

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K18732

研究課題名（和文）口腔癌発育先進部における腫瘍微小環境の解明と治療への応用

研究課題名（英文）Elucidation of tumor microenvironment in advanced areas of oral cancer development and application to treatment

研究代表者

清水 翔太（SHIMIZU, SHOTA）

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：90792127

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究は、癌増殖局所の微小環境における1) 癌の発育先進部の簇出(Tumor Budding)、2) 口腔癌におけるカドヘリン-カテニンのジェネティック・エピジェネティックな異常の解析及び上皮-間葉移行(EMT)の発現と、3) リンパ系細胞浸潤の実態と相互関係を解明することにより、治療への応用を目的とする基礎的研究である。さらに、この関係の検討には癌増殖局所の免疫チェックポイントの検索も必要である。本研究では、以上の仮説に基づき腫瘍微小環境の解明を試みる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、口腔癌細胞の遊離・浸潤・転移に関与する細胞接着分子であるカドヘリン-カテニン複合体、癌の形質転換に関与する -カテニンのジェネティック・エピジェネティックな異常の発現、細胞内シグナル伝達経路に関与する複数の機能分子、癌細胞の形質転換に反応して浸潤する 複数の組織内リンパ系細胞の抗体パネルにより、口腔癌の腫瘍微小環境を解明し、臨床病理学的因子との相関を詳細に検討することで治療への応用を目指すことを目的とする。

研究成果の概要（英文）：This research focuses on 1) tumor budding in the local microenvironment of cancer growth, and 2) analysis of genetic and epigenetic abnormalities in cadherin-catenin and epithelial-to-epithelial abnormalities in oral cancer. This is a basic research aimed at applying to treatment by elucidating the actual state and interrelationship of the expression of leaf transition (EMT) and 3) lymphoid cell infiltration. Furthermore, in order to investigate this relationship, it is necessary to search for immune checkpoints in the area of cancer growth. In this study, we will attempt to elucidate the tumor microenvironment based on the above hypothesis.

研究分野：口腔癌

キーワード：Tumor Budding 腫瘍浸潤発育先進部 予防的頸部郭清術

1. 研究開始当初の背景

本研究は、癌増殖局所の微小環境における 1) 癌の発育先進部の簇出(Tumor Budding)、2) 口腔癌におけるカドヘリン-カテニンのジェネティック・エピジェネティックな異常の解析及び上皮-間葉移行(EMT)の発現と、3) リンパ系細胞浸潤の実態と相互関係を解明することにより、治療への応用を目的とする基礎的研究である。癌細胞の遊離、単離化と浸潤は、EMT の形態的表現と考えられる。その遊離、単離化と浸潤は、癌の実質と間質の境界部で発生し、殊に発育先進部で著しい。これらの生物学的現象は癌の簇出と EMT のせめぎ合いの上で成り立つと推測される。もう一つは、癌の発生と発育、浸潤、転移の過程には Wnt/-カテニンシグナル伝達経路の異常が関与するが、異常が関与しない場合には、宿主は自己の癌に対して免疫学的抵抗性が維持されていると推定される。すなわち、EMT と腫瘍浸潤リンパ系細胞の相互関係の存在が推察される。この関係の検討には癌増殖局所の免疫チェックポイントの検索も必要である。本研究では、以上の仮説に基づき腫瘍微小環境の解明を試みる。

2. 研究の目的

本研究は、癌増殖局所の微小環境における 1) 癌の発育先進部の簇出(Tumor Budding)、2) 口腔癌におけるカドヘリン-カテニンのジェネティック・エピジェネティックな異常の解析及び上皮-間葉移行(EMT)の発現と、3) リンパ系細胞浸潤の実態と相互関係を解明することにより、治療への応用を目的とする基礎的研究である。癌細胞の遊離、単離化と浸潤は、EMT の形態的表現と考えられる。その遊離、単離化と浸潤は、癌の実質と間質の境界部で発生し、殊に発育先進部で著しい。これらの生物学的現象は癌の簇出と EMT のせめぎ合いの上で成り立つと推測される。もう一つは、癌の発生と発育、浸潤、転移の過程には Wnt/-カテニンシグナル伝達経路の異常が関与するが、異常が関与しない場合には、宿主は自己の癌に対して免疫学的抵抗性が維持されていると推定される。すなわち、EMT と腫瘍浸潤リンパ系細胞の相互関係の存在が推察される。この関係の検討には癌増殖局所の免疫チェックポイントの検索も必要である。本研究では、以上の仮説に基づき腫瘍微小環境の解明を試みる。

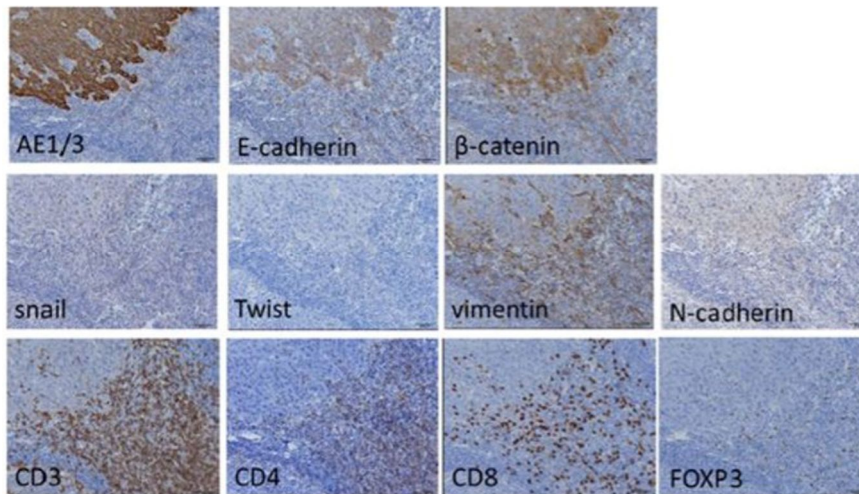
3. 研究の方法

本研究では、以下の研究ロードマップに示すような各研究課題を期間中に解明、遂行し臨床病態に対応づけて整理し、病態解析・予後予測・治療法選択の指針とすることを目指す。

- 1)口腔癌発育先進部における簇出(tumor bud counts)の評価と各種抗体パネルの作成
- 2)癌細胞のジェネティック・エピジェネティックな異常の解析
- 3)口腔癌微小環境と臨床病理学的所見及び予後との関連の解析

1) 口腔癌発育先進部における簇出の評価と各種抗体パネルの作成

簇出の評価は、癌細胞が単細胞化・遊離化するとヘマトキシリン・エオジン染色標本では識別が困難となるため、抗汎サイトケラチン抗体 AE1/AE3 による免疫組織化学染色標本により判定・評価する。通報に従い癌細胞における核が 5 個以内の遊離癌胞巢の数を検索する。(Shimizu S, Miyazaki A, Sonoda T, Koike K, Ogi K, Kobayashi J, Kaneko T, Igarashi T, Ueda M, Dehari H, Miyakawa A, Hasegawa T, Hiratsuka H. Tumor budding is an independent prognostic marker in early stage oral squamous cell carcinoma: with special reference to the mode of invasion and worst pattern of invasion. PLOS ONE)

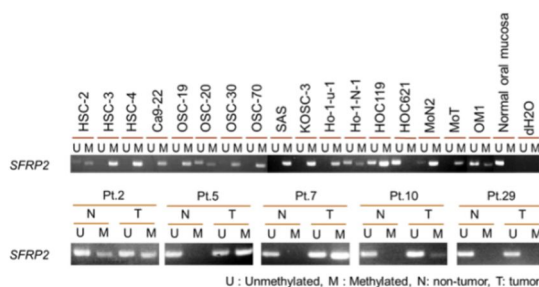


腫瘍浸潤リンパ系細胞の識別には抗カップカ鎖/ミュー鎖抗体(形質細胞)、CD20(B細胞)、CD3(T細胞)、CD4(ヘルパーT細胞)、CD8(細胞傷害性T細胞) (Shimizu S, Hiratsuka H, Koike K, Tsuchihashi K, Sonoda T, Ogi K, Miyakawa A, Kobayashi J, Kaneko T, Igarashi T, Hasegawa T, Miyazaki A. Tumor-infiltrating CD8⁺ T-cell density is an independent prognostic marker for oral squamous cell carcinoma. Cancer Med. 2019 Jan 1.)、FoxP3(抑制性T細胞)、PD-1陽性細胞の組織内分布と数値的評価を行い、癌細胞の上皮-間葉移行の様相はE-カドヘリン、 β -カテニン、間葉細胞への移行はWnt/ β -カテニンシグナル経路の転写因子であるSnail、Twist、Vimentin、N-カドヘリンの抗体を用いてパネルを作成し他の分子生物学的所見との関連を検討する。

2) 癌細胞のジェネティック・エピジェネティックな異常の解析

パラフィン包埋切片よりRNAを抽出し、 β -カテニン遺伝子の中でも最も異常が発現するエクソン5の遺伝子異常を中心にmRNAの発現をPCRで検索する。

同じく、SFRP2遺伝子のエクソン1のCpGアイランドにおけるメチル化異常をメチル化特異的PCR法(MSP)で検索する。現時点では臨床例の36%にメチル化異常が認められており、単変量解析で全生存率と有意な関連が認められている。



3) 口腔癌微小環境と臨床病理学的所見及び予後との関連の解析

2020年の研究計画を推進しながら順次、得られた所見と臨床病理学的所見との比較検討を行う。研究代表者が直接に患者管理と治療に当たり、生存者に関しては5年以上の生存期間を経た症例の臨床データ及び病理組織データは既に統計処理を出来る状態に整理してある。統計処理は、現在教室で使用しているSPSS ver.23を使用する。

研究期間の途中で異動や退職等により研究環境が大きく変わる場合は、研究実施場所の確保や研究実施方法等について研究代表者、研究分担者の異動、退職の予定はないので、研究計画の遂行に支障を来たす事態は予想されない。

4 . 研究成果

Shimizu S, Miyazaki A, Sonoda T, Koike K, Ogi K, Kobayashi J, Kaneko T, Igarashi T, Ueda M, Dehari H, Miyakawa A, Hasegawa T, Hiratsuka H. Tumor budding is an independent prognostic marker in early stage oral squamous cell carcinoma: with special reference to the mode of invasion and worst pattern of invasion. PLOS ONE

臨床的に頸部転移陰性の OSCC における局所転移を予測する分子や形態学的な予後因子に関する研究がさかんに行われているが、それらのどれもコンセンサスが得られていないのが現状である。

最近、OSCC の腫瘍浸潤発育先進部における高強度の Tumor Budding は、局所的転移および予後不良を示し、OSCC の腫瘍 - 宿主境界に位置する癌細胞は、転移能の点でより攻撃的であると長い間考えられてきた。これらの観察結果をもとに、cT1,2N0M0 OSCC における局所転移を予測する腫瘍浸潤発育先進部における腫瘍浸潤パターンを同定するために、浸潤様式 (YK 分類)、Worst Pattern Of Invasion (WPOI) および Tumor Budding をヘマトキシリンおよびエオジン (H&E) 染色切片、サイトケラチン免疫染色切片を用いて病理組織学的所見と 3 つの腫瘍浸潤パターンの関連性を検討することが必要である。

本研究では、cT1,2N0 OSCC 患者のリンパ節転移および生存率の関与するリスク因子と腫瘍浸潤パターンの関連性を検討し、現在の口腔癌治療に相応した予後因子を探索し、新たな悪性度評価法を確立することを目的とする。

局所転移を伴う cT1,2N0M0 OSCC 患者において 5 つ以上の Tumor Budding およびグレード 4C または 4D の浸潤様式が頻繁に観察され、高強度の Tumor Budding が多変量解析における局所転移と有意な相関を示した。これらの結果を踏まえて、cT1,2N0 OSCC 患者の局所転移を同定するため、2 つの診断および治療戦略を提唱する。(1) Tumor Budding を pancytokeratin 免疫染色された生検および外科的に切除された組織切片における浸潤の様式を評価する。(2) 5 つ以上の Tumor budding および YK-4C および 4D の Tumor Budding と浸潤様式が存在する場合は一次手術の後、イメージング様式の使用の有無にかかわらず、短い間隔で注意深く観察を続け、後発転移の症状がある場合は、できるだけ早く頸部郭清を行う。さらに 10 個以上の Tumor budding、および YK-4D の浸潤様式が観察された場合は、予防的頸部郭清術を実施することが重要であることを論文にて発表した

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 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1 . 著者名 小池和茂ら	4 . 巻 111
2 . 論文標題 Prognostic value of HLA class expression in oral squamous cell carcinoma patients	5 . 発行年 2020年
3 . 雑誌名 Cancer Sci	6 . 最初と最後の頁 1491-1499
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14388. Epub 2020 Apr 15.	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
---------	---------