

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890186

研究課題名（和文）口腔扁平上皮癌患者における癌細胞の分化とサイトケラチンの発現様式との関連

研究課題名（英文）Correlation between the expression patterns of cytokeratins/cell differentiations and the clinico-pathological findings in oral squamous cell carcinoma

研究代表者

豊嶋 健史 (TOYOSHIMA TAKESHI)

九州大学・大学院歯学研究院・助教

研究者番号：20546569

研究成果の概要（和文）：

口腔扁平上皮癌(OSCC)患者の原発巣の生検組織材料 105 例を用いて免疫組織学的染色により 6 種類の CK の発現様式を検討した。その結果、CK17 が他の CK (CK14、CK16、CK18、CK19、CK20) に比較して有意に高頻度に発現していた。さらに CK の発現と癌細胞の分化度との関連を検索するために臨床病理学的所見とともに  $\Delta p63$  の発現様式を検索した。その結果、CK17 は腫瘍の中心部において高発現したのに対して、 $\Delta p63$  は癌胞巣や腫瘍辺縁部で最外層に高発現していた。全 105 例における CK17 の発現率の平均値は中心部において有意に高かった ( $P<0.05$ )。また  $\Delta p63$  の発現率の平均値は中心部において有意に高かった ( $P<0.05$ )。

口腔扁平上皮癌(OSCC)患者の原発巣の生検組織材料 13 例を用いて免疫組織学的染色により CK17 と Gli2 の発現について検討した。腫瘍の中心部では CK17 と Gli2 が共発現しており、辺縁部では主に Gli2 が発現していることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

The expression patterns of 6 kinds of CK were examined immunohistochemically in the 105 biopsy specimens of primary site from OSCC patients. The results reveal that CK 17 was significantly expressed in compared to those of other CKs (CK14, CK16, CK18, CK19, CK20). Moreover, a correlation with the clinicopathological findings and the  $\Delta p63$  pattern were examined immunohistochemically. CK17 was significantly expressed in the high frequency in the center of tumor ( $P<0.05$ ), while  $\Delta p63$  was significantly expressed in the high frequency in the outer layer of tumor ( $P<0.05$ ).

The expression patterns of CK17 and Gli2 were examined immunohistochemically in the 13 biopsy specimens of primary site from OSCC patients. CK17 and Gli2 were co-expressed frequently in the center of tumor, while Gli2 was expressed in the outer layer of tumor.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	950,000	285,000	1,235,000
2010 年度	850,000	255,000	1,105,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,800,000	540,000	2,340,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学 外科系歯学

キーワード：口腔扁平上皮癌、サイトケラチン、分化度、 $\Delta p63$ , Gli2

## 1. 研究開始当初の背景

外科的切除や放射線療法、化学療法を用いた三者併用療法の発展にも関わらず、口腔扁平上皮癌 (oral squamous cell carcinoma: OSCC) の予後は未だに悪い。そして OSCC の予後不良の一因は、再発や遠隔転移を導くような骨髄中や末梢血中へ早期に浸潤する癌細胞 (Disseminated tumor cells: DTCs) であるといわれる。DTCs は手術時には発見することが困難である。それゆえ、OSCC 患者の体系的治療を行うために、早期に DTCs を発見できる戦略を確立することが急務である。以前よりサイトケラチン (CK) は固形癌患者における DTCs 検出のための分子生物学的因子としてその有用性が検討されてきた。正常上皮細胞と比較して CK は癌細胞において過剰発現している。また、健常者では骨髄中や末梢血中では CK 陽性癌細胞は検出されない。一般的に、頭頸部癌を含む固形癌患者の原発巣や骨髄中、末梢血中における研究では、CK の過剰発現はその予後に関与すると言われている。

特に、CK17 は子宮頸部扁平上皮癌や喉頭扁平上皮癌において免疫組織学的に診断因子としての可能性が報告されている。研究代表者の豊嶋は OSCC 患者 56 例の原発巣組織における CK17、CK19、CK20 mRNA の発現について検討したところ CK17 mRNA がもっとも多く 53 例 (94.6%) において発現過剰がみられ、OSCC の診断因子としての有用性を示した (Toyoshima T, et al. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 2008, *Journal of Oral Pathology & Medicine* 2009)。また OSCC 患者の原発巣組織における CK19 mRNA の過剰発現は予後因子として有用であるとの報告がある。さらには、OSCC 患者の原発巣組織における CK20 mRNA の過剰発現は頸部リンパ節転移に関与しているとの報告もある。しかしながら、OSCC 患者の末梢血中の CK の発現を検索した報告は非常に少なかった。そこで豊嶋は OSCC 患者 40 例の術後 4 週間での末梢血中の CK17、CK19、CK20 mRNA の発現を検索したところ、CK20 mRNA の過剰発現が 14 例 (35.0%) においてもっとも多くみられ、さらに CK20 mRNA 陽性患者は累積生存率が有意に低いことがわかった (Toyoshima T, et al. *Anticancer research* 2009)。以上より OSCC 患者の原発巣の癌細胞では CK17 mRNA の発現過剰が高頻度にみられ、末梢血中で検出される癌細胞では CK20 mRNA が過剰に発現していた。そこで原発巣での CK17 を過剰発現する癌細胞と、原発巣を離れ末梢血中に浸潤する CK20 陽性癌細胞には分化度の差があるのではないかという仮説がたてられた。また、低分化型 OSCC では異型性の強い細胞が粘膜上皮の基底層を

破り固有層にびまん性に浸潤する様子がみられるが、このような低分化型癌細胞が末梢血中に侵入すると推測された。

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、基底層の破壊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なかった結果であると推測される。以前より p53 の発現や機能を中心に多くの研究がなされてきたが、この分化メカニズムについてはいまだに解明されていない。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を制御している可能性が示唆されている。

また CK17 と Gli との関連も過去の報告により指摘されている (DePianto D, et al. *Nature genetics* 2010)。特に Gli2 は Sonic hedgehog (Shh) の存在下で activator として機能する。Shh の受容体で膜貫通型蛋白である Patched (Ptc) とその他の膜貫通蛋白である Smoothened (Smo) を介して Shh シグナル伝達の最初のトランスデューサーとなり、その後 Gli1 が二次的に作用する。前述の報告では Gli2 を持つトランスジェニックマウスと Gli2 を持つ CK17 KO マウスを比較した場合、前者には基底細胞癌 (BCC) および hyperkeratosis が発生したのに対して後者ではそれらがみられなかった。よって Gli2 共存下で Shh シグナル伝達が達成された場合でも発癌および前癌状態への誘導には CK17 が必要であることが示唆された。

## 2. 研究の目的

OSCC 患者における原発巣と末梢血中の癌細胞の「CK 発現過剰の差異」と基底層における p63 の発現との関連を検討した。また OSCC 患者における CK17 および Gli2 の共発現について検討した。

## 3. 研究の方法

### A. OSCC 原発巣における CK17 と $\Delta p63$ の発現に関する検討

材料は術前治療前の OSCC 原発巣の生検組織 105 例であった。抗 CK17 モノクローナル抗体および抗  $\Delta p63$  抗体を用いて免疫組織学的染色を行い、腫瘍全体、腫瘍中心部および腫瘍辺縁部における陽性率を算出した。なお、陽性率は腫瘍細胞総数に対する CK17 陽性細胞の割合を算出し、10%以上を陽性とした。臨床病理学的検討項目は T 分類、頸部リンパ節の有無、分化度、浸潤様式、病期分類および筋層浸潤の有無であった。

### B. OSCC 細胞株における CK17 の発現に関する検討

HSC-2, HSC-3, SAS, SQUU-A, SQUU-B といった OSCC 細胞株における CK17mRNA 発現量を real-time PCR 法を用いて解析した。内在性コントロールに GAPDH を用い、定量化には  $\Delta\Delta CT$  法を用いた。

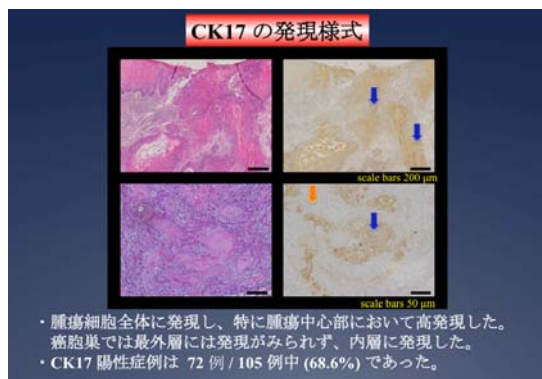
### C. OSCC 患者における CK17 および Gli2 の発現に関する検討

材料は術前治療前の OSCC 原発巣の生検組織 13 例であった。抗 CK17 モノクローナル抗体および抗 Gli2 抗体を用いて免疫組織学的染色を行い、腫瘍全体、腫瘍中心部および腫瘍辺縁部における発現率を算出した。

## 4. 研究成果

### A. OSCC 原発巣における CK17 と $\Delta p63$ の発現に関する検討

CK17 が発現した OSCC の代表的症例を示す。

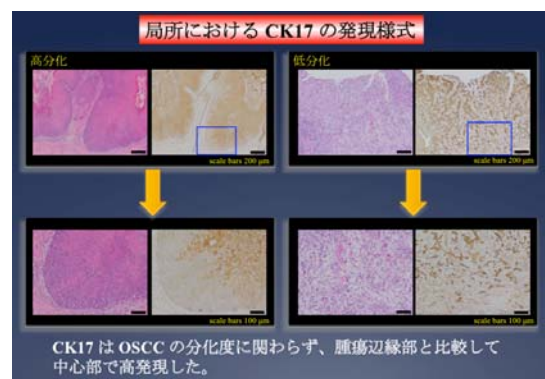


CK17 は腫瘍細胞全体に発現し、特に腫瘍中心部で高発現した。癌胞巣では最外層には発現がみられず、内層に発現した。また CK17 陽性症例は 105 例中 72 例 (68.6%) であった。

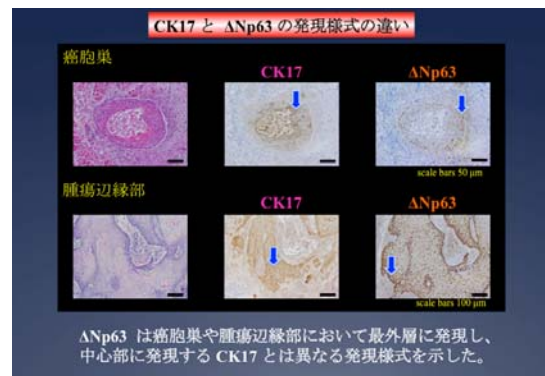
OSCC の原発巣における CK17 の発現と臨床病理学的所見との関連を検討した。T 分類に注目すると腫瘍中心部において CK17 は有意に高発現していた ( $P < 0.01$ )。多くの項目では有意な差はなかったが、腫瘍辺縁部に比べて、CK17 の発現は腫瘍中心部において高かった。そこで全 105 例における腫瘍中心部と辺縁部における CK17 の陽性率を検討した。CK17 の発現率の平均値は中心部において有意に高かった ( $P < 0.05$ )。



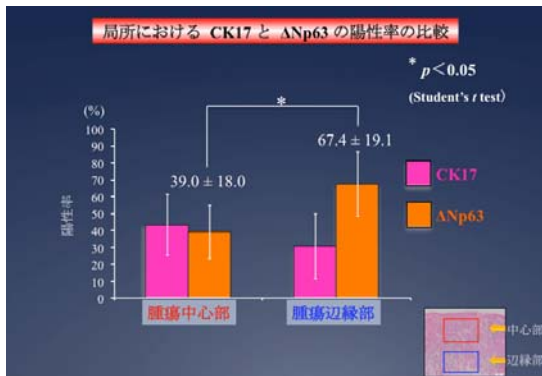
再度組織標本をみてみると、分化度に関わらず、腫瘍細胞による CK17 の発現は中心部で高発現していることが確認できた。



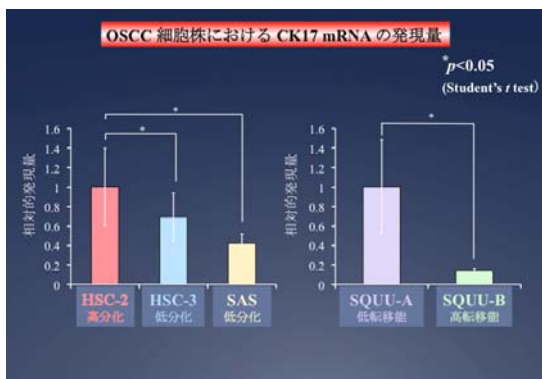
次に CK17 と  $\Delta p63$  の発現について検討した。



前述したように、CK17 は腫瘍の中心において高発現したのに対して、 $\Delta p63$  は癌胞巣や腫瘍辺縁部で最外層に高発現しており、相対する印象であった。そこで全 105 例において腫瘍の局所における CK17 と  $\Delta p63$  の陽性率の比較を行った。 $\Delta p63$  の発現率の平均値は中心部において有意に高かった ( $P < 0.05$ )。



### B. OSCC 細胞株における CK17 の発現に関する検討



低分化 OSCC 細胞株である HSC-3 や SAS と比較して、高分化 OSCC 細胞株の HSC-2 において CK17mRNA 発現量は有意に高かった。また、高転移能をもつ SQUU-B と比較して SQUU-A においても CK17mRNA 発現量は有意に高かった。

以上より

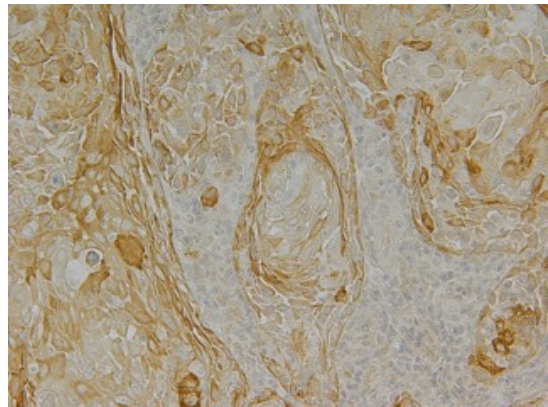
- CK17 は OSCC 原発巣において高頻度に発現しており、局所では腫瘍中心部に高発現した。
- CK17 は  $\Delta$ Np63 とは異なる発現様式を示した。
- CK17 mRNA は高分化 OSCC 由来の細胞株、そして浸潤転移能が低い細胞株で発現していた。

という結果が得られ CK17 は高分化 OSCC 細胞に高発現し、分化との関連が示唆された。

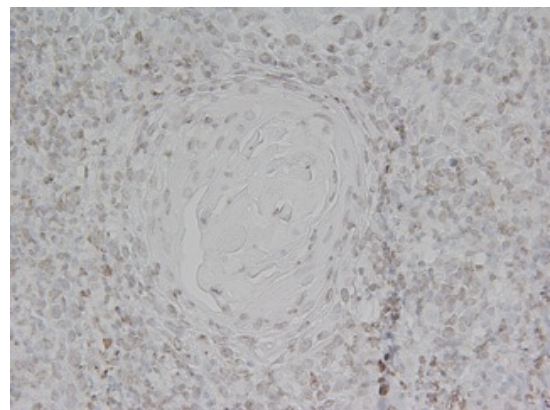
### C. OSCC 患者における CK17 および Gli2 の発現に関する検討

CK17 および Gli2 が発現した OSCC の代表的症例を示す。

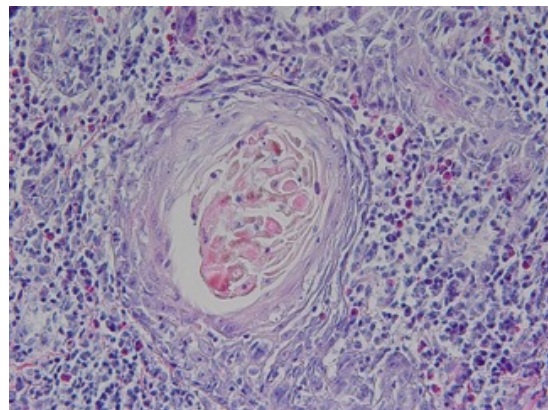
CK17 (original magnification X200)



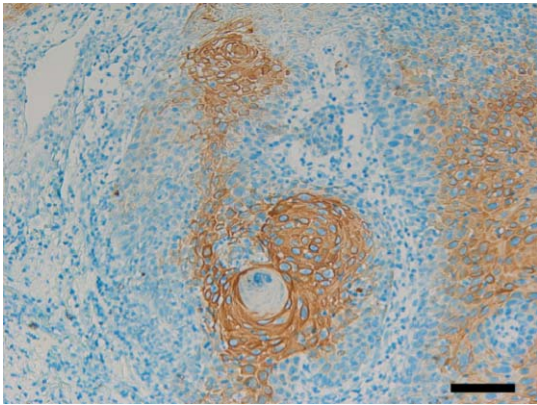
Gli2 (original magnification X200)



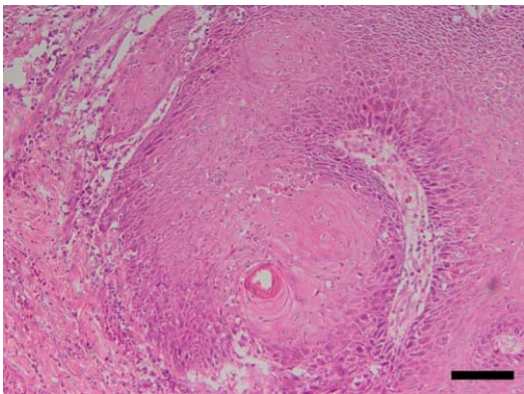
HE (original magnification X200)



以上より OSCC においても確かに Gli2 が発現していることが確認できたが、その局在について CK17 との関連が不明であったため二重染色を行った。以下に代表的症例とその HE 染色を示す。



(scale bar: 100 μm)



(scale bar: 100 μm)

腫瘍の中心部では CK17 と Gli2 が共発現しており、辺縁部では主に Gli2 が発現していることが明らかとなった。

以上の結果と、Shh シグナルが細胞の分化誘導に関与していることを考慮すると、未分化な腫瘍辺縁部では Gli2 が発現することにより分化誘導シグナル経路を盛んにしており、一方、中心部では高分化の腫瘍細胞が多数を占め、CK17 を発現する印象であった。

症例が少ないため腫瘍全体および局所における2つの分子の発現に関する統計学的解析が不可能であったため、今後は症例数を増加し検討を進めるとともに、同じく activator として機能する Gli3 や二次的に働く Gli1 の発現についても検索を進める予定である。

##### 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4件)

1. R KITAMURA, T TOYOSHIMA, S KAWANO, T KIYOSUE, R

MATSUBARA, Y GOTO, K OOBU, S NAKAMURA. Immunohistochemical analysis of cytokeratin 17 in oral squamous cell carcinoma, 10th Congress of the European Association of Oral Medicine incorporating the World Workshop on Oral Medicine 2010.09.21.

2. 北村 亮二・豊嶋 健史・川野 真太郎・大部 一成・清末 崇裕・松原 良太・後藤 雄一・中村 誠司, 口腔扁平上皮癌におけるサイトケラチン17の免疫組織化学的検討 第29回日本口腔腫瘍学会 2010.01.27.

3. 北村 亮二・豊嶋 健史・川野 真太郎・清末 崇裕・松原 良太・後藤 雄一・中村 誠司, 口腔扁平上皮癌におけるサイトケラチン17の発現についての検討 第55回日本口腔外科学会総会・学術大会 2010.10.16.

4. R KITAMURA, T TOYOSHIMA, S KAWANO, T KIYOSUE, R MATSUBARA, Y GOTO, K OOBU, S NAKAMURA. Immunohistochemical analysis of cytokeratin 17 in oral squamous cell carcinoma 2010.09.21.

[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]

特記事項なし

##### 6. 研究組織

(1)研究代表者

豊嶋 健史 (TOYOSHIMA TAKESHI)

九州大学・研究院・助教

研究者番号：20546569

(2)研究分担者  
( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：