

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25463117

研究課題名(和文) 口腔扁平上皮癌発生母細胞の同定とその臨床的意義

研究課題名(英文) Identification of the original cells for oral squamous cell carcinoma and its clinical significance

研究代表者

川又 均 (KAWAMATA, HITOSHI)

獨協医科大学・医学部・教授

研究者番号：70224847

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：6名の口底扁平上皮癌患者の癌組織のmRNA発現パターンを29098遺伝子のマイクロアレイで解析を行った。クラスタリング解析の結果、6症例は口腔粘膜の発現パターンを示し、2症例は唾液腺の発現パターンを示した。さらに口腔扁平上皮癌の発生母細胞を同定する9個の遺伝子を絞り込んだ。9個のマーカー遺伝子を用い、73症例の口腔扁平上皮癌の発生母細胞の同定をPCRにて行った。73症例中12症例が小唾液腺由来であることが明らかとなり、それらの症例は高転移能を有し予後も不良であることが明らかとなった。結論として、口腔扁平上皮癌細胞の発生母細胞を同定することは治療方法を決定する上で有用であることが示された。

研究成果の概要(英文)：The mRNA expression profile of samples obtained from 6 patients with SCC of the oral floor was analyzed by microarray containing 29,098 genes. Clustering analysis of the expression level revealed that the 6 samples can be divided into 2 groups. The expression profile in four cases was similar to that of normal oral squamous epithelium, and in two cases was similar to that of normal salivary glands. Furthermore, we identified nine genes that reveal the origin of the oral SCC. Subsequently, we examined the expression levels of these 9 marker genes by reverse transcriptase-polymerase chain reaction to determine the origin of 73 oral SCCs. Twelve of the 73 oral SCCs were considered to originate from minor salivary glands, and these tumors showed high metastatic potential and poor overall survival rate. In conclusion, determination of the origin of the oral SCC is helpful when making a treatment plan for patients with oral SCC.

研究分野：口腔外科学

キーワード：口腔扁平上皮癌 発生母細胞 口腔粘膜由来 唾液腺由来 予後 治療方法 マイクロアレイ クラスタリング

## 1. 研究開始当初の背景

最近の再生医学の進歩により、多くの体細胞性幹細胞が同定され、従来考えられていた上皮、間葉、神経、血球の幹細胞の明確な区別はなくなりつつある。たとえば、肝細胞や血管内皮細胞の幹細胞は骨髄由来で循環血液中に存在することが証明された。また、最近、消化管上皮細胞の再生にも骨髄由来幹細胞が関与する可能性があることが示され、骨髄由来の細胞から胃癌が発生しうることが証明された。

口腔癌の多くは扁平上皮癌 (SCC) であるが、粘表皮癌や腺様嚢胞癌など唾液腺由来の癌が約 10% 存在する。口腔粘膜には約 3000 個の小唾液腺が存在するといわれており、我々は扁平上皮癌と診断された口腔癌の中にも、その病理組織像や臨床経過から唾液腺由来の癌が存在すると考えてきた。我々の研究グループは口腔癌、唾液腺癌の研究を進める過程で、1986 年、高度に分化した (角化傾向を示した) 口底扁平上皮癌から細胞を樹立し、その特性を解析する過程で、この扁平上皮癌が唾液腺由来であることを明らかにした。この細胞は CEA が陽性で、超微構造的にも唾液腺細胞の特性を有していた。そこで、CEA やその他唾液腺特異的蛋白質をマーカーとして、多くの口腔扁平上皮癌が唾液腺由来であるか、粘膜上皮由来であるかの識別を試みたが、既存の少数の分子では精度高くこれらの腫瘍を識別することは不可能であった。

一方、2006 年に白血病治療で姉から骨髄移植を受けた男性に慢性 GVDH が発症し、その後下顎歯肉癌が発生した症例を経験した。この患者の癌組織の染色体分析あるいはマイクロダイセクション PCR による解析を行うと、XX パターンで女性型であった。さらに驚いたことに、正常粘膜に見える部分も約 20% 程度は姉由来の骨髄細胞で修復されていることが分かった。さらに、口底癌で頸部リンパ節転移を認めた症例の、原発腫瘍巣、リンパ節

転移巣での遺伝子発現の差をマイクロアレイで検索し、幹細胞マーカーの情報伝達経路のネットワークの活性化が見られるか否かを検索したところ、リンパ節転移巣では FGF4 と Tc11 の発現上昇が見られた。さらに、ネットワーク解析では FGF4 と Nanog を中心とするネットワーク分子の発現上昇が見られた。これらの所見は、転移細胞は原発巣を形成する多様な癌細胞集団の中で幹細胞特性を有するクローンであり、いわゆるステムネスを保有する細胞は転移能が高いことを示唆している。

これらの研究結果をもとに、我々は以下のような仮説を立てている。口腔扁平上皮癌は、(1) 上皮内に存在する幹細胞、(2) 唾液腺介在部導管上皮細胞あるいは間質に存在し、上皮 (唾液腺、重層扁平上皮など) にも間葉にも分化できる幹細胞、(3) 循環血液中に存在する多分化能を持った骨髄由来多能性幹細胞のいずれかより発生する。より未分化な幹細胞より発生した扁平上皮癌は、体細胞性幹細胞の特性 (ステムネス: 周囲組織への侵入能、血管内や異所環境での生存能と適応能、自己複製能など) をより強く保持しており、結果として生物学的悪性度が高く、臨床的には予後不良になると考えている。

このような仮説を基にパイロット研究として、口底扁平上皮癌 6 症例を用い、生検材料から RNA を抽出し、29,098 種類の遺伝子が搭載の Human Genome Survey Array にて遺伝子発現の検索を行い、AB1700 Chemiluminescent Microarray Analyzer にて読み取り後、GeneSping GX 7.3 で解析を行った。既に、このアレイを用いて正常重層扁平上皮と小唾液腺の遺伝子発現の差が 3 倍以上ある遺伝子 917 個を同定しており、これらの遺伝子を用いてクラスタリング解析を行うと、口腔扁平上皮癌は二つのグループ (唾液腺グループと粘膜重層扁平上皮グループ) に分けることができた。クラスタリングできる最小の組み

合わせを行うと 12 個の遺伝子により正確にグループ分けできることが明らかとなった。

## 2. 研究の目的

癌は体細胞性幹細胞に遺伝子異常が蓄積し発生する疾患である。従来、癌の生物学的悪性度はその見かけの表現形質により解析、検討されてきた。我々は、見かけの像にとられない本質的な癌悪性度の診断方法を確立する試みを続けている。これまでの研究で、口腔扁平上皮癌は少なくとも 3 種類の発生源母細胞（体細胞性幹細胞）があると考えられる。本研究ではマイクロアレイにより同定した遺伝子マーカーを用い、RT-PCR あるいは免疫染色にて、口腔扁平上皮癌を唾液腺由来、粘膜扁平上皮由来に識別し、その生物学的悪性度、予後を解析することにより、発生源母細胞の同定が治療方針決定に有用か否かを検討する。

## 3. 研究の方法

マイクロアレイ研究にて同定された 12 遺伝子の構造を WEB 上のデータベースで検索し、mRNA の全貌、genomic DNA の構造を明らかにし、PCR プライマーを設定する。唾液腺由来扁平上皮から樹立された培養細胞（TYS 細胞）を用い、12 遺伝子に対して、通常の RT-PCR あるいは TaqMan PCR の条件設定を行う。獨協医科大学口腔外科のデータベースに登録され、生検組織を凍結保存している約 300 症例の口腔扁平上皮癌組織から RNA を抽出し、12 遺伝子の発現を検索する。同時に 12 遺伝子の遺伝子産物に対する抗体を用い、ホルマリン固定、パラフィン切片にて免疫染色を行う。口腔扁平上皮癌が粘膜重層扁平上皮由来と唾液腺由来に分類可能であれば、それら二種類の腫瘍を、臨床病理学的な因子と予後に関して多変量解析を行い、生物学的悪性度、治療への反応性、予後が異なるか否かの検討を行う。

## (1) マイクロアレイで同定された 12 遺伝子の構造の検索。

WEB 上のデータベース (NCBI など) で検索することにより、12 遺伝子 (Prolactin-induced protein, KIAA0826, Lactotransferrin, Deleted in malignant brain tumors 1, WAP four-disulfide core domain 2, Mucin 7, salivary, N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase 2, Cholinergic receptor, muscarinic 3, Leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B, and two unnamed genes) の mRNA の全貌、genomic DNA の構造 (プロモーター領域の構造とエキソンイントロンの構成など) を把握する。もし遺伝子産物の機能解析がなされているようであれば、その詳細の把握、遺伝子産物に対する抗体の有無とホルマリン固定・パラフィン切片上で免疫染色に使用可能であるかの検討を行う。

## (2) 12 遺伝子のうち構造が把握できた遺伝子に対して PCR プライマーの設定。

検索は臨床材料を用いる予定であるので、使用できる RNA の質が高くないものも存在する。したがって、プライマーの設定に際しては genomic DNA 由来の産物が増幅されないようにイントロンをまたぐように設定する。また、多くのバリエーションが存在する可能性があり、可能であればバリエーションのコアを増幅できるように設定する。パイロットスタディとしてアガロース電気泳動で PCR 産物を確認できるものを作るが、最終的には TaqMan PCR 用のプライマーとプローブを設定する。

## (3) 口腔癌データベースの構築

獨協医科大学口腔外科学講座で保有している、口腔癌患者データベースの中から口腔扁平上皮癌患者を抽出し、臨床情報、病理組織学的情報、治療法、治療に対する反応、予後について、診療録を用いて再確認する。

## (4) 凍結保存されている口腔扁平上皮癌組織から RNA の抽出、cDNA の合成。

治療を受ける前に採取された生検組織は液体窒素でスナップフリーズされ、-80℃で保存されている。RNA抽出試薬 ISOGEN (ニッポン・ジーン) にて通法のごとく RNA 抽出を行い、アガロース電気泳動で 28S, 18S リボソーム RNA の比を確認する。ランダムプライマー, MMLVRT を用い 20 µl の系で逆転写を行う。GAPDH と SCCA1 に対するプライマー, プローブにより TaqMan PCR を行う。GAPDH が 30 サイクル以上でないと立ち上がらないサンプルは RNA の質が悪いが逆転写に問題があると考え除外。GAPDH が 30 サイクル以下で立ち上がるが SCCA1 が 35 サイクル以上でないと立ち上がらないサンプルは上皮の含有はほとんどないと考え除外。

#### **(5) 唾液腺由来扁平上皮癌細胞 TYS, 粘膜由来扁平上皮癌と考えられる HSC4, OSC10 を用いたプライマーチェック**

口底唾液腺由来扁平上皮癌から我々の研究グループで樹立された TYS 細胞と通常の口腔扁平上皮癌細胞 HSC4 細胞, OSC10 細胞から抽出した RNA を用いて, 設定したプライマーによる PCR あるいは TaqMan PCR の条件設定を行う。まず, 一般的な条件で反応を行い, その結果により, 特異性あるいは精度を上げるような反応条件を設定する。今回同定された遺伝子マーカーは TYS 細胞ではほとんど陽性で, HSC4 と OSC10 ではほとんど陰性となることが予想される。

#### **(6) PCR による臨床材料口腔扁平上皮癌における同定された 12 遺伝子マーカーの発現検索**

培養細胞株を用いて設定した条件を基に, 臨床材料口腔扁平上皮癌に対して 12 遺伝子マーカーの発現を通常の PCR あるいは TaqMan PCR で確認する。一つのサンプルに対して最低 3 回以上同じ実験を繰り返し, 一貫した結果が得られたものだけを採用する。

#### **(7) 口腔扁平上皮癌発生母細胞の違いによ**

#### **る生物学的悪性度, 予後の差異の検索**

マイクロアレイで同定され, PCR, 免疫染色で検索することにより, 口腔扁平上皮癌が粘膜扁平上皮由来か唾液腺由来かが同定できれば, 臨床病理学的な因子 (年齢, 性別, 発生部位, TNM 分類, ステージ分類, 組織学的分化度, Y-K 分類, リンパ節転移, 遠隔転移), 予後との関連があるか否かを多変量解析にて検定する。

#### **4. 研究成果**

本研究により, 口腔扁平上皮癌には, 粘膜重層扁平上皮由来癌と, 唾液腺由来癌が混在していることが明らかになった。一般に, 唾液腺癌 (腺様嚢胞癌や粘表皮癌) は口腔扁平上皮癌と比較すると, 化学療法や放射線療法に抵抗性で, 遠隔転移能が高く, 予後不良であるとされている。治療前に粘膜重層扁平上皮由来癌, 唾液腺由来癌を識別できれば, それの腫瘍の生物学的悪性度 (転移能など), 臨床的悪性度 (化学療法抵抗性, 放射線療法抵抗性など) を検討でき, 口腔扁平上皮癌を発生母細胞に基づいたより精度の高い診断を行うことにより, 最良の治療方針が決定できると考えている。

#### **5. 主な発表論文等**

[雑誌論文] (計 7 件)

菅原由美子, 神部芳則, 笹野高嗣, 草間幹夫, 森 良之, 北川善政, 高橋 哲, 杉山芳樹, 福田雅幸, 川又 均, 柴田敏之, 植野高章, 岸本裕充, 飯田征二, 中村典史, 杉浦 剛: 口腔扁平苔癬に対する Cepharanthine の臨床効果に対する 後方視的多施設共同研究, 日本口腔内科学会雑誌, 2016 年, 第 22 巻第 2 号  
秋山 薫, 齋藤 正浩, 小宮山 雄介, 土田修史, 大久保 真希, 川又 均: 分子標的治療薬を含むがん化学療法施行中の口腔内有害事象発症例の検討, 日本口腔内科

学会雑誌，2016年，第22巻第1号  
Uchida D, Kawamata H, Omotehara F, Miwa Y, Horiuchi H, Furihata T, Tachibana M, Fujimori T, Overexpression of TSC-22 (transforming growth factor-  
-stimulated clone-22) causes marked obesity, splenic abnormality and B cell lymphoma in transgenic mice. Oncotarget, 2016年2月

Narikawa Kimitaka, Kanazawa Yumi, Kawamata Hitoshi, Imai Yutaka, Obesity and Craniofacial Abnormalities are Independent Causal Factors for Obstructive Sleep Apnea-Hypopnea Syndrome. Dokkyo Journal of Medical Sciences, 2014年, p13-19, 41巻1号  
博多研文, 川又 均, 今井 裕、感染性心内膜炎発症における口腔内細菌の関与. Dokkyo Journal of Medical Sciences, 2014年, p103-113, 41巻1号、  
和久井崇大, 博多 裕子, 土肥 豊, 麻野和宏, 川又 均, 今井 裕: 舌扁平上皮癌におけるセンチネルリンパ節生検に関する研究 OSNA 法による遺伝子解析の有用性について. Dokkyo Journal of Medical Sciences, 2014年, p129-136, 41巻1号  
土肥 豊, 越路千佳子, 泉 さや香, 麻野和宏, 川又 均, 今井 裕: 5-FU に起因した高アンモニア血症をきたした舌癌の1例. 日本口腔外科学会誌, 2012年, p646-650, 58巻(11)

〔学会発表〕(計9件)

川又 均, 科学的根拠に基づく抗血栓療法患者の抜歯に関するガイドライン2015年版」のエッセンス. 第26回日本有病者歯科医療学会総会・学術大会 シンポジウム, 2017年3月4日「金沢歌劇場(石川県金沢市)」

川又 均, 2015年版抗血栓療法患者の抜歯に関するガイドライン改訂の要点. 日本有病者歯科医療学会 第6回学術教育セミナー, 2016年11月6日「東京歯科大学(東京都千代田区)」

Hitoshi Kawamata, Kembun Hakata, Yuske Komiyama, Maki Okubo, Daisuke Uchida: Influence of the antibiotics on serum vitamin K level and PT-INR during dental extraction procedures in patients receiving warfarin. ICOMS 2016, 2016年9月13日~16日「London (England)」

Hitoshi Kawamata, Hakata, Okubo, Uchida, Association of the oral bacteria with onset of the infective endocarditis. ICOMS2015, 2015年10月27日~30日「Melbourne (Australia)」

川又 均, 科学的根拠に基づく抗血栓療法患者の抜歯に関するガイドライン2015年改訂版, 第60回日本口腔外科学会総会・学術大会 Workshop, 2015年10月16日「名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)」

川又 均, 「口腔癌初期病変をどのようにとらえるか」発生母細胞から見た口腔癌悪性度評価の試み. 第26回日本臨床口腔病理学会口腔三学会シンポジウム, 2015年7月30日「北海道大学(北海道札幌市)」

川又 均, 科学的根拠に基づく抗血栓療法患者の抜歯に関するガイドライン2010年版の改訂, 第24回日本有病者歯科医療学会総会・学術大会指定講演. 2015年3月21日「旭川市大雪クリスタルホール(北海道旭川市)」

川又 均, 口腔ケアは本当にがん治療を支えているのか? エンドポイントをどこに設定するべきか - . 第24回日本口腔内科学会・第27回日本口腔診断学会 合同学術大会ランチョンセミナー2, 2014

年9月20日「九州大学医学部百年講堂(福岡県福岡市)」

Hitoshi Kawamata, Oral SCC originating from minor salivary glands showed aggressive biological behavior when compared with those originating from oral squamous epithelium .EACMFS2014 , 2014年9月21日~26日「Praha(Czech)」

〔図書〕(計11件)

川又 均 他,クインテッセンス出版、口の中がわかる ビジュアル歯科口腔外科学読本 . 2017年, P94-95・P144-145

川又 均 他,医学書院、言語聴覚士のための基礎知識 臨床歯科医学・口腔外科学第2版, 2016年, P179-187

川又 均 他,クインテッセンス出版、薬`17`18 歯科 疾患名から治療薬と処方例がすぐわかる本, 2016年, p38-39

川又 均 他,永末書店,口腔内科学第4章, 2016年, p212-216

川又 均 他,医学書院、今日の治療指針 2016, p1572-1573

川又 均 他,医学書院,標準口腔外科学第4版, 2015年、p415-420

川又 均 他,学術社、科学的根拠に基づく抗血栓療法患者の抜歯に関するガイドライン 2015年版, 2015年

川又 均 他 .クインテッセンス出版、薬`15`16 歯科 疾患名から治療薬と処方例がすぐわかる本, 2014年, p70-71

川又 均 他,クインテッセンス出版,口腔外科ハンドマニュアル`14、2014年, P166-175

川又 均 他,クインテッセンス出版,口腔外科ハンドマニュアル`13、2013年, P148-149

川又 均 他, 医学情報社、“医療連携”に役立つ有病者歯科マニュアル 2013年, P78-83

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

川又 均 (KAWAMATA, Hitoshi)

獨協医科大学・医学部・教授

研究者番号 70224847