

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 8日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390379

研究課題名（和文） 口腔悪性腫瘍の浸潤・転移を制御する糖鎖分子の探索と分子標的治療への応用

研究課題名（英文） Exploration of carbohydrate molecules that regulate malignant behaviors of oral cavity cancer, and application for the development of novel molecular-targeting therapy.

研究代表者

鬼澤 浩司郎（ONIZAWA KOJIRO）

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：60194578

研究成果の概要（和文）：口腔悪性腫瘍（口腔癌）は高齢者に高発する癌腫であり、今後の高齢化社会を迎えるにあたり患者数が増加することが見込まれている。細胞表面の粘液糖蛋白の糖鎖構造は癌化により変化をきたし、浸潤・転移の悪性挙動に重大な影響を与える。口腔癌の臨床標本の解析と臨床経過に関するデータベースの構築し、口腔癌における糖転移酵素のN-アセチルグルコサミン転移酵素V（GnT-V）の発現状態と比較検討した。その結果、GnT-Vの発現低下が口腔癌の予後不良因子としてのバイオマーカーになりえることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The incidence of oral cavity cancers is high in elderly persons, and the number of patients with the cancers will increase in an enlargement of an aging society. It is a well-known fact that oligosaccharide structures are dramatically changed in carcinogenesis including malignant transformation. In this study, the expression levels of N-Acetylglucosaminyltransferase V (GnT-V) in the tissue sections of oral cavity cancers were correlated with the clinicopathological data. The analysis revealed that the decreased GnT-V expression level is an indicator of poorer survival outcome for patients with oral cavity cancers.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
2011年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2012年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
年度			
年度			
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

研究分野：口腔外科学

科研費の分科・細目：外科系歯学・歯学

キーワード：口腔癌，悪性挙動，糖鎖医学，糖転移酵素，分子標的治療

1. 研究開始当初の背景

口腔癌は高齢者に高発する癌腫であり、今後の高齢化社会を迎えるにあたり患者数が増加することが見込まれている（科学的根拠に基づく口腔癌診療ガイドライン2009年度版）。早期口腔癌は5年生存率が80～90%以上の報告が多く、良好な予後が見込めるが、進行癌では40～60%と予後不良である。種々の観点から治療法の改善が検討されて

来たが、ここ数十年治療成績は殆ど改善されていない。従って、口腔癌の治療成績の改善には、早期診断のための鋭敏な分子マーカーの探索に加え、口腔癌の浸潤・転移の悪性挙動にかかわる腫瘍生物分子を同定し、それらの分子を標的とする新しい効果的な治療手段を開発することが急務である。

糖鎖は“細胞の顔”とも呼ばれており、上皮細胞の表面形質である粘液糖蛋白の糖

鎖構造は癌化により変化することが知られている。これは、糖鎖を合成する糖鎖遺伝子のスイッチが正常細胞と癌細胞では異なることが関係している。糖鎖医学に着目し粘液糖蛋白と糖鎖に着目してきた。1) 将膜下浸潤胆嚢癌におけるシアリ化 MUC1が腹膜播種の遠隔臓器転移の再発と有意に相関すること (Kawamoto T, et al. Clin Cancer Res 7:1333-42, 2001.), また、糖転移酵素の GalNAc-T3の発現増加とその細胞内局在の変化が将膜下浸潤胆嚢癌患者の転移再発や術後生存期間と有意に相関すること (Miyahara N, et al. Clin Cancer Res 10:2090-2099, 2004.) を見出した。最近の基礎研究の成果により、アスパラギン結合型糖鎖分岐鎖構造を決定する糖転移酵素 N-アセチルグルコサミン転移酵素-V (GnT-V) の発現が、 β 1-6鎖の糖鎖構造の増加により癌細胞の悪性挙動に関与すると報告されている。

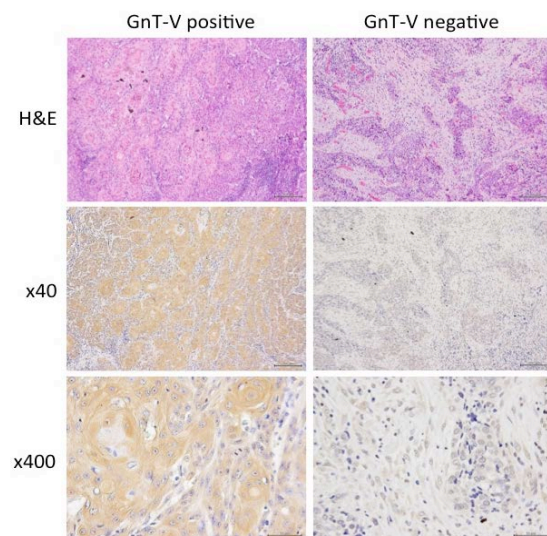
2. 研究の目的

細胞表面の粘液糖蛋白の糖鎖構造は癌化により変化をきたし、浸潤・転移の悪性挙動に重大な影響を与える。口腔悪性腫瘍(口腔癌)の臨床標本の解析と臨床経過に関するデータベースの構築し、口腔癌における糖転移酵素の N-アセチルグルコサミン転移酵素 V (GnT-V) の発現状態を解析する。

3. 研究の方法

本研究では、1994年から2004年に筑波大学附属病院口腔外科を受診し、口腔扁平上皮癌と診断された73例の検体を使用した。

Figure 1



(1) 免疫組織染色

2 μ m のパラフィン包埋組織切片を Vecta Stain kit の方法で GnT-V 抗体で染色する。

(2) 染色の評価方法および統計解析

73例の患者の予後観察期間は60か月であった。200倍率の顕微鏡視野内の、口腔癌細胞の30%以上が染色されている検体を陽性、30%未満の染色で陰性とし2群に分類する (Figure 1)。染色の有無と、患者の年齢、性別、喫煙、アルコールの有無、T分類 (T1+T2とT3+T4)、Stage分類 (Stage I+IIとStage III+IV)、pNの有無、分化度 (well+moderateとpoor)、Anneroth分類 (1~3と4)、局所再発、転移の有無、5年生存率などの臨床病理学的特徴と比較検討した。

4. 研究成果

(1) 全患者における GnT-V の発現状態 (単変量解析) (Table 1)

全検体の GnT-V 発現陽性は、69.8%であった。単変量解析で、GnT-V 陰性群においては、有意に60歳未満 ($P = 0.008$)、女性 ($P = 0.041$)、アルコール摂取 ($P = 0.035$) が多く、5年生存率は GnT-V 陽性群と比較して有意に低かった ($P = 0.013$)。しかし、喫煙、T分類、Stage分類 (Stage I+IIとStage III+IV)、pNの有無、分化度 (well+moderateとpoor)、Anneroth分類に関しては、有意差を認めなかった。

Table 1

Variable	case	GnT-V protein expression		P Value
		negative	positive	
Age (years)				
<60	22	11	11	0.008
≥ 60	51	10	41	
Gender				
Male	42	16	26	0.041
Female	31	5	26	
Smoking				
Yes	29	12	17	0.053
No	44	9	35	
Alcohol consumption				
Yes	28	12	16	0.035
No	45	9	36	
T-primary tumor				
T1+T2	46	13	33	0.900
T3+T4	27	8	19	
Disease stage				
I+II	38	9	29	0.317
III+IV	35	12	23	
pN				
poitive	57	15	42	0.382
negative	16	6	10	
Cellular differentiation				
Well	46	10	36	0.083
Moderate to Poor	27	11	16	
Anneroth grading system (Mode of invasion)				
grade 1~3	41	8	33	0.048
grade 4	32	13	19	
Local recurrence				
Recurrence	16	5	11	0.803
Null	57	16	41	
Lymph node recurrence				
Recurrence	16	6	10	0.382
Null	57	15	42	
Survival				
Alive	61	14	47	0.013
Dead	12	7	5	

(2) 全患者における GnT-V の発現状態 (多重ロジスティック回帰分析) (Table 2)

上記臨床病理学的特徴の因子で多変量解析を行ったところ、5年生存率と GnT-V の発現の有無には有意差を認めた。GnT-V の発現低下が、約5倍に予後不良となる結果であった。

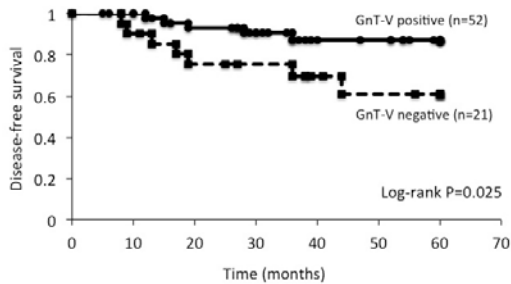
Table 2

Variable	Adjusted odds ratio	95% CI	P Value
Age (<60; ≥60)	1.636	0.329-8.144	0.548
Gender (F:M)	0.637	0.114-3.548	0.607
Smoking (Yes:No)	1.149	0.252-5.232	0.858
Alcohol consumption (Yes:No)	0.875	0.178-4.299	0.870
T-primary tumor (T1+T2:T3+T4)	1.558	0.382-6.349	0.536
pN status (No metastasis: Metastasis)	2.417	0.540-10.813	0.248
Cellular differentiation (well/moderate+poor)	1.219	0.293-5.074	0.786
Anneroth grading system (1-3:4)	1.107	0.259-4.736	0.891
GnT-V expression	4.742	1.035-21.732	0.045

(3) 全患者における GnT-V の発現と生存曲線 (Figure 2)

GnT-V の陽性群、陰性群間で術後再発、転移率に有意差は認めなかったが、GnT-V 陰性群においては、5年生存率が有意に低いという結果であった (GnT-V 陽性群: 87.3%, GnT-V 陰性群: 60.9%, $P=0.025$).

Figure 2



(4) 手術単独症例における GnT-V の発現状態 (単変量解析)

手術単独症例検体の GnT-V 発現陽性は、78.3%であった。GnT-V の発現状態と臨床病理学的特徴の間に有意な相関関係は認めなかった。

(5) 化学放射線療法を併用した症例と GnT-V の発現状態 (単変量解析) (Table 3)

Table 3

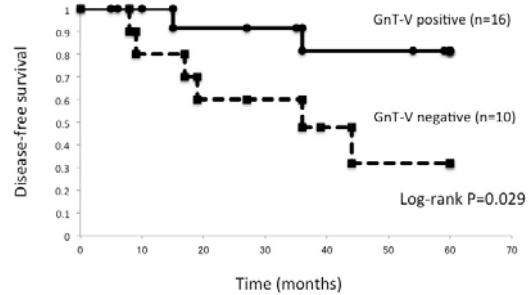
Variable	case	GnT-V protein expression		P Value
		negative (%)	positive (%)	
Age (years)				
<60	7	5	2	0.035
≥60	19	5	14	
Gender				
Male	19	9	10	0.124
Female	7	1	6	
Smoking				
YES	11	5	6	0.530
NO	15	5	10	
Alcohol				
YES	9	4	5	0.648
NO	17	6	11	
T-primary tumor				
T1+T2	9	2	7	0.215
T3+T4	17	8	9	
Disease stage				
I + II	6	0	6	0.027
III+IV	20	10	10	
pN				
No metastasis	18	6	12	0.420
Metastasis	8	4	4	
Cellular differentiation				
Well	11	3	8	0.315
Mod to poor	15	7	8	
Anneroth grading system (Mode of invasion)				
1 to 3	13	4	9	0.420
4	13	6	7	
Local recurrence				
Recurrence	8	2	6	0.346
Null	18	8	10	
Lymph node recurrence				
Recurrence	5	3	2	0.270
Null	21	7	14	
Survival				
Alive	18	4	14	0.010
Dead	8	6	2	

化学放射線療法を併用した症例検体の GnT-V 発現陽性は、57.6%であった。単変量解析で、GnT-V 陰性群においては、有意に60歳未満 ($P=0.007$), 男性 ($P=0.028$), が多く、5年生存率は GnT-V 陽性群と比較して有意に低かった ($P=0.027$). しかし、喫煙, アルコール摂取, T 分類, Stage 分類 (Stage I + II と Stage III + IV), pN の有無, 分化度 (well + moderate と poor), Anneroth 分類に関しては、有意差を認めなかった。

(6) 手術単独症例における GnT-V の発現と生存曲線 (Figure 3)

手術単独症例における GnT-V の陽性群、陰性群間で術後再発、転移率に有意差は認めなかったが、GnT-V 陰性群においては、5年生存率が有意に低いという結果であった (GnT-V 陽性群: 87.5%, GnT-V 陰性群: 50.0%, $P=0.042$).

Figure 3



以上のように、GnT-V 陰性群、陽性群で、再発・転移の有無との間に有意差を認めなかったが、陰性群において予後不良であった。また、術前化学放射線療法を併用した症例において、GnT-V 陰性群は5年生存率が低く予後不良であったことから、GnT-V の発現低下は、化学放射線療法に対して抵抗性となる可能性が示唆された。GnT-V の発現低下が口腔癌の予後不良因子としてのバイオマーカーになりえることが示唆された。

同様の傾向は非細胞肺癌、肝細胞癌、膀胱癌において認められており、GnT-V は早期癌や、前癌病変に多く認めたと報告がある。もともとの正常組織に、β 1-6GlcNAc 分岐を認めるかどうかで、GnT-V が癌の悪性度に関与している。β 1-6GlcNAc 分岐がない場合、その他の糖鎖も GnT-V のターゲットになりえ、これが予後不良に関与している。

化学放射線の効果について、GnT-V は anti-apoptosis にも pro-apoptosis にも働かうという報告があるが、癌種によって異なる。咽頭癌において、GnT-V の低発現が G2-M 期に関与し Bcl-2/Bax 比を低下させることで、放射線感受性が高まる (Zhuo E, et al. BBRC 2012;424:554-62.) ということや、神経芽腫においては、GnT-V が細胞接着の減少に関与し、アポトーシス感受性が高まると

の報告 (Inamori K, et al. FEBS letters. 2006;580:627-32.)がある。口腔癌において、GnT-Vの発現と予後が逆相関になったが、化学放射線療法の感受性も同様、これまでの報告で、癌種によって異なる事を考えると矛盾はない。

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6件) 全て査読有

- (1) Seto K, Uchida F, Baba O, Yamatoji M, Shonozuka K, Karube R, Warabi E, Yanagawa T, Onizawa K, Miyoshi E, Shoda J, Bukawa H: N-acetylglucosaminyltransferase V in oral squamous cell carcinoma correlates with poor prognosis (submitted for publication).2013 in press
- (2) Seto K, Shoda J, Horibe T, Warabi E, Ishige K, Yamagata K, Kohno M, Yanagawa T, Bukawa H, Kawakami K: Interleukin-4 receptor α -based hybrid peptide effectively induces antitumor activity in head and neck squamous cell carcinoma. Oncology Report 2013, In press.
- (3) Onuki K, Sugiyama H, Ishige K, Kawamoto T, Ota T, Ariizumi S, Yamato M, Kadota S, Takeuchi K, Ishikawa A, Onodera M, Onizawa K, Yamamoto M, Miyoshi E, Shoda J.: Expression of N-acetylglucosaminyltransferase V in the subserosal layer correlates with postsurgical survival of pathological tumor stage 2 carcinoma of the gallbladder. J Gastroenterol 2013, In press.
- (4) Shoda J, Ishige K, Sugiyama H, Kawamoto T: Biliary tract carcinoma: clinical perspective on molecular targeting strategies for therapeutic options. JHBPS 19:342-353, 2012.
- (5) Sugiyama H, Onuki K, Ishige K, Baba N, Ueda T, Matsuda S, Takeuchi K, Onodera M, Nakanuma Y, Yamato M, Yamamoto M, Hyodo I, Shoda J.: Potent *in vitro* and *in vivo* antitumor activity of sorafenib against human intrahepatic cholangiocarcinoma cells. J Gastroenterol 46:779-789, 2011.
- (6) Matsuda A, Kuno A, Kawamoto K, Matsuzaki H, Irimura T, Ikehara Y, Zen Y, Nakanuma Y, Yamamoto M, Ohkohchi N, Shoda J, Hirabayashi J, Narimatsu H.: WFA-positive sialylated MUC1 is a high-sensitivity biliary marker for intrahepatic cholangiocarcinoma. Hepatology 52:174-182, 2010.

[学会発表] (計5件)

- (1) 内田文彦, 瀬戸佳穂里, 馬場 脩, 大和地正信, 伊藤寛之, 山懸憲司, 柳川 徹, 武川寛樹 : 口腔がんにおける糖転移酵素 GnT-V の機能解析 (転移性因子として) 第31回口腔腫

瘍学会 (東京), 2013.1.24-25

- (2) 岡田浩介, 藤 栄治, 正田純一. 疾病モデルより解明された肝病態に対する転写因子 Nrf2 の演じる生体防御機構. 第98回日本消化器病学会総会 (東京), 2012.4.19-21
- (3) 岡田浩介, 藤 栄治, 徳重克年, 石井哲郎, 橋本悦子, 正田純一. Nrf2/p62遺伝子二重欠損マウスは脂肪性肝炎を自然発症し, 肝腫瘍を発生する. 第48回日本肝臓学会総会 (金沢), 2012.6.7-8
- (4) 正田純一. 胆石の種類と成因. 日本胆道学会認定指導医養成講座3. 第48回日本胆道学会学術集会 (東京), 2012.9.20-21
- (5) 正田純一: 胆管がんに対するハイブリッドベプチドの新しいバイオ療法 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業「難治性の肝・胆道疾患に関する調査研究」(東京), 2012.2.16-17

[図書] (計6件)

- (1) 正田純一: 漢方薬の有効性と医療科学 インチンコウ湯 漢方薬の薬効と薬理 日本伝統医学テキスト 漢方編 平成22・23年度厚生労働科学研究費補助金 地域医療基盤開発推進研究事業「統合医療を推進するための日本伝統医学の標準化」研究班 pp.295-297, 2012.
- (2) Shoda J: Inchinkoto, Clinical efficacy and pharmacology, Textbook of Traditional Japanese Medicine, Health and Labour Sciences Research Grant, Research on the standardization of traditional Japanese Medicine promoting integrated medicine. pp.230-232, 2012.
- (3) Shoda J & Yamamoto M: Gallbladder Cancer Pathogenesis and Molecular Targeting Strategies for Therapeutic Options. Horizons in Cancer Research. Volume 48. pp.1-24. NOVA Science, 2012.
- (4) 正田純一: 胆石症・胆道炎・胆道がん 胆石症 概念・定義と疫学 最新医学社 (大阪), pp.13-25 2011.
- (5) 正田純一: 胆道癌発生の分子機序 Annual Review 消化器 2011 中外医学社 (東京) pp.293-299, 2010.
- (6) 正田純一: 胆道感染症 南江堂 (東京), pp.366-369, 2010.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鬼澤 浩司郎 (ONIZAWA KOJIRO)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号: 60194578

(2) 研究分担者

山懸 憲司 (YAMAGATA KENJI)
筑波大学・医学医療系・講師
研究者番号: 00420084

正田 純一 (SHODA JUNICHI)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号：90241827
竹内 薫 (TAKEUCHI KAORU)
筑波大学・医学医療系・准教授
研究者番号：00192162