

## 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 24 年 5 月 11 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21791982

研究課題名(和文) Maspin 機能発現による口腔扁平上皮癌の浸潤・転移抑制効果の実験的研究

研究課題名(英文) Suppressive effect of invasion and metastasis of oral squamous cell carcinoma by maspin expression

研究代表者

吉澤 邦夫 (KUNIO YOSHIZAWA)

金沢大学・附属病院・医員

研究者番号 60452108

研究成果の概要(和文)：口腔扁平上皮癌における Maspin は 64.8% に陽性所見を認めたが、陽性症例では陰性症例に比べて生命予後が良好であった。一方で、高度浸潤能を持つがん浸潤様式(山本・小浜分類) 4D 型では Maspin 発現の減弱を認めた。また、uPA/uPAR システムにおける Maspin 発現は、uPA/uPAR 発現と逆相関し、uPA(+)/uPAR(+)/Maspin(-) の場合に最も浸潤能が強く、生命予後が最も悪い組み合わせであることが判明した。

研究成果の概要(英文)：Maspin expression in oral squamous cell carcinoma (OSCC) was detected in 64.8%. Patients with positive maspin expression had a significantly better prognosis. In contrast, maspin expression was lower in mode of invasion (Yamamoto-Kohama Criteria) 4D type with high invasive potential. Moreover, Maspin expression showed a negative correlation with uPA/uPAR expression in the uPA/uPAR system. Expression pattern, uPA(+)/uPAR(+)/Maspin(-), exhibited a stronger invasive potential and the worst survival rate than other invasive grades of OSCC.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	2,400,000	720,000	3,120,000

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：Maspin、がん浸潤様式、uPA、uPAR

## 1. 研究開始当初の背景

難治性口腔扁平上皮癌は、高度ながん浸潤・転移を来し、外科療法・放射線療法・化学

療法を主体とした集学的治療を行ったとしても救命できない場合が多い。この難治性因子は様々な遺伝子の発現変化により引き起

こされると報告されている。これらの遺伝子の多くは、特定の転写因子によって制御されており、多くの転移関連遺伝子やアポトーシス抑制遺伝子の発現を制御している。これらのことから、がんの悪性化において浸潤、転移および薬剤耐性は個々に進行する面もあるが、一連の現象として遂行されている可能性が考えられる。本研究は口腔扁平上皮癌の悪性化の指標としてよく用いられているがん浸潤様式山本・小浜分類が、浸潤・転移能に関わる細胞外マトリックス分解に働くプロテアーゼの阻害因子である *Maspin* に与える影響を検討するものである。これまでの報告では、がん細胞が悪性化の最も強い要素である浸潤・転移能を強く持つ過程において、上皮間葉移行との関連が認められており、その上皮間葉移行のがん細胞性質が山本・小浜分類の *Grade 4D* に相当することが分かっている。また、浸潤・転移能には細胞外マトリックス分解が強く働いており、同分解を抑制する *Maspin* の働きが注目されている。*Maspin* は口腔扁平上皮癌での新しい治療戦略のターゲットとして、予後因子として有用である可能性が高いと考えられる。

## 2. 研究の目的

とくに *uPA/uPAR* を抑制する働きがある *Maspin* を用いて臨床病態学的所見による治療法の選別を検討しており、がん浸潤様式山本・小浜分類に基づいたがん悪性化の系統的研究を進める。その系統的研究の一例として、これらががん浸潤・転移に対して深く関わる因子として、予後因子マーカーとして利用することや浸潤・転移を制御する治療薬を臨床の場で応用することを目的に本研究を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) 免疫組織化学染色法

口腔扁平上皮癌における手術摘出による組織を用いて、*Maspin*、*uPA/uPAR* タンパクと浸潤関連因子との相関を検討することで、臨床病理学的に特徴を捉える。実験対象としては、金沢大学附属病院歯科口腔外科を1988-2006年に受診し、外科切除術を受けた患者54名を対象とした。

### i) 材料 :

Anti-maspin antibody (Lab Vision, USA) 1:300 dilution

Anti-uPA antibody, Anti-uPAR antibody (American Diagnostica Inc., USA) 1:200 dilution

### ii) 評価 :

30%以上陽性所見があるものを **positive** として、それ以下は **Negative** とした。

(2) *In vivo* では、これまでの研究成果から浸潤様式由来が明確な細胞株6種を用いて、各細胞株における遺伝子発現およびタンパク発現を検討し、浸潤様式との関連を検討した。また、*siRNA* 処理により *Maspin* 発現をノックダウンさせた細胞株を組み入れて、3D浸潤モデルを作成し、*Maspin* の浸潤能について比較検討した。

### i) 細胞株 6種

*Grade 3*: 2種 HSC-4, OSC-20

*Grade 4C*: 2種 OSC-19, OTC-04

*Grade 4D*: 2種 HOC313, TSU

細胞培養: 各細胞株は10%ウシ胎児血清と1%ペニシリン-ストレプトマイシンを添加した最小必要培地 MEM (Sigma-Aldrich) にて5% $\text{CO}_2$ , 37°Cの条件下で培養した。

### ii) Reverse transcriptase-PCR 法

Primer:

uPA: 5'-CGG TGC ATG CAG TGT AAG  
AC-3'(forward), 5'-AGC AGG AGA CAT CAA  
TGT GG—3'(Reverse)  
uPAR: 5'-AAG GAC TAC AGC GCT GAC  
AC—3' (forward), 5'-AAC TCC TGC  
AGG CTT CAG TC—3'(Reverse)  
Maspin: 5'-CAG GCA CAA CAA AAC TCG  
AA—3 (forward),5'-AAT CGG CAT CCA CAG  
AAA AG —3'(Reverse)  
β-actin: 5'-GAA AAT CTG GCA CCA CAC CTT  
—3 (forward), 5'- TTG AAG GTA GTT TCG  
TGG AT—3'(Reverse)

### iii) Western blotting 法

タンパク質の抽出は研究時間の節約から  
M-Per (PIERCE) を用いて行った。Apply 量  
は 25ug として統一した。  
抗体はそれぞれ Maspin, uPA, uPAR, β- actin を  
用いた。

### iv) siRNA 処理

Maspin siRNA(Qiagen)濃度 5nM にて 48 時間  
のトランスフェクションを行い、RT-PCR お  
よび Western blotting 法にてノックダウン率を  
コントロール群と比較して計測した。

### v) 3-D invasion model assay

BD バイオコートマトリゲルインベージョン  
チャンバー (BD Biosciences) を用いて各がん  
細胞の浸潤能を検討した。0.1%BSA 添加無血  
清 Eagle-MEM を用いて  $5 \times 10^4$ /mL の細胞浮  
遊液を作り、チャンバー上室に各細胞株を  $2.5$   
 $\times 10^4$  個 (500  $\mu$ l) ずつ播種し、24 時間培養し  
た。光学顕微鏡 (x100) にてメンブレン下面  
に観察された細胞を浸潤細胞として細胞数  
を計測した。また、バイオコートコントロール  
インサート (BD Biosciences) を用いて同様の  
操作を行い、メンブレン下面に観察された

細胞を移動細胞として細胞数を計測した。浸  
潤率は浸潤細胞数/移動細胞数  $\times 100$  として  
計算した。

## 4. 研究成果

細胞外マトリックス分解に働くプロテアー  
ゼ阻害因子 Maspin 発現とがん浸潤様式との  
関連性を検討したデータを元に、細胞外マト  
リックス分解に働くプロテアーゼ uPA, uPAR  
の発現も加えて比較検討した。これまでのが  
ん浸潤様式(山本・小浜分類)に基づいた系統  
的研究の中でその由来が明確な口腔扁平上  
皮癌細胞株 6 種を実験に供し、Maspin, uPA,  
uPAR 発現を遺伝子レベルとタンパク質レベ  
ルで調べ、浸潤様式との関連を検討した。そ  
の結果、最も浸潤能が高い 4D 型由来の細胞  
株では、他の浸潤様式に比較すると、Maspin  
発現が減弱していた一方で、uPA, uPAR の発  
現亢進が認められた。また、Maspin siRNA に  
より maspin 機能減弱させたがん浸潤様式 3  
型由来 HSC-4 細胞株を用いて、3D 浸潤モデ  
ルを利用した invasion assay をしたところ、コ  
ントロール群に比べて、Maspin siRNA 群では  
浸潤能亢進を有意に認めた。また in vivo では、  
金沢大学附属病院歯科口腔外科を受診した  
口腔扁平上皮癌患者より得られた病理組織  
切片 54 症例を対象として Maspin, uPA,  
uPAR をそれぞれ一次抗体とした免疫組織化  
学的染色法に取り組んだ。その染色結果では、  
浸潤様式が高くなるにつれて Maspin 発現は  
減弱する一方で、uPA, uPAR の発現亢進が認  
められた。さらに Maspin-/uPA+・uPAR+の症  
例群が最も予後不良な組み合わせであるこ  
ともわかり、Maspin 発現は浸潤・リンパ節転  
移に逆相関を認め、反対に uPA, uPAR は正の  
相関を示していることがわかった。これらの  
ことより、Maspin, uPA, uPAR の発現が予後

予測因子として利用できる可能性を示唆した。

#### 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 5 件)

① Yoshizawa K, Nozaki S, Kitahara H, Kato K, Noguchi N, Kawashiri S, Yamamoto E. Expression of urokinase-type plasminogen activator/urokinase-type plasminogen activator receptor and maspin in oral squamous cell carcinoma: Association with mode of invasion and clinicopathological factors. *Oncology Reports* 26: 1555-60, 2011. Doi: 10.3892/or.2011.1419. 【査読あり】

② Kato K, Kawashiri S, Yoshizawa K, Kitahara H, Okamune A, Sugiura S, Noguchi N, Yamamoto E. Expression form of p53 and PCNA at the invasive front in oral squamous cell carcinoma: correlation with clinicopathological features and prognosis. *J Oral Med Pathol* 40: 693-8, 2011. Doi: 10.1111/j.1600-0714.2011.01032.x.

【査読あり】

③ Yoshizawa K, Nozaki S, Yoshida K, Kawashiri S, Kato K, Nakagawa K, Yamamoto E. Two elderly patients with advanced maxillary gingival carcinoma with complete response to concurrent radiotherapy and S-1 chemotherapy. *Ajian Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 22:94-98, 2010. Doi: 10.1016/j.ajoms.2009.08.003. 【査読あり】

④ Yoshizawa K, Nozaki S, Okamune A, Kitahara H, Ohara T, Kato K, Kawashiri S, Yamamoto E. Loss of maspin is a negative

prognostic factor for invasion and metastasis in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Med Pathol* 38: 535-9, 2009. Doi: 10.1111/j.1600-0714.2009.00762.x. 【査読あり】

⑤ Ohara T, Kawashiri S, Tanaka A, Noguchi N, Kitahara H, Okamune A, Kato K, Hase T, Nakaya H, Yoshizawa K. Integrin expression levels correlate with invasion, metastasis and prognosis of oral squamous cell carcinoma. *Pathol Oncol Res* 15:429-36, 2009. Doi: 10.1007/s12253-008-9142-9. 【査読あり】

[学会発表] (計 4 件)

① Yoshizawa K, Kawashiri S, 他 4 名. uPA, uPAR and Maspin expression as a biomarker in invasive oral squamous cell carcinoma. 3<sup>rd</sup> International Conference on Innovative Approach in Head & Neck Oncology. 2011 年 2 月 26 日、Palau de Congressos de Catalunya (Barcelona, Spain)

② 吉澤 邦夫、能崎 晋一、他 10 名. 口腔扁平上皮癌における Maspin 発現および uPA/uPAR 発現 —浸潤様式と予後との関連について—. 第 29 回日本口腔腫瘍学会総会、2011 年 1 月 28 日 崇城大学市民ホール(熊本)

③ 吉澤 邦夫、能崎 晋一、他 7 名. 口腔扁平上皮癌における Maspin 発現と uPA/uPAR 発現について. 第 28 回日本口腔腫瘍学会総会 2010 年 1 月 28 日 学術総合センター(東京)

④ 川尻 秀一、吉澤 邦夫、山本 悦秀. 口腔扁平上皮癌細胞の正所性移植モデルにおける浸潤像の検討. 第 63 回日本口腔科学会 2009 年 4 月 17 日 アクトシティ浜松(静岡)

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉澤 邦夫 (YOSHIZAWA KUNIO)

金沢大学・附属病院・医員

研究者番号：60452108

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし