

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659888

研究課題名(和文) 遺伝的相同性に基づく口腔癌頸部リンパ節転移経路の解析

研究課題名(英文) Study for the channel of cervical lymph node metastases in oral cancers by genetic analyses

研究代表者

鷓澤 成一 (UZAWA, NARIKAZU)

東京医科歯科大学・歯学部附属病院・講師

研究者番号：30345285

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：今回の研究により、病理パラフィン包埋標本から網羅的コピー数解析が可能であること。原発巣と転移巣では遺伝的変異の状況がかなり異なり、遺伝的変異のみで経路を解析することが困難であること。それには、原発巣内のheterogeneityが大きく影響している可能性が高いこと。などの新たな知見が得られた。原発巣のheterogeneityを、原発巣の複数部位のサンプリングと同一検体のリンパ節転移巣由来のサンプルを対象とした次世代シーケンサー、SNPs arrayを組み合わせた解析を行うことにより、原発巣のheterogeneityと同一検体のリンパ節転移巣を評価する必要性がある。

研究成果の概要(英文)：It is widely accepted that the presence of metastasis in cervical lymph nodes is a reliable prognostic indicator of survival and disease recurrence in head and neck cancer including oral squamous cell carcinomas. However, the details of the mechanism of lymph node metastases remain unidentified. In this study, we tried to investigate the channel of cervical lymph node metastases in oral cancers using SNPs microarray analysis. The present study has demonstrated those cervical lymph node metastases are phenomena more complicated more than expected. It is thought that intratumor heterogeneity of the primary site greatly influences it.

研究分野：医歯薬学

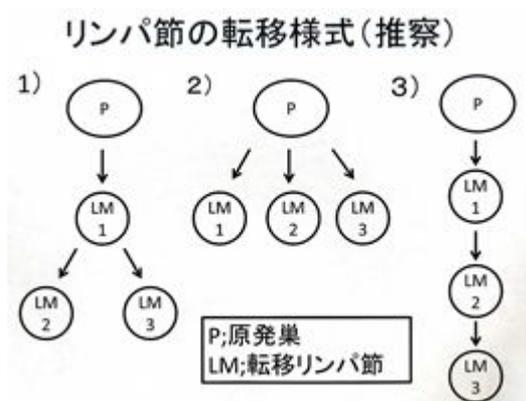
科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：リンパ節 ゲノム 口腔 癌 転移

1. 研究開始当初の背景

近年、診断技術・治療法の向上、及び早期発見・早期治療の概念の啓蒙により、癌の治療成績は確実に向上しているが、依然として癌による死亡が本邦における死亡原因の第一位を占めている。一方、口腔癌は他の臓器に比べ、早期発見、早期治療が可能であると言われていたが、その治療成績は満足されるべきものではない。口腔癌の治療成績をさらに向上させるためには、原発巣を制御することはもちろんであるが、頸部リンパ節転移の制御が極めて重要である。特に、初診時に頸部リンパ節に転移が認められなかったのに、原発巣治療後に転移リンパ節が発見される、いわゆる後発頸部リンパ節転移は治療成績を低下させる重要な臨床的因子の一つである。しかし、後発頸部リンパ節転移を予測して、予防的に頸部郭清を行うか、原発巣のみを治療して、十分な経過観察を行い、リンパ節転移が認められた時点で頸部郭清を行うか、議論が分かれている。癌の根治性を損なわずに患者の QOL を維持する方法としてセンチネルリンパ節生検という技法が存在する。腫瘍から直接、最初のリンパ流を受けるリンパ節をセンチネルリンパ節とし、癌の転移が初発すると考える理論であり、リンパ行性転移をおこす乳癌、悪性黒色腫では平成 22 年度より保険診療として承認されているものの、口腔癌においては臨床研究段階であり、その確実性は明らかにされていない。

リンパ流の構成については下図のように大きく 3 パターンが考えられる。1) 原発巣から遊離した癌細胞が、まずあるリンパ節定着してそこを基点に他のリンパ節に癌が広がっていく、2) 原発巣から枝分かれしたリンパ流により癌がそれぞれのリンパ節に到達していく、3) リンパ流は連続した流れを形成しており、原発巣から遊離した癌細胞はまず 1 つのリンパ節で増殖、その後次のリンパ節へリンパ管を通して癌細胞が遊離し定着するという過程を繰り返していく。この仮説 1)、3) はセンチネルリンパ節理論と一致する。



2. 研究の目的

本研究課題の目的は、複数の頸部転移リンパ節を認めた症例において SNPs アレイを用

い、原発巣と頸部リンパ節の DNA レベルにおける遺伝学的同一性を比較することにより、リンパ流の経路を解明し、センチネルリンパ節理論は口腔癌では成立するのか、センチネルリンパ節とされるリンパ節には他のリンパ節と比べてどのような遺伝的特徴をもつのか、また、原発巣からどのようなメカニズムで頸部リンパ節に転移が広がっていくのかを明らかにしていくことである。

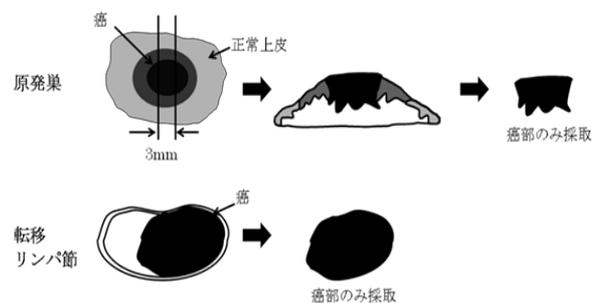
また同時に、個々の転移リンパ節内での癌細胞の浸潤様式と遺伝学的情報、臨床病理学的情報を合わせ、予後予測を可能とするリンパ節内浸潤様式の分類法についても検討を行う。

3. 研究の方法

(1) レーザーマイクロダイセクション (LMD) による選択的サンプル採取と DNA 抽出

本研究では DNA を対象とするため、サンプル採取の際の非癌部の混入を最小限にする必要がある。さらに、リンパ節転移巣については癌部が微小である症例もあり、通常のサンプル採取法では癌部と非癌部が混在してしまい正確な解析を行うことができない。そこで、原発巣、リンパ節転移巣ともに、癌部と非癌部の区別を確実にを行うため、今回の研究では次のような採取方法を用いることとした。

まず、手術による腫瘍切除後、可及的にすばやく 3mm 幅に設定した 2 枚刃の切り出し用ナイフにて、腫瘍中心部から厚さ 3mm 程度の全割標本を採取し、液体窒素にて凍結する。凍結保存された検体はレーザーマイクロダイセクション (LMD) をおこなうためにクライオスタートにて 8µm に薄切し、LMD 専用プレパラートを作製しアルコール・酢酸固定後 HE 染色を行う。同時に、薄切サンプルから HE 染色したサンプル分類用パイロットプレパラートを作製し、病理組織学的評価を行う。サンプル分類用パイロットプレパラートの検討に基づき、作製された LMD 専用プレパラートから LMD を用いてサンプル (癌部) を選択的に分別回収する。回収したサンプルより直ちに DNA を抽出し、保存する。



(2) マイクロアレイ解析のための DNA の増幅とアレイ解析

先の工程により得られた DNA は微量 (~数十 ng) であるためマイクロアレイ解析 (数十 mg) を行う場合には量的増幅 (100 万倍程度) が必

要となると試算している。したがって、マイクロアレイ解析対象症例ではDNA抽出直後に線形増幅を行う。DNAの増幅には市販のキットを利用する。

DNAサンプルの解析には、すでに我々のグループで解析を行っているHigh density SNPマイクロアレイ(Affymetrix GeneChip Human Mapping 500K Array set)を用いて解析を進める。同アレイ解析により、原発巣および転移巣で生じていると思われる、全ゲノム上の50万部位のSNPs(1塩基多型)のコピー数の変化を1度の解析で行うことが可能である。その結果、原発巣と各リンパ節転移巣のDNA phenotype(全ゲノムにおけるコピー数変化のパターン)を確定することができる。そして、それらのDNA phenotypeを原発巣と転移巣、あるいは転移巣同士と比較し、遺伝学的同一性について検討を行う。原発巣のDNA phenotypeとの同一性の高い転移リンパ節が、より初期の段階で転移を起こしたリンパ節と考え、一方、原発巣のDNA phenotypeとの同一性の低い転移リンパ節は、他のリンパ節に転移が生じた後に生じた転移リンパ節と考えることにより、リンパ節転移がどのように進行していくか推察し、転移形成のメカニズムを検討していく。

(3) 転移リンパ節における浸潤様式の検討

転移リンパ節のHE染色像より、浸潤様式を分類する。浸潤様式の例としては、リンパ門周囲で転移が生じているもの、被膜付近に転移を認めるもの、転移がリンパ節全体に及び内部が壊死しているもの、など様々な分類があげられるが、臨床病理学的因子と合わせてより臨床上有用となる分類法を検討していく。特に、我々の口腔癌127例を対象とした研究においても、カプランマイヤー法および多変量解析により、被膜外浸潤(ECS)が頸部リンパ節転移の有無以上に重要な予後因子であることが明らかとなっているように、ECSを認めた症例についてはさらに詳細な分類法が必要と考えられる。また、複数個の転移リンパ節を認めた症例については、それぞれのリンパ節転移巣の浸潤様式の評価を行い、同一症例内での浸潤様式の違いや、どのリンパ節を予後評価に用いるべきかなどについて検討していく。

4. 研究成果

(1) 高密度(一塩基多型)SNPs Microarraysを利用して、口腔癌のホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)組織標本を利用し、全染色体上の約60万か所を超えるコピー数変異を解析し、原発巣と複数の転移リンパ節間のコピー数変異の一致率を検討することにより、原発巣内のheterogeneityが転移巣形成にどのような影響をあたえているのか検証した。対象症例として口底癌同時性頸部リンパ節転移例を用いた。原発巣、3つの領域(レベルI A, I B,)の頸部リンパ節転移巣のFFPE標本よりDNAを抽出・精製し、修復

したDNAをHuman OmniExpress_FFPE-12(Illumina)を用いて全ゲノムを対象にジェノタイピングアッセイし、ゲノム上約69万か所のSNPs部位のCNVを評価した。その結果、同じ原発巣から生じ、臨床的に同時性と評価された転移リンパ節内の癌細胞であっても、その染色体上の領域のコピー数変異の内容は大きく異なることが判明した。しかし、原発巣と同時性あるいは異時性頸部リンパ節転移巣との同一性についてはコントロールがなく、さらに多くの検体を解析してゆく必要があることがわかった。そこで、さらに我々は、舌癌原発巣5例、それらの同時性1例、異時性4例の頸部リンパ節転移巣FFPE標本よりDNAを抽出・精製し、DNAの修復を行わないで網羅的遺伝子解析が可能とし、癌検体に特化したマイクロアレイ:Oncoscan(Affymetrix)を用いて解析した。その結果については、現在も解析中である。

(2) 同一口腔癌検体内の遺伝性多様性の解析に適した検体採取法を確立し、同方法を用いて口腔扁平上皮癌一次症例から20検体を採取した。そのうち10検体よりサンプル分類用パイロットプレパラートを作製し、病理組織学的評価を行い、これをもとに、レーザーマイクロダイセクションにより、各検体の癌部、上皮異型性部、および正常粘膜部からサンプルを採取し、DNA, RNAを抽出した。さらに、網羅的発現解析を行い、癌化にともない、発現が有意に上昇あるいは減弱する15遺伝子を同定した。さらに、これらの遺伝子の発現をリアルタイムPCRにて確認し、癌化にともない発現が上昇する1種類の遺伝子について口腔癌、白板症などの口腔癌前癌病変、および正常口腔粘膜について免疫染色にて発現レベルを解析した結果、同遺伝子が口腔癌の発癌に深く関与しているだけでなく、上皮性異型性の発症にも関与していることが判明した。Int J Cancer. 132(3): 540-548 2013.

(3) 口腔癌原発巣における脈管侵襲の有無と予後、リンパ節転移との関連について解析した。脈管侵襲の有無については、通常のHE染色では不確実であるため、EVG染色および特殊染色により評価した。その結果、リンパ管侵襲とリンパ節転移は有意な相関性が認められたが、予後との相関性は認められなかった。一方、静脈侵襲に関しては、その逆で、リンパ節転移との関連性は認められなかったが、予後との間に有意な関連性が認められた。Oral oncology. 48(4): 320-324 2012.

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11件)

1) Endo H, Muramatsu T, Furuta M, Uzawa N, Pimkhaokham A, Amagasa T, Inazawa J, Kozaki K. Potential of tumor-suppressive

- miR-596 targeting LGALS3BP as a therapeutic agent in oral cancer. *Carcinogenesis*. 34(3): 560-569. 2013 doi:10.1093/carcin/bgs376. Epub 2012 Dec 10. PubMed PMID: 23233740. 査読有
- 2) 山城正司、鈴木美保、道泰之、**鶴澤成一**、原田清、原口美穂子、隅田由香、谷口尚、矢野智之、岡崎睦：機能温存を目指した口腔癌治療：咀嚼機能について **頭頸部癌** 39(1): 9-15, 2013 査読有
 - 3) Harazono Y, Muramatsu T, Endo H, Uzawa N, Kawano T, Harada K, Inazawa J, Kozaki K. miR-655 Is an EMT-suppressive MicroRNA targeting ZEB1 and TGFBR2. *PLoS One*. 14;8(5):e62757. 2013. doi:10.1371/journal.pone.0062757. 査読有
 - 4) **鶴澤成一**、鈴木美保、中久木康一、道泰之、山城正司、原田清：シンポジウム「軟組織再建 - 患者のQOL向上を目指して」前腕皮弁について **日本口腔腫瘍学会誌** 25(4): 151-159, 2013 査読有
 - 5) Kurasawa Y, Kozaki K, Pimkhaokham A, Muramatsu T, Ono H, Ishihara T, Uzawa N, Imoto I, Amagasa T, Inazawa J. Stabilization of phenotypic plasticity through mesenchymal-specific DNA hypermethylation in cancer cells. *Oncogene*. 31(15): 1963-1974 2012. doi: 10.1038/onc.2011.373. 査読有
 - 6) Michikawa C, Uzawa N, Kayamori K, Sonoda I, Ohyama Y, Okada N, Yamaguchi A, Amagasa T. Clinical significance of lymphatic and blood vessel invasion in oral squamous cell carcinomas. *Oral oncology*. 48(4): 320-324 2012. doi: 10.1016/j.oraloncology.2011.11.014. 査読有
 - 7) Miyaguchi K, Uzawa N, Mogushi K, Takahashi K, Michikawa C, Nakata Y, Sumino J, Okada N, Mizushima H, Fukuoka Y, Tanaka H. Loss of NKX3-1 as a potential marker for an increased risk of occult lymph node metastasis and poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. *Int. J. Oncol*. 40(6): 1907-1914 2012. doi: 10.3892/ijo.2012.1373. 査読有
 - 8) Kurohara K, Uzawa N, Michi Y, Harada K. A Neuroendocrine Tumor in the Maxilla. *J Oral Maxillofac Surg*. 70(11): e679-682 2012. doi: 10.1016/j.joms.2012.06.183. 査読有
 - 9) Sumino J, Uzawa N, Okada N, Miyaguchi K, Mogushi K, Takahashi K, Sato H, Michikawa C, Nakata Y, Tanaka H, Amagasa T. Gene expression changes in initiation and progression of oral squamous cell carcinomas revealed by laser microdissection and oligonucleotide microarray analysis. *Int J Cancer*. 132(3): 540-548 2013. doi:10.1002/ijc.27702. 査読有
 - 10) 川俣綾、山田峻之、鈴木美保、道泰之、**鶴澤成一**、山城正司：舌下腺に発生した限局性結節性アミロイドーシスの1例 **日口外誌** 59巻1号 38-42 2013
 - 11) 園田格、**鶴澤成一**、山口聡、山城正司、原田清：遺伝性血管性浮腫の小児に対して下顎の含歯性嚢胞摘出術を行った1例 **日口外誌** 59巻3号 192-196、2013
- 〔学会発表〕(計19件)
- 1) 炭野淳、**鶴澤成一**、名生邦彦、鈴木美保、大山巖雄、道泰之、原田清：口腔癌の術後後発頸部リンパ節転移の発見の契機に関する検討．第58回日本口腔外科学会総会・学術大会 2013年10月11-13日、福岡
 - 2) Yosuke Harazono, Ken-ichi Kozaki, Tomoki Muramatsu, Hironori Endo, **Narikazu Uzawa**, Tatsuyuki Kawano, Kiyoshi Harada, Johji Inazawa: miR-655 is an EMT-suppressive microRNA targeting ZEB1 and TGFBR2 AACR/JCA Joint Conference, February 21-25, 2013 Maui, HI USA
 - 3) **Narikazu Uzawa**, Miho Suzuki, Yasuyuki Michi, Masashi Yamashiro, Kiyoshi Harada: Microsurgical Free Flap Reconstructions of Head and Neck Region in 401 cases: A 25-Year Experience. 21st International Conference on Oral and Maxillofacial Surgery Oct 21-24, 2013, Barcelona
 - 4) Chieko Michikawa, **Narikazu Uzawa**, Toshiyuki Izumo, Akira Yamaguchi, Kiyoshi Harada: Classification of extracapsular spread of the lymph node metastasis in oral cancer. 21st International Conference on Oral and Maxillofacial Surgery Oct 21-24, 2013, Barcelona
 - 5) SONODA Itaru, **UZAWA Narikazu**, SAKAMOTO Kei, HARADA Kiyoshi: Two cases of Plasmocytosis Circumorificialis. 21st International Conference on Oral and Maxillofacial Surgery Oct 21-24, 2013, Barcelona
 - 6) Tomomatsu N, **Uzawa N**, Aragaki T, Yoshitake H, Suzuki M, Watanabe Y, Harada K: A prognostic factor of the odontogenic maxillary sinusitis. 21st International Conference on Oral and Maxillofacial Surgery Oct 21-24, 2013, Barcelona
 - 7) 道川千絵子、**鶴澤成一**、炭野淳、守谷友二郎、森田琢磨、出雲俊之、山口朗、原田清：被膜外浸潤の分類に関する検討 第47回 NPO 法人日本口腔外科学会関東地方部会 2013年9月28日 東京

- 8) 道川千絵子、鶴澤成一、炭野淳、守谷友二郎、森田琢磨、原田清、山口朗、出雲俊之：被膜外浸潤を生じた転移リンパ節の分類：第 37 回日本頭頸部癌学会 2013 年 6 月 13 日 東京
- 9) 守谷友二郎、鶴澤成一、高橋謙一郎、道川千絵子、炭野淳、原田清：上皮性異形成の癌化に特異的に関与する遺伝子の発現について：第 67 回日本口腔科学会学術集会 2013 年 5 月 24 日 宇都宮
- 10) 高橋謙一郎、鶴澤成一、茂櫛薫、田中博、原田清：高密度 SNPs Microarray を用いた口腔扁平上皮癌原発巣と転移巣間での遺伝子 CNV 解析：第 67 回日本口腔科学会学術集会 2013 年 5 月 23 日 宇都宮
- 11) 鶴澤成一、鈴木美保、道泰之、山城正司、原田清：401 遊離皮弁を用いた頭頸部再建の臨床的検討：第 67 回日本口腔科学会学術集会 2013 年 5 月 23 日 宇都宮
- 12) 道川千絵子、鶴澤成一、炭野淳、守谷友二郎、山城正司、原田清、山口朗、出雲俊之：被膜外浸潤を生じたリンパ節についての検討 第 31 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会 2012 年 1 月 24 日 東京
- 13) 鶴澤成一、山城正司、原田清：シンポジウム 1 軟組織再建 前腕皮弁 第 31 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会 2012 年 1 月 24 日 東京
- 14) 高橋謙一郎、鶴澤成一、儀武啓幸、中久木康一、原田清：原発巣に対して著しく進展した頸部リンパ節転移を認めた口底癌の 1 例 第 57 回日本口腔外科学会総会 2012 年 10 月 19 日 横浜
- 15) 炭野淳、鶴澤成一、高橋謙一郎、中田好美、守谷友二郎、道川千絵子、岡田憲彦、山城正司、原田清：口腔癌の発生・進展過程に関与している遺伝子の同定 第 57 回日本口腔外科学会総会 2012 年 10 月 19 日 横浜
- 16) 鶴澤成一、三浦千佳、鈴木美保、友松伸允、出雲俊之、原田清：上顎に発生したエナメル上皮癌の 1 例 第 57 回日本口腔外科学会総会 2012 年 10 月 21 日 横浜
- 17) 道川千絵子、鶴澤成一、炭野淳、守谷友二郎、山城正司、原田清、山口朗、出雲俊之：舌扁平上皮癌におけるポドプラニン発現様式の検索 第 57 回日本口腔外科学会総会 2012 年 10 月 20 日 横浜
- 18) 炭野淳、鶴澤成一、高橋謙一郎、中田好美、守谷友二郎、宮口健、茂櫛薫、田中博、道川千絵子、岡田憲彦、山城正司：口腔癌の同一固体内の遺伝子発現の変化 第 35 回日本頭頸部癌学会 2012 年 6 月 7 日 島根
- 19) 守谷友二郎、鶴澤成一、炭野淳、中

田好美、山城正司：口腔扁平上皮癌、上皮性異形成における HIF-1 および関連遺伝子群の検討 第 66 回日本口腔科学会学術集会 2012 年 5 月 18 日 広島

〔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〕
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者
鶴澤 成一 (UZAWA NARIKAZU)
東京医科歯科大学・歯学部附属病院・講師
研究者番号：30345285

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし