

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592533

研究課題名(和文) 舌癌の上皮-間葉系移行(EMT)におけるラミニン 2鎖発現の意義に関する研究

研究課題名(英文) Impact of laminin gamma2 chain expression on the epithelial-mesenchymal transition of tongue cancer

研究代表者

倉富 勇一郎(Kuratomi, Yuichiro)

佐賀大学・医学部・准教授

研究者番号：30225247

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：手術切除した舌癌、扁桃癌切除標本を対象に、免疫組織化学的手法を用いて自然免疫応答を検討した。扁桃癌では舌癌に比べ、主な自然免疫細胞であるナチュラルキラー(NK)細胞とマクロファージの浸潤密度が有意に亢進していた。二重染色を用いて検討した結果、扁桃癌では舌癌に比べ、マクロファージによる癌細胞貪食像が有意に高頻度に観察された。これらの結果は扁桃癌では舌癌に比べ有意に強く自然免疫応答が誘導されていることを示しており、そのために扁桃癌原発巣の増殖が抑制されていることが示唆された。扁桃癌に対する強い自然免疫応答が原発不明頸部リンパ節転移の病態を形成する因子の一つである可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Infiltration of natural killer (NK) cells and macrophages, which are major innate immune cells, in surgically removed tumors from patients with tonsillar cancers and tongue cancers was immunohistochemically studied. Phagocytosis of the tumor cells by macrophages was studied by dual immunofluorescence labeling. The number of infiltrating NK cells and macrophages was significantly increased in locally limited tonsillar cancers in comparison to tongue cancers. The phagocytosis of tumor cells by macrophages was observed significantly more frequently in tonsillar cancers than in tongue cancers. These results indicated that the innate immune reactions were more strongly induced in locally limited tonsillar cancers than in tongue cancers, and might therefore suppress the growth of primary tumors in palatine tonsils. The innate immune reactions against cancers in palatine tonsils were suggested to be one of the possible etiologies for the developing of primary-unknown cervical metastases.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：舌癌 扁桃癌 浸潤 転移 免疫応答 原発不明癌 ラミニン

1. 研究開始当初の背景

ラミニン γ 2 鎖は気道や消化管の粘膜上皮を裏打ちする基底膜に存在するラミニン 332 の構成鎖である。悪性腫瘍との関連では、様々なヒト癌の浸潤先進部位にラミニン γ 2 鎖が発現しており、その発現が強いほど予後が不良であることが示されている。申請者らはヒト進行舌扁平上皮癌において、胞巣性増殖では癌胞巣の辺縁細胞のみにラミニン γ 2 鎖の発現がみられるのに対し、分散性浸潤ではラミニン γ 2 鎖の恒常的なびまん性発現がみられ、びまん性発現型の予後が不良であることを報告した (Kuratomi Y, Oral Oncol, 2006)。

癌細胞の細胞間接着が低下し分散性浸潤能を獲得する過程は上皮 - 間葉系移行 (Epithelial-Mesenchymal Transition; EMT) と考えられており、細胞形態も間葉系細胞に特徴的な紡錘型となる。EMT は E-cadherin/ β -catenin 系に代表される細胞間接着因子、EGF/TGF- β などの増殖因子とその受容体、さらには Snail や Twist などの転写因子など、様々な因子が複雑に絡み合いながら誘導されることが次第に明らかになってきた (Kalluri R & Weinberg RA, J Clin Inv, 2009)。分散性に浸潤する舌癌細胞はラミニン γ 2 鎖を恒常的に発現しており、肝臓癌においてはラミニン γ 2 鎖が TGF- β と協調し EMT を誘導することが報告されているが (Giannelli G, Gastroenterology, 2005)、舌癌の EMT の誘導におけるラミニン γ 2 鎖の意義については不明な点が多い。

また、癌の浸潤・転移過程において免疫応答が重要な働きを示すことが知られているが、舌癌に対する自然免疫応答についての詳細な検討は行われていない。加えて免疫器官である口蓋扁

桃に発生する中咽頭癌は、しばしば狭義の原発不明癌において微小な原発巣であることや、ヒト乳頭腫ウイルス (HPV) 感染に伴う癌では臨床病期進行例でも良好な予後を示すなど、他の頭頸部癌とは異なる挙動を示すことがある。こうした生物学的特徴には扁桃という免疫器官に発生することが関与していることが想定されるが、扁桃癌についても自然免疫応答に関する詳細な検討は行われていない。

2. 研究の目的

研究のゴールは舌癌細胞の浸潤・転移のメカニズムを解明し、舌癌の浸潤・転移能を表す新たなバイオマーカーの探索や、浸潤・転移に対する新たな治療法の開発につなげることである。そこで本研究ではヒト舌癌が胞巣性増殖から分散性の浸潤能を獲得する EMT におけるラミニン γ 2 鎖の働きを解明することが目的の一つである。

さらには、舌癌細胞の浸潤・転移に対する自然免疫応答について口蓋扁桃癌を対象として調べ、自然免疫応答が及ぼす舌癌、扁桃癌の増殖や浸潤に対する影響について検討することが、二つ目の目的である。

3. 研究の方法

1) 舌癌におけるラミニン γ 2 鎖発現と EMT 誘導の関連に関する研究

佐賀大学医学部附属病院耳鼻咽喉科にて手術切除した舌癌切除標本のパラフィンブロックから薄切切片を作成し、ラミニン γ 2 鎖、E-cadherin、 β -catenin に対するモノクローナル抗体を用いて、それぞれの発現を免疫組織化学的に検討した。

2) 舌癌、扁桃癌に対する自然免疫応答に関する研究

佐賀大学医学部附属病院耳鼻咽喉科にて手術切除した舌癌、扁桃癌のうち、原発巣限局型 (T1, T2) である切除標本を対象として、パラフィンブロックから薄切片を作成した。自然免疫応答として Natural Killer 細胞 (NK 細胞) とマクロファージの浸潤密度を、それぞれに対するモノクローナル抗体を用いて免疫組織化学的に検討した。また、二重免疫蛍光法を用いてマクロファージによる癌細胞貪食像の有無を検討した。

4. 研究成果

研究期間前半において手術切除した舌癌の多くが、頸部リンパ節転移を伴わず癌細胞同士が接着した胞巣性増殖を示すタイプであったため、同一症例内で胞巣性増殖から分散性浸潤に移行するタイプは観察されなかった。一方で、舌癌に対する自然免疫応答の研究において後述する興味深い結果が得られたため、研究の主眼を、舌癌切除標本を用いたラミニン γ 2 鎖発現と EMT 誘導の関連についての検討から、扁桃癌、舌癌に対する自然免疫応答に関する検討に移行した。

扁桃癌、舌癌に対する自然免疫応答に関する検討

原発巣限局型 (T1, T2) 舌癌と原発巣限局型 (T1, T2) 扁桃癌における自然免疫系細胞 (Natural Killer (NK) 細胞、マクロファージ) の癌組織への浸潤密度を、免疫組織学的に調べたところ、以下の結果が得られた。

原発巣限局型扁桃癌では舌癌に比べ、癌細胞周囲に有意に多数の NK 細胞やマクロファージの浸潤がみられた。

原発巣限局型扁桃癌では舌癌に比べ、有意に高頻度にマクロファージによる癌細胞の貪食像が観察された。

舌癌において頸部リンパ節転移を伴

う群では、伴わない群に比べて、マクロファージの浸潤密度が有意に高かった。

以上の結果から、原発巣限局型扁桃癌では舌癌に比べ強い自然免疫応答がみられていることが判明した。扁桃癌では原発巣が限局し微小であるのにもかかわらず (T1, 2) 頸部リンパ節転移を伴うことがしばしば観察される。こうした扁桃癌の生物学的特徴の一つは、扁桃癌原発巣が限局している状態で頸部リンパ節転移を生じているというよりも、扁桃癌に対する NK 細胞、マクロファージ等の自然免疫応答により扁桃癌原発巣の増殖が抑制されているためである可能性が示唆された。

さらには、扁桃癌細胞が自然免疫応答により扁桃組織から排除されてしまえば、真の原発不明癌の臨床像に一致することから、これらを検証するために、原発不明癌において原発巣探索を目的として扁桃摘出を行ったものの癌組織を認めなかった扁桃組織において、NK 細胞やマクロファージの浸潤像を免疫組織学的に検討した。ただしこれまでに、癌組織のない扁桃組織で自然免疫細胞浸潤が亢進している像は観察されなかった。

一方、腫瘍内に浸潤したマクロファージは脈管新生を誘導することが報告されており、舌癌についてのの結果から、舌癌におけるマクロファージ浸潤が脈管新生を介して頸部リンパ節転移を誘導している可能性が示唆された。

以上のように、舌癌、扁桃癌に対する自然免疫応答は極めて異なる挙動を示していることが分かった。こうした自然免疫応答が原発不明癌の病態を成立させるメカニズムや、扁桃癌、舌癌の頸部リンパ節転移に関与するメカニズムについて今後検討していきたい。さらには HPV 関連扁桃癌の生物学的特徴に関与する免疫

応答についても今後の検討を行っていき
たいと考えている。

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10件)

1. Shimazu R, Kuratomi Y, Aoki S, Inokuchi A. Laryngeal granuloma in experimental rats with gastroesophageal reflux disease and mechanically injured vocal cord mucosa. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 123; 247-251, 2014. 査読有
2. 井之口昭、斎藤真貴子、倉富勇一郎: 検査結果をどう読むか? 口腔・咽頭の検査味覚検査. *JOHNS* 29; 1599-1601, 2013. 査読無
3. 井之口昭、倉富勇一郎、門司幹男: 味覚の閾値変化. *JOHNS* 29; 73-57, 2013. 査読無
4. 山口陽生、倉富勇一郎、佐藤慎太郎、門司幹男、井之口昭: 頸部外切開により摘出した咽頭腔外魚骨異物の1例. *日気食会報*, 64; 281-286, 2013. 査読有
5. Kuratomi Y, Kusano K, Shimazu R, Inokuchi A. Innate immune reactions in locally limited tonsillar cancer. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 270; 2751-2758, 2013. 査読有
6. Sato S, Kuratomi Y, Inokuchi A. Pathological characteristics of the epiglottis relevant to acute epiglottitis. *Auris Nasus Larynx* 39; 507-511, 2012. 査読有
7. 鈴木久美子、倉富勇一郎、宮崎純二、佐藤慎太郎、島津倫太郎、井之口昭: 声門下喉頭膿瘍の2症例. *日気食会報* 63: 254-261, 2012. 査読有
8. 島津倫太郎、倉富勇一郎、青木茂久、井之口昭: GERD 研究の最先端 基礎から臨床へ 胃酸逆流と喉頭肉芽種 - 動物モデルを用いた検討 - *日気食会報* 63: 104-108, 2012. 査読有
9. 倉富勇一郎、佐藤慎太郎、鈴木久美子、門司幹男、井之口昭: 局所進行舌癌 T3-4 の外科的治療 旁咽頭～下顎角内側部再発と内側翼突筋切除に関する検討 *頭頸部癌* 38: 26-32, 2012. 査読有
10. Sato S, Kuratomi Y, Yamasaki F, Inokuchi A. A case of typical carcinoid of the larynx. *Case Rep Otolaryngol Epub* Apr 23, 2012. 査読有

[学会発表](計22件)

1. 斎藤真貴子、佐藤慎太郎、倉富勇一郎: 診断に苦慮した稀な喉頭紡錘型細胞腫瘍の1例. 第26回日本喉頭科学会、2014年3月6～7日、那覇市.
2. 佐藤慎太郎、倉富勇一郎: 耳管原発の上咽頭高分化脂肪肉腫の1例. 第24回日本頭頸部外科学会、2014年1月30～31日、高松市.
3. 峯崎晃充、嶋崎絵里子、斎藤真貴子、鈴木久美子、門司幹男、佐藤慎太郎、島津倫太郎、倉富勇一郎: 当科における Cetuximab の使用経験. 第105回日耳鼻佐賀県地方部会、2013年12月7日、佐賀市.
4. 嶋崎絵里子、門司幹男、倉富勇一郎: 上顎洞腺癌と涙囊扁平上皮癌を同時重複した1例. 第105回日耳鼻佐賀県地方部会、2013年12月7日、佐賀市.
5. 斎藤真貴子、佐藤慎太郎、倉富勇一郎: 診断に苦慮した稀な喉頭紡錘型細胞腫瘍の1例. 第105回日耳鼻佐賀県地方部会、2013年12月7日、佐賀市.
6. 佐藤慎太郎、鈴木久美子、倉富勇一郎: 頭位めまい発作を伴った放射線治療後

- 側頭骨壊死の1例. 第105回日耳鼻佐賀県地方部会, 2013年12月7日, 佐賀市.
7. 鈴木久美子, 佐藤慎太郎, 門司幹男, 齋藤真貴子, 倉富勇一郎: 浸潤型鼻副鼻腔真菌症に対する抗真菌剤投与に関する検討. 第52回日本鼻科学会, 2013年, 9月26~27日, 福井市.
 8. 鈴木久美子, 佐藤慎太郎, 山口陽生, 倉富勇一郎: 診断に苦慮した耳下腺上皮筋上皮癌の1症例. 第28回日耳鼻九州連合地方部会, 2013年6月22日, 長崎市.
 9. 佐藤慎太郎, 倉富勇一郎: 乳突腔型先天性真珠腫の1例. 第28回日耳鼻九州連合地方部会, 2013年6月22日, 長崎市.
 10. 鈴木久美子, 倉富勇一郎, 井之口昭: 側頭骨に再発した成人T細胞白血病/リンパ腫の1例. 第75回耳鼻咽喉科臨床学会, 2013年7月11~12日, 神戸市.
 11. 佐藤慎太郎, 山口陽生, 倉富勇一郎: 舌根部原発の明細胞癌の1例. 第37回日本頭頸部癌学会, 2013年6月12~14日, 東京都.
 12. 門司幹男, 倉富勇一郎, 井之口昭: 当科における小児難聴症例の検討 - 画像診断を中心に -. 第114回日本耳鼻咽喉科学会, 2013年5月15~18日, 札幌市.
 13. 鈴木久美子, 倉富勇一郎, 井之口昭: 当科における鼻副鼻腔真菌症例の検討. 第114回日本耳鼻咽喉科学会, 2013年5月15~18日, 札幌市.
 14. 鈴木久美子, 倉富勇一郎, 島津倫太郎, 門司幹男, 井之口昭: 当科における軟口蓋腫瘍の検討. 第36回日本頭頸部癌学会, 2012年6月7~8日, 米子市.
 15. 門司幹男, 倉富勇一郎, 井之口昭: 反復性多発頸部膿瘍の1例. 第113回日本耳鼻咽喉科学会, 2012年5月10~12日, 新潟市.
 16. 佐藤慎太郎, 倉富勇一郎, 井之口昭: 当科における耳下腺良性疾患手術症例の検討. 第113回日本耳鼻咽喉科学会, 2012年5月10~12日, 新潟市.
 17. 倉富勇一郎, 鈴木久美子, 佐藤慎太郎, 門司幹男, 井之口昭: 舌根部浸潤を伴う舌癌に対する旁咽頭郭清・内側翼突筋下部切除術. 第36回日本頭頸部癌学会, 2012年6月7~8日, 米子市.
 18. Shimazu R, Kuratomi Y, Inokuchi A: Experimental Laryngeal Granuloma in Rats with GERD. 第116回 米国耳鼻咽喉科頭頸部外科学会 (AAO-HNSF 2012), 2012年9月9日~2012年9月12日, ワシントン DC, 米国.
 19. Kuratomi Y, Kusano K, Shimazu R, Inokuchi A: Innate Immune Reactions in Locally Early Tonsillar Cancer. 第116回 米国耳鼻咽喉科頭頸部外科学会 (AAO-HNSF 2012), 2012年9月9日~2012年9月12日, ワシントン DC, 米国.
 20. 佐藤慎太郎, 倉富勇一郎, 井之口昭: 喉頭蓋に著明な腫脹を呈した肉芽腫性喉頭炎の1例. 日本喉頭科学会, 2012年3月8日, 金沢市.
 21. 門司幹男, 倉富勇一郎, 井之口昭: 成人の急性声門下喉頭炎の2例. 日本喉頭科学会, 2012年3月8日, 金沢市.
 22. 倉富勇一郎, 佐藤慎太郎, 門司幹男, 鈴木久美子, 島津倫太郎, 井之口昭, 上村哲司, 徳丸直郎: 当科における局所進行舌癌の治療成績の検討. 日本頭頸部癌学会, 2011年6月9日, 名古屋市.
- 〔図書〕(計1件)
1. 倉富勇一郎: 咽頭癌・喉頭癌を見逃さないための留意点は? ENT 臨床フロンティア のどの異常とプライマリケア. 145 -

148、中山書店、東京、2013.

〔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〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

倉富 勇一郎 (Kuratomi, Yuichiro)
佐賀大学・医学部・准教授
研究者番号：30225247

(2) 研究分担者

佐藤 慎太郎 (Sato, Shintaro)
佐賀大学・医学部・講師
研究者番号：50304910

門司 幹男 (Monji, Mikio)
佐賀大学・医学部・助教
研究者番号：90380782

(3) 連携研究者

()

研究者番号：