

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月31日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592246

研究課題名（和文） 口腔扁平上皮癌における癌幹細胞関連分子群の役割

研究課題名（英文） Role of cancer stem cells related molecules in oral squamous cell carcinoma

研究代表者

山崎 浩史 (YAMAZAKI HIROSHI)

東海大学・医学部・講師

研究者番号：00338708

研究成果の概要（和文）：口腔扁平上皮癌（OSCC）において、変異細胞の単一クローン性増殖に対して、細胞の不均一性（heterogeneity）は、制御不可能となった幹細胞や前駆細胞から生じることが想定される。しかし、幹細胞性（stemness）に関わる分子の発現や分布については明らかになっていない。そこで、我々は、OSCCにおける、これら stemness 関連分子の発現・特性と予後との関連性について明らかにした。クロマチンの調節に関わる Bmi-1 と Hmga2 について、OSCC 12 症例における腫瘍部と周辺の正常部での発現の差異についてマイクロアレイを用いて検討した。Bmi-1 と Hmga2 の双方とも、がんの抑制に関わる Ink4a や Arf の発現を抑制的に調節することによって、幹細胞の自己複製を促進することが知られている。これらの発現レベルに関して、OSCC 38 症例の腫瘍部・正常部と、同一病期の舌扁平上皮癌 91 症例について qRT-PCR を用いて解析した。Bmi-1 と Hmga2 はターゲットとして類似しているにもかかわらず、Bmi-1 蛋白は発癌初期の病変部に、Hmga2 蛋白は進行した病変部に発現していた。同様に、腫瘍の Bmi-1 発現と全生存期間（OS）に関連性は認められなかった（ $P = 0.67$ ）が、腫瘍の Hmga2 発現と OS の短縮には関連性が認められた（ $P = 0.05$ ）。qRT-PCR の解析結果は、蛋白の発現レベルと相関していた。以上の知見から、Bmi-1 は、非がん部からの発がんを検索する早期発見マーカーであり、一方、Hmga2 は、腫瘍の予後を推定するマーカーであることが示唆された。我々の検討では、OSCC において、これら stemness 関連分子の発現は、少数の原始的な腫瘍細胞に認められ、むしろ非発現の腫瘍細胞がその多くを占める。stemness 関連分子を高発現している OSCC 細胞は、部分的に幹細胞のような振舞いをしているに違いないと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Oral squamous cell carcinoma (OSCC) include cellular heterogeneity, as would be expected if they arose from dysregulated stem or progenitor cells as opposed to the simple clonal expansion of a mutated cell; however, stemness molecule expression levels and distribution remain unclear. To overcome this problem, stemness molecule expressions were determined in OSCC as well as their properties and prognosis. Two chromatin regulators, Bmi-1 and Hmga2, were identified in 12 tumors region and background pair cases of OSCC by microarray. Both molecules are known to promote stem cell self-renewal by negatively regulating the expressions of Ink4a and Arf tumor suppressors. The expression levels were analyzed in 38 pair cases of OSCC by qRT-PCR and in 91 cases

of the same stage of tongue SCC. Despite a similar target, Bmi-1 protein was expressed in an early cancerous region and HMGA2 protein was expressed in a more progressed region. Likewise, Bmi-1-expressing tumor had no significance with regard to overall survival ( $P = 0.67$ ), while HMGA2-expressing tumors had decreased overall survival ( $P = 0.05$ ). qRT-PCR analyses also correlated with protein levels. These findings suggest that Bmi-1 is an early detection marker to distinguish cancerous from non-cancerous regions, while HMGA2 is presumed to be a tumor prognosis marker. Among our OSCC analyses, these stemness molecules expressed not so many primitive rare cells in the tumor as almost all other cells in the tumor. OSCC cells with high expression of stemness molecules should partially behave exactly like stem cells.

#### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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 癌幹細胞 診断マーカー

#### 1. 研究開始当初の背景

近年、癌を形成する細胞の中に少数ではあるが、幹細胞の性質を有する細胞集団が存在することが明らかになってきた。この細胞集団が“癌幹細胞”と考えられている。癌幹細胞は正常幹細胞と同様に自己複製能および多分化能を有しているため、癌の分化・増殖が引き起こされ、やがて腫瘍が形成される。そして、化学療法や放射線療法によって腫瘍が縮小したとしても、癌幹細胞は抗癌剤および放射線に耐性を有しているため生き残り、再び癌の分化・増殖が引き起こされ、癌の再発・転移の原因になっていると考えられている。口腔粘膜は再生能が高く、上皮基底細胞層では常に細胞の増生が行われ恒常性が保たれている。口腔粘膜での幹細胞の存在は明らかになっていないが、基底細胞層の一部の細胞が幹細胞として機能していることが予想されている。口腔癌のなかで多くを占める口腔扁平上皮癌 (Oral Squamous Cell Carcinoma/OSCC) も他の消化器癌と同様に、一人の腫瘍を調べると組織学的な多様性が

見られることが多い。高分化扁平上皮癌と診断されても、部分的に中分化あるいは低分化の扁平上皮癌が混在することが多い。また、抗癌剤感受性を調べると同一癌でも感受性の高い癌細胞と低い癌細胞が混在することが知られている。このような多様性を生み出す原因として、多分化能を有する癌幹細胞が存在することが予想されている。実際に、頭頸部癌においても癌幹細胞の存在が示唆されている。以上から、癌の発生、進展、再発、転移に癌幹細胞が深く関与するのではないかと考えられる。

#### 2. 研究の目的

本研究は、癌幹細胞の関連分子の発現を解析することにより、OSCCにおける発癌・進展・再発・転移に関する分子機構の解明を目的とする。また、癌幹細胞関連分子群のOSCC診断マーカーとしての有用性について検討した。

#### 3. 研究の方法

(1) OSCC腫瘍部 (T) と周辺正常部 (N) での

#### マイクロアレイを用いたmRNA発現解析

Agilent eArray(8x15K)を使用し、OSCC 症例の T と N の 12 ペアに対して施行した。T が N に対し 1.2 倍以上発現しているものと既報告の癌幹細胞関連分子について解析した。

#### (2) Bmi-1、Hmga2 発現に関する解析

Bmi-1 と HMGA2 の mRNA 発現レベルを OSCC38 症例 (T, N) について qRT-PCR 法を用いて検討した。

次に、病期 I、II 期舌扁平上皮癌 91 症例について、Bmi-1 と HMGA2 のタンパク発現および病理組織学的因子を検討した。免疫組織化学染色により、陽性・弱陽性・陰性の 3 段階で、分化度に応じて評価した。

#### (3) Bmi-1、Hmga2 タンパク発現と予後との関連についての解析

病期 I、II 期舌扁平上皮癌 91 症例について、Bmi-1 と HMGA2 のタンパク発現と予後との関連について統計学的に検討した。

男性 57 例、女性 34 例、29-91 歳 (中央値 62 歳) について、5 年全生存率を検討した。

#### 4. 研究成果

(1) stemness に関連する分子として、Bmi1、HMGA2、GNL3L、CD44、YBX1、EpCAM、CD133、Notch1 を抽出した。HMGA2、GNL3L、CD44、YBX1 は、T において有意に高発現していた (Mean T vs N; 7.79 vs 0.68,  $P = 0.02$ ; 1.23 vs 0.83,  $P < 0.01$ ; 1.30 vs 0.86,  $P = 0.03$ ; 1.23 vs 0.90,  $P < 0.01$ )。Bmi1、EpCAM は T において高発現していたが、有意差はなかった (1.22 vs 1.09,  $P = 0.61$ ; 3.30 vs 1.38,  $P = 0.29$ )。CD133、Notch1 は、T の方が比較的に低発現であった (mean 0.97 vs 1.22,  $P = 0.33$ ; 0.99 vs 1.38,  $P = 0.76$ )。以上の結果から、がんの抑制に関わる Ink4a や Arf の発現を抑制的に調節することによって、幹細胞の自己複製を促進することが知られている Bmi-1 と Hmga2 の 2 つの分子を診断マーカーとして注目した。

(2) OSCC38 症例 (高分化 13 例、中分化 17 例、低分化 8 例) に対して qRT-PCR を施行した結果、Bmi1 は、高分化 8/13 (61.6%)、中分化 10/17 (58.8%)、低分化 4/8 (50%) で高発現し、HMGA2 は、高分化 13/13 (100%)、中分化 16/17 (94.1%)、低分化 8/8 (100%) で高発現であった。平均発現量は、Bmi-1 (T/N: : 14.64/13.91  $P = 0.85$ )、HMGA2 (T/N: 6.36/1.40  $P < 0.01$ ) であった。

舌扁平上皮癌 91 例 (高分化 33 例、中分化 31 例、低分化 27 例) については、Bmi-1 では、高分化 (陽性 6/33 (18.2%)、弱陽性 13/33 (39.4%)、陰性 14/33 (42.4%))、中分化 (陽性 2/31 (6.5%)、弱陽性 11/31 (35.5%)、陰性 18/31 (58.5%))、低分化 (陽性 3/27 (11.1%)、弱陽性 13/27 (48.1%)、陰性 11/27 (40.7%)) で、HMGA2 では、高分化 (陽性 0/33 (0%)、弱陽性 14/33 (42.4%)、陰性 19/33 (57.6%))、中分化 (陽性 13/31 (41.9%)、弱陽性 13/31 (41.9%)、陰性 5/31 (16.1%))、低分化 (陽性 24/27 (88.9%)、弱陽性 2/27 (7.4%)、陰性 1/27 (3.7%)) であった。以上の結果から、舌扁平上皮癌において Bmi1 タンパクの発現は、高分化型に比較的多く発現し、早期癌の検出に有用であり、HMGA2 タンパクは、浸潤癌・低分化型で多く発現していることから予後の推定に有用であることが示唆された。

(3) 病期 I、II 期舌扁平上皮癌 91 症例の 5 年全生存率は 65.7% (平均観察日数は 2777 日 (219-3956 日)、平均生存 2718 日、95%CI、2325-3112 日) であった。91 症例のうち、Bmi1 陽性 48 例 (52.7%) (平均生存 2651 日、95%CI、2137-3165 日) 陰性 43 例 (47.3%) (平均生存 2611 日、95%CI、2043-3179 日) であり、5 年全生存率は Bmi1 陽性と陰性との間に有意差は認められなかった ( $P = 0.69$ )。一方、HMGA2 陽性 66 例 (72.5%) (平均生存 2187 日、95%CI、1545-2829 日) 陰性 25 例 (27.5%) (平均生存 2611 日、95%CI、2533-3455 日) であり、5 年全生存率は HMGA2 陽性と陰性との間に有意差が認められた ( $P = 0.05$ )。

#### 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 20 件)

① Lung metastases of epithelial-myoepithelial carcinoma of the parotid gland successfully treated with chemotherapy: a case report. Yamazaki H, Ota Y, Aoki T, Kaneko A, J Oral Maxillofac Surg, 査読有, 71(1): 220-6 (2013)

② Sox10 is a novel marker of acinus and intercalated duct differentiation in salivary gland tumors: A clue to the histogenesis for diagnosis, Ohtomo R, Mori T, Tsuta K, Maeshima A, Shibata S, Akazawa C, Honda K, Yamada T, Yoshimoto S, Asai M,

Okano H, Kanai Y, Tsuda H Corresponding Author Mod Pathol. 2013 Apr 5.

③ Comparison of Malignant Bone Treatments for Reuse Yazawa M, Mori T, Kishi K Sci. Res. 4: 49-52 (2013)

④ Involvement of Hepatocellular Carcinoma Biomarker, Cyclase-Associated Protein 2 in Zebrafish Body Development and Cancer Progression. Effendi K, Yamazaki K, Mori T, Masugi Y, Makino S, Sakamoto M Exp Cell Res. 2012 Sep 27. [Epub] 319: 35-44 (2013)

⑤ Concurrent onset of an eosinophilic ulcer of the oral mucosa with peripheral eosinophilia in a human T-cell leukemia virus type 1 carrier. Yamazaki H, Shirasugi Y, Kajiwara H, Sasaki M, Otsuru M, Aoki T, Ota Y, Kaneko A, Makamura N, Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol, 査読有, 114(7): e43-48 (2012)

⑥ Development of follicular lymphoma of the cervical lymph nodes in a postoperative patient with tongue cancer. Yamazaki H, Nakatogawa N, Ota Y, Karakida K, Otsuru M, Kaneko A, Shirasugi Y, Kajiwara H, Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol, 査読有, 113(6): e35-39 (2012)

⑦ Successful treatment by intralesional steroid injection in management of central giant cell granuloma of the jaw-Report of two cases. Aoki T, Karakida K, Sakamoto H, Yamazaki H, Otsuru M, Sasaki M, Sakamoto Y, Aoyama K, Ota Y, Kaneko A, J Oral Maxillofac Surg Med Pathol, 査読有, 24: 213-217 (2012)

⑧ 特異な炎症像を示した深頸部感染症の1例、加藤久視、佐々木剛史、山崎浩史、倉林宏考、中戸川倫子、太田嘉英. 日本口腔診断学会雑誌、査読有、25 巻、25-32 (2012)

⑨ Identification and prospective isolation of a mesothelial precursor lineage giving rise to smooth muscle cells & fibroblasts for mammalian internal organs, and their vasculature Rinkevich Y, Mori T, Sahoo D, Xu P, Bermingham JR

Weissman IL Nature Cell Biol. Dec;14(12):1251-60 2012 Oct.

⑩ Arai E, Chiku S, Mori T, Gotoh M, Nakagawa T, Fujimoto H, Kanai Y. Single-CpG-resolution methylome analysis identifies clinicopathologically aggressive CpG island methylator phenotype clear cell renal cell carcinomas. Carcinogenesis. Aug;33(8):1487-93 (2012)

⑪ 歯周基本治療における細菌叢変化と治療の指標となる細菌の検討. 金子明寛、織田洋武、伊藤公一、小林寅吉、山崎浩史、松野智宣、佐藤田鶴子、佐藤聡. 日本歯科医学会誌、査読有、30: 65-69 (2011)

⑫ A case of adenomatoid odontogenic tumor during pregnancy. Sekiya R, Yamazaki H, Izawa K, Kaneko A, Tsukinoki K, Tokai J Exp Clin Med, 査読有, 36(4):124-127 (2011)

⑬ Identification by Differential Tissue Proteome Analysis of Talin-1 as a Novel Molecular Marker of Progression of Hepatocellular Carcinoma. Kanamori H, Kawakami T, Effendi K, Yamazaki K, Mori T, Ebinuma H, Masugi Y, Du W, Nagasaka K, Ogiwara A, Kyono Y, Tanabe M, Saito H, Hibi T, Sakamoto M. Oncology, 15;80(5-6):406-415 (2011)

⑭ Bilateral numb chin syndrome leading to a diagnosis of Burkitt's cell acute lymphocytic leukemia: a case report and literature review. Sasaki M, Yamazaki H, Aoki T, Ota Y, Sekiya R, Kaneko A, Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 査読有, 111(3): e11-16 (2010)

⑮ Analysis of risk factors for surgical-site infections in 276 oral cancer surgeries with microvascular free flap reconstructions at a single university hospital. Karakida K, Aoki T, Ota Y, Yamazaki H, Otsuru M, Takahashi M, Sakamoto H, Miyasaka M, J infection and chemotherapy, 査読有, 16(5): 334-339 (2010)

⑯ 高位に発生した頸部迷走神経鞘腫の1例. 佐藤祐介、太田嘉英、倉林宏考、佐々木剛史、

伊澤和三、山崎浩史、日本口腔腫瘍学会雑誌、  
査読有、22(4): 149-155 (2010)

⑰ Reduced transforming growth factor-beta receptor II expression in hepatocellular carcinoma correlates with intrahepatic metastasis. Mamiya T, Yamazaki K, Masugi Y, Mori T, Effendi K, Du W, Hibi T, Tanabe M, Ueda M, Takayama T, Sakamoto M. Lab. Invest., 2010 Sep;90(9):1339-45. Epub 2010 Jun 7.

⑱ Xenografted human amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells are immunologically tolerated and transdifferentiated into cardiomyocytes. Tsuji H, Miyoshi S, Ikegami Y, Hida N, Asada H, Togashi I, Suzuki J, Satake M, Nakamizo H, Tanaka M, Mori T, Segawa K, Nishiyama N, Inoue J, Makino H, Miyado K, Ogawa S, Yoshimura Y, Umezawa A. Circ. Res., 28;106(10):1613-23. 2010 May.

⑲ Bmi-1 gene is up-regulation in early-stage hepatocellular carcinoma and correlates with ATP-binding cassette transporter B1 expression. Effendi K, Mori T, Komuta M, Masugi Y, Wenlin Du, Sakamoto M. Cancer Sci., 666-72, 2010 Mar.

⑳ Parathyroid-related protein plays a critical role in bone invasion by oral squamous cell carcinoma. Int. J. Oncology, Takayama Y, Mori T, Nomura T, Shibahara T, Sakamoto M.;36(6):1387-94, 2010 Jun.

〔学会発表〕(計4件)

① 第67回日本口腔科学会総会 当科におけるアービタックス(cetuximab)の使用経験 山崎浩史 2013年5月24日(宇都宮)

② 第31回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会 ワークショップ3 「口腔癌の化学療法—RCTに向けて—」口腔扁平上皮癌術後補助療法における標準治療の検討 山崎浩史、2013年1月27日(秋葉原)

③ 第66回日本口腔科学会総会 化学療法が奏功した耳下腺上皮筋上皮癌肺転移症例 山崎浩史 2012年5月17日(広島)

④ 第30回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会 ワークショップ3 「口腔癌化学療法の現状—RCTに向けて—」当科で行った口腔扁平

上皮癌に対する化学療法の検討 山崎浩史、  
2012年1月27日(埼玉)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山崎 浩史 (YAMAZAKI HIROSHI)  
東海大学・医学部・准教授  
研究者番号：00338708

### (2) 連携研究者

森 泰昌 (MORI TAISUKE)  
独立行政法人国立がん研究センター・研究所・研究員  
研究者番号：00296708