakamura, S, Immunohistochemical localization of p75NTR in oral leukoplakia and OSCC, 10th Biennial Congress of the European Association of Oral Medicine, 2010.09.23.
3. Kitamura R., Toyoshima T., Kawano S., Oobu K., Kiyosue T., Matsubara R., Goto Y., and Nakamura S., Immunohistochemical analysis of cytokeratin 17 in oral squamous cell carcinoma, 10th Biennial Congress of the European Association of Oral Medicine, 2010.09.23.
4. Toru Chikui, Shintaro Kawano, Yoshio Matsuo, Syunya Sunami, Takeshi Kamitani, Syouzou Koga, Kazunori Yoshiura, Evaluating the effect of preoperative chemoradiotherapy using a pharmacokinetic analysis of dynamic contrast enhanced MR imaging (1), 23rd Annual Meeting of European Society of Head and Neck Radiology, 2010.09.09.
5. Toru Chikui, Shintaro Kawano, Yoshio Matsuo, Syunya Sunami, Takeshi Kamitani, Syouzou Koga, Masahiro Ooga, Kazunori Yoshiura, Evaluating the effect of preoperative chemoradiotherapy using a pharmacokinetic analysis of dynamic contrast enhanced MR imaging (2), 23rd Annual Meeting of European Society of Head and Neck Radiology, 2010.09.09.
6. Goto Y., Kawano S., Hayashida J., Ikari T., Kurahara S., Toyoshima T., Minamizato T., Kiyosue T., Matsubara R., Oobu K., Takenoshita Y., Mori Y., Shiratsuchi Y., Nakamura S., Resistant factors of the conservative therapy to BRONJ, 10th Biennial Congress of the European Association of Oral Medicine, 2010.09.23.
7. Shintaro KAWANO, Yu NAKAO, Takahiro KIYOSUE, Ryota MATSUBARA, Yuichi GOTO, Kazunari OOBU, Seiji NAKAMURA, Results of Surgical Treatment for Stages I and II Tongue Squamous Cell

Carcinoma, XIX Congress of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial-Surgery, 2008.09.09.

8. Ryota MATSUBARA, Shintaro KAWANO, Kazunari OOBU, \*Toru CHIKUI, Yu NAKAO, Takahiro KIYOSUE, Yuichi GOTO, Yuji SHIRATUCHI, Seiji NAKAMURA, Clinical evaluation of FDG-PET for oral malignant tumors, XIX Congress of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial-Surgery, 2008.09.09.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

」

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

川野真太郎 (KAWANO SHINTARO)  
九州大学・大学院歯学研究院・助教  
研究者番号 : 00398067

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号 :