

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25861955

研究課題名(和文) 口腔扁平上皮癌新規治療法の確立～サイトケラチン17発現機序の検索～

研究課題名(英文) New treatment methods of oral squamous cell carcinoma -examined with cytokeratin 17-

研究代表者

北村 亮二 (Ryoji, Kitamura)

九州大学・歯学研究院・共同研究員

研究者番号：60637338

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：申請者らは口腔扁平上皮癌(OSCC)細胞がCK17を高頻度に発現し、また臨床的には原発巣と末梢血中では癌細胞に発現するCKに差がある可能性を見出した。そこで本研究では、OSCC患者から末梢血を経時的(術前、術後)に採取し検索した。OSCC患者20名の術前に末梢血を採取しCKの発現頻度を検討したところ、CK17は20/20例(100%)、CK19は15/20例(75%)、CK20は12/20例(60%)であった。さらに予後良好症例および予後不良症例において、術後、予後良好症例では減少しているのに対して、予後不良症例では増加していた。以上より術後の末梢血中のCK17予後因子の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Cytokeratins (CKs) are intermediate filaments of the cytoskeleton and candidate prognostic biomarkers for OSCC, as they are over-expressed in OSCC compared with normal mucosa. The aim of this study was to determine the relative levels of CK17, CK19 and CK20 mRNAs in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) using real-time RT-PCR. The study comprised pre- and post-operative PBMC samples from 20 OSCC patients, from which, CK17, CK19 and CK20 mRNA was examined by real-time RT-PCR. In the good-prognosis group, 10 of 13 patients showed reduced CK17 mRNA expression in their post-operative compared with pre-operative samples, conversely, only three of six patients in the poor-prognosis group had reduced post-operative CK17 expression. This difference was statistically significant ($p < 0.01$). In conclusion, CK17 expression may be a useful prognostic biomarker for OSCC.

研究分野：口腔外科

キーワード：サイトケラチン17 サイトケラチン19 サイトケラチン20 口腔扁平上皮癌 予後因子 末梢血単核球

1. 研究開始当初の背景

口腔扁平上皮癌 (oral squamous cell carcinoma: OSCC) は診断の遅れや、放射線療法および化学療法に抵抗性を持つ OSCC 細胞の存在により予後不良となることが多い。よって、OSCC を早期診断し組織学的特徴を把握するために、より精度の高い診断方法を確立することが重要である。申請者は CK17 が OSCC において特異的に発現し、特に高分化型 OSCC において高発現していること、また、正常上皮と比較して前癌病変である白斑症において、上皮性異形成を伴うと CK17 が発現し CK13 が消失することを報告した (Kitamura et al. Journal of cancer research and clinical oncology 2012)。このことより、CK17 の発現と CK13 の消失は OSCC 発生と関連していることが考えられ、CK17 や CK13 が OSCC の診断因子としての可能性が考えられた。

過去の報告では CK17 の発現機序は明らかにされていないが、CK17 の発現に関連している分子として Gli2 が報告されている (DePianto et al. Nature Genetics 2010)。Gli2 は細胞増殖を担っている Sonic hedgehog family の一つであり細胞分裂を促進している。さらに、近年 Gli2 が CK17 発現のプロモーターである可能性が報告された。 (Callahan et al. Genes and Development 2004) そのため、CK17 が細胞の増殖に関連していることが考えられ、OSCC 特異的である CK17 は腫瘍の増殖と関連していることが推察される。したがって Gli2 と CK17 との関連を検索することにより OSCC 発症のメカニズムや腫瘍増殖機構の解明が可能となる。また、CK13 は上皮性異形成において発現が消失するため Gli2 と CK13 との関連を検索することも癌化のメカニズムを解明する点で重要であると考えられる。

また、OSCC が発症するには癌幹細胞 (Cancer stem cell; CSC) の存在が必要であると考えられている。CSC は自己複製と癌化の両方の

性質を有している細胞のことをいう。我々のグループは Np63 は上皮幹細胞のマーカーであり、Np63 の過剰発現は癌化と関連していることを見出した。 (Matsubara et al. International Journal of Oncology 2011)。上皮幹細胞のように自己複製能を有する細胞は幹細胞である可能性が高く、子宮頸部の移行上皮において CK17 と Np63 を共発現している細胞は幹細胞であると報告されている。したがって、OSCC 組織内において CK17 と Np63 を共発現している癌細胞は CSC の可能性が高いと考えられる。CK17 は OSCC の発現に関連しており、さらに CK13 の消失は正常上皮から OSCC へ変化する際の指標となり得る。また、CK17 の発現と上皮幹細胞のマーカーである Np63 の発現は逆相関しており過去の報告と一致する。仮説のような両者の共発現は一見矛盾していると思われるが、CSC は癌化と自己複製をするためこのような矛盾した癌細胞を CSC である可能性が高いと考えられる。さらに、CK17 は腫瘍マーカーとしての可能性があり、将来は予後因子として臨床での利用が期待できる。

2. 研究の目的

CK17 および CK13 は過去多くの研究者により OSCC を含め他部位での癌との関連が検討されてきたが、近年まで明らかにすることはできなかった。ところが、マイクロアレイ等の遺伝子解析の進歩により OSCC において CK17 が過剰発現することが分かってきている。本研究は、新規ではなく既知のタンパク質により OSCC 発症の解明ができる点が他の研究にないところである。

● CK17 の OSCC の診断マーカーとしての可能性

OSCC は境界不明瞭であり、手術での切除範囲の設定が困難となることが多い。また、口腔は摂食嚥下および発音といった重要な機能を有しているために、術後

の機能障害を最小限度にとどめることが必要である。CK17 発現と OSCC 発生の関連を解明することで CK17 が診断因子となり、手術での切除範囲が小さいにも関わらず、予後良好で機能障害がなく患者の QOL が向上することが予想される。

- OSCC 治療薬の開発

現在使用されている抗癌剤は副作用が強く患者への負担が大きいことが問題である。副作用が強い理由として、癌細胞だけでなく正常細胞まで障害することがあげられる。CK17 は OSCC に特異的であるため、CK17 発現経路を阻害することができれば正常細胞への影響を最小限に抑制して OSCC に特異的に作用する抗癌剤の開発ができると考えられる。さらに、CK17 が CSC のマーカーであれば CSC をターゲットとすることで OSCC の分化や増殖を予防することも可能である。そのためには、CK17 の発現に必要なタンパク質や転写因子を解明することが必要となるため、本研究により CK17 の発現経路が解明されれば、副作用が少ない OSCC 治療薬の開発に役立つことが考えられる。

- OSCC 予後因子の同定

近年、我々のグループでは末梢血中の CK が診断因子や予後因子としての可能性があると報告している。(Toyoshima et al. Anticancer research 2009) 本研究の予備実験でも OSCC 患者の末梢血において CK17 が発現していることが確認されている。今後検体を増やすことにより、統計上予後因子として臨床に使用できると考えられる。さらに、CK17 の転写因子等が解明されれば、これらの末梢血における発現により現在の病態や術後の再発や転移の可能性を予想する

ことができ、CK17 に関連する予後因子を増やすことが可能となる。

3. 研究の方法

本研究では、まず OSCC 細胞株を用いて癌細胞の分化と CK の発現様式との関連を更に明らかに

し、次に CK が OSCC の診断因子として有用であるかを臨床病理学的に解明する。具体的な研究内

容は以下の4 つである。

1. OSCC 細胞株における CK および分化マーカー、sonic hedgehog family の検索
2. OSCC 細胞株の Gli2 ノックダウン時における、分化、増殖能の影響や CK17 の発現の検索
3. OSCC 組織における CK17 および Np63、Gli2 の免疫組織染色
4. OSCC 患者の末梢血における CK17 および発現因子の検索

4. 研究成果

OSCC患者20名の術前に末梢血を採取しCKの発現頻度を検討したところ、CK17は20/20例(100%)、CK19は15/20例(75%)、CK20は12/20例(60%)であった。またそれぞれのCKの発現頻度を経時的に検索すると、CK17は術前、術前治療終了時、経過観察時(術後1か月)における相対比は1:0.73:0.87、CK19は1:1.14:1.36、CK20は1:1.17:1.80であった。さらに予後良好症例および予後不良症例において、CK17の発現は術前は両方の群で同じであったが、術後、予後良好症例では相対比が0.69に減少しているのに対して、予後不良症例では1.38に増加していた。CK19の発現は術後、予後良好症例では相対比が1.02とほぼ変化なく、予後不良症例では1.82に増加していた。CK20の発現は術後、予後良好症例では相対比が5.48に増加しており、予後不良症例では0.09に減少していた。

以上より、術後1ヶ月の末梢血中のCK17は、初診時と比較すると予後良好症例では減少していたが、予後不良症例では増加していたことから、CK17が予後因子の可能性が示唆された。また経時的観察の結果より、末梢血中のCK17は、術前放射線化学療法により減少し、術前と比較すると術後のCK17発現量も減少することが分かった。

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1件)
Shintaro Kawano, Yanqun Zheng, Kazunari Oobu, Ryota Matsubara, Yuichi Goto, Toru Chikui, Tadamasu Yoshitake, Tamotsu Kiyoshima, Teppei Jinno, Yasuyuki Maruse, Eiji Mitate, Ryoji Kitamura, Hideaki Tanaka, Takeshi Toyoshima, Tsuyoshi Sugiura, Seiji Nakamura

Clinicopathological evaluation of pre-operative chemoradiotherapy with S-1 as a treatment for locally advanced oral squamous cell carcinoma.

Oncol Lett. 2016 May;11(5):3369-3376 (査読あり)

〔学会発表〕(計1件)

北村 亮二, 川野 真太郎, 新井 伸作, 神野 哲平, 坂本 瑞樹, 清島 保, 中村 誠司

上顎埋伏乳臼歯を含んだ歯原性線維腫と歯牙腫が共存した1例

日本口腔外科学会(2016年11月25日~11月27日)千葉県

〔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

北村 亮二 (Ryoji Kitamura)

九州大学・歯学研究院・研究員

研究者番号: 60637338

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()