

学位申請論文

## 舌扁平上皮癌における SDF-1/CXCR4 発現と 臨床病理的因子との関連について

獨協医科大学 口腔外科学

中津川周生

**要 旨** ケモカイン SDF-1 とその受容体である CXCR4 による ケモカインシステムは、癌の転移ならびに細胞増殖に関与すると報告されており、多臓器において研究がなされているが、その発現と臨床的意義については、一定の見解が得られていない。今回われわれは、舌扁平上皮癌における SDF-1/CXCR4 の発現と臨床病理学的因子（年齢、性別、pT, pN, pStage, 分化度、Y-K 分類、5 年累積生存率）との関係について検討をしたので報告する。対象は、当科にて手術療法を施行した舌扁平上皮癌一次症例 53 例で、未治療生検組織を用い、リアルタイム RT-PCR による遺伝子発現および免疫組織化学染色法を用い発現検索を行った。その結果、SDF-1 遺伝子発現例に頸部リンパ節転移が有意に多く、5 年累積生存率においては、SDF-1 ならびに CXCR4 遺伝子が両者共に発現した症例は、SDF-1 と CXCR4 遺伝子両者共に発現しなかった症例と比べ、有意に生存率が不良であった。しかしながら、それ以外の因子では、遺伝子検索ならびに免疫組織化学染色による検討のいずれにおいても、SDF-1 と CXCR4 の発現と臨床病理学的因子との関連は認めなかった。

本研究の結果より、SDF-1 遺伝子の発現は、舌扁平上皮癌のリンパ節転移と関連し、SDF-1/CXCR4 の発現は、予後予測因子となりえることが示唆された。

**Key Words** : 口腔癌, 頸部リンパ節転移, ケモカイン, SDF-1, CXCR4

### 緒 言

口腔癌の予後に関わる因子として、頸部リンパ節転移は重要な予後因子であり、われわれも現在までに、転移に関連する因子について様々な臨床病理学的検討を行ってきた。

2001 年 Muller<sup>1)</sup> らは、乳癌の臓器特異的な転移は、ケモカインのひとつである stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) とその特異的レセプターである CXCR4 によるケモカインシステム（以下、SDF-1/CXCR4）によると、従来とは異なる概念を提案した<sup>1)</sup>。以後、胃癌<sup>2,3)</sup>、食道扁平上皮癌<sup>4,5)</sup>、前立腺癌<sup>6)</sup>、大腸癌<sup>7)</sup> などにおいてケモカインシステムによる転移機構について報告されているが、SDF-1 と CXCR4 の発現と臨床的意義について意見の一致は得られていない。また、口腔癌に

においても同様に、SDF-1 ならびに CXCR4 について検討されているが、なお一定の見解はみられない。

本研究は、口腔癌のうちリンパ節転移が高率に生じる舌扁平上皮癌における SDF-1 ならびに CXCR4 の発現と臨床病理学的因子（年齢、性別、pT, pN, pStage, 分化度、Y-K 分類、5 年累積生存率）との関連を比較検討し、転移ならび予後規定因子になり得るのか検討した。

### 対象および方法

対象は 1998~2009 年に当科を受診し、手術療法を行った口腔扁平上皮癌一次症例 180 例のうち検索可能であった舌扁平上皮癌一次症例 53 例である。これらの内訳は、性別は男性 34 名、女性 19 名、年齢は 27~90 歳（平均 59.4 歳）。臨床進行度は、2002 年 UICC の TNM 分類を、腫瘍浸潤様式は Y-K 分類<sup>8)</sup> を用い判断した。

なお、当科では基本的には予防郭清は行わない治療態度をとっているが、再建症例では、便宜的には顎下三角、もしくは肩甲骨筋上郭清を行っている。

本研究は院内倫理委員会の承認を得て、インフォームドコンセントを得られた患者に行った。

平成 23 年 11 月 5 日受付, 平成 23 年 12 月 9 日受理  
別刷請求先: 中津川周生

〒 321-0293 栃木県下都賀郡壬生町北小林 880  
獨協医科大学 口腔外科学

<b>CXCR4</b>	<b>up :</b>	<b>5'-CCATTCCTTTGCCTCTTTTGC-3'</b>
	<b>down:</b>	<b>5'-AGGGTTCCTTCATGGAGTCATAGTC-3'</b>
	<b>TaqMan probe:</b>	<b>5'-TATACACTTCAGATAACTACACCGAGGAAATGGG-3'</b>
<b>SDF-1</b>	<b>TaqMan Gene expression assay No: 186464415 (ABI)</b>	

図1 本研究で使用したプライマー、プローブ

## 1. 組織採取

未治療舌扁平上皮癌より生検組織を採取し、その腫瘍中心部より5×5mm大の腫瘍組織を採取し、直ちに-80℃で凍結保存した。なお、遺伝子検索目的に採取した組織は、ほぼ同一の組織を用いて、H-E標本を作製し、大部分が癌で構成されていることを確認した。

## 2. 遺伝子発現解析

### 1) Real time reverse transcription-polymerase chain reaction (Real time RT-PCR)

凍結生検材料からのTotal RNA抽出はISOGEN solution (Nippon Gene, Japan) を使用しAGPC (Acid Guanidinium-Phenol-Chloroform) 法の原理で抽出した。そして、complementary DNA (cDNA) 合成はTakara RNA PCR Kit (AMV) Ver3.0 (Takara Bio INC, Shiga, Japan) を用いて行った<sup>9)</sup>。

Real time RT-PCRは、標的とする内部コントロールGAPDHをリポーター色素とクエンチャー色素の両方でラベルされた蛍光オリゴヌクレオチドプローブを用いてそれぞれPCR増幅した。増幅はTaqMan Universal PCR Master Mix (3.5mM of MgCl<sub>2</sub>, 200μM dATP, dCTP, and dGTP, 400μM dUTP) (Applied Biosystems, Foster City, CA), 300nM forward Primer, 300nM reverse primer, 200nM TaqMan probe, cDNA (RT-product) 1.5μlの最終容量50μlの反応系で行った。サーマルサイクラーコンディションは、50℃2分、95℃10分のinitial stepののち、95℃15秒と60℃1分のステップで40サイクルの反応を行った。GFP (Green Fluorescent Proteins), SCCA (Squamous Cell Carcinoma Antigen), EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) を使用したプライマーとプローブはPrimer Express (Applied Biosystem) で設計した。GAPDHのプライマーとプローブは凍結 TaqMan GAPDH control

reagents (Applied Biosystems) を使用した。遊離レポーター色素の蛍光はABI Prism7300 Sequence Detection System (Applied Biosystems) により検出した。解析に用いたプライマーは、図1に示す。口腔扁平上皮癌細胞株 TYS細胞を用いて、standard curveを作成し、33サイクルまで立ち上がらない症例は除外した。ABI PRISM<sup>®</sup> 7000 SDS Softwear version1.0により解析を行った。PCR産物の発現量はGAPDHの発現量を基準にして補正した。本研究では発現の判定は、CXCR4ではGAPDH発現ユニットの4倍以上を陽性(以下発現群)と、3倍未満を陰性(以下非発現群)と、SDF-1では、GAPDH発現ユニット2倍以上発現しているものを陽性(発現群)、1倍以下を陰性(非発現群)として判定を行った。

### 2) 免疫組織化学的検索

サンプルはリン酸緩衝食塩水(PBS)の10%のホルマリン水溶液に固定後、通法のごとくパラフィン包埋を行い、4μmの薄切標本を作製し、100%キシレン(和光純薬, 大阪)にて10分間2回の脱パラフィンを行った。100%エタノールにて脱キシレン、70%エタノールにて親水化を行い、流水下にて水洗した。10mMクエン酸緩衝液(pH 6.0)にてマイクロウェーブにて95℃20分間熱処理し、その後20分間風冷を行った。その後、水洗し、3%過酸化水素水加メタノールに30分間浸し、PBSに5分間2回浸した。そして、PBSで3%に希釈したウマ正常血清で20分間反応させた。室温で1次抗体(SDF-1: R&D社 抗SDF-1抗体1:50, CXCR4: EPITOMICS社 抗CXCR4抗体1:200)を1時間反応させ、PBSで水洗した。次に室温で2次抗体(SDF-1: VECTASTAIN ABC KIT Elite, CXCR4: VECTASTAIN ABC KIT)を30分間反応させた。そしてPBSで水洗しアビジン・ビオチン化ペルオキシダーゼ

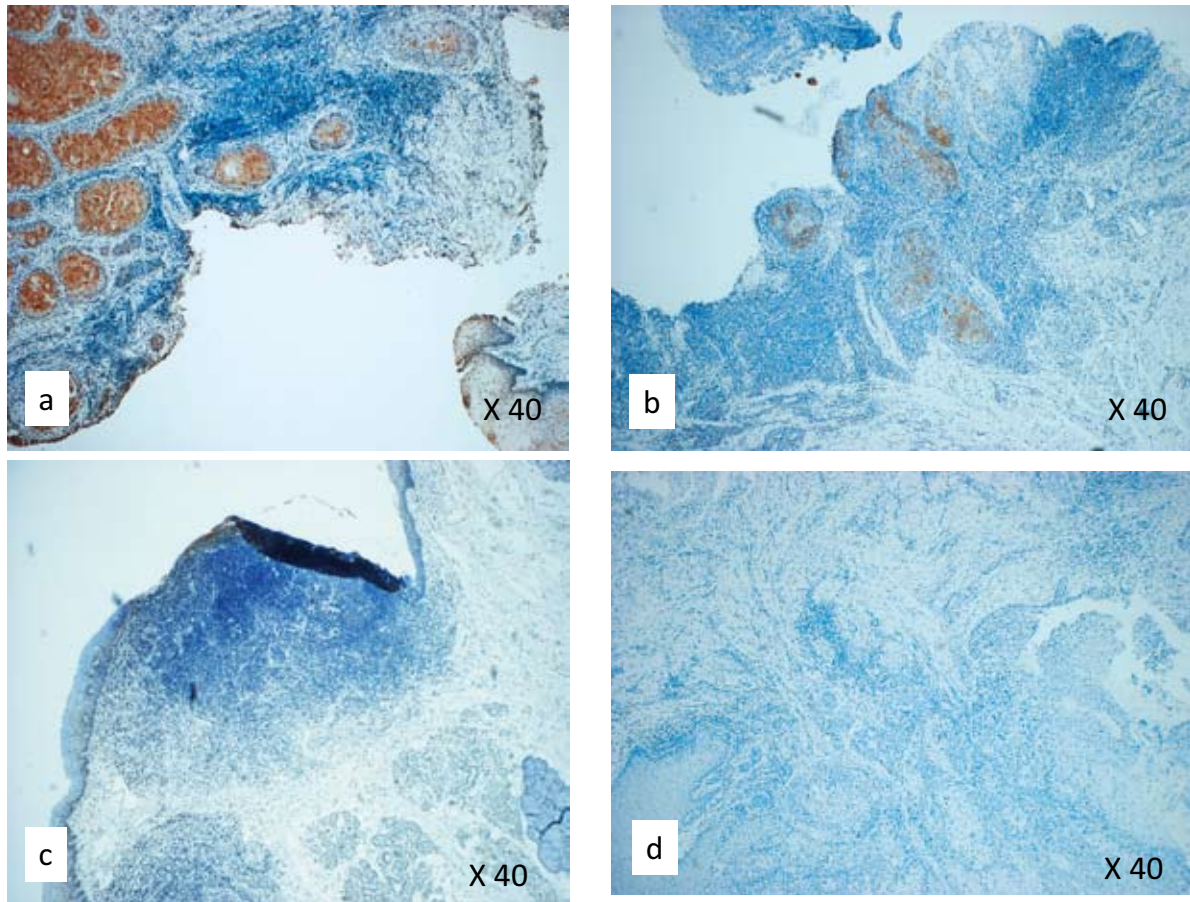


図2 免疫組織化学染色

a : CXCR4 強陽性, b : SDF-1 弱陽性, c : CXCR4 陰性, d : SDF-1 陰性.

(ABC) を室温で 30 分間反応させて, PBS で水洗を行った. 発色は 3-diamino-benzidine tetrahydro-chloride (DAB) で行い, 顕微鏡下で発色状態を確認しながら室温で反応させた. 流水にて 10 分間水洗後, ハマトキシリンにて核染色を行い, 脱水, 透徹, 封入した<sup>10)</sup>. なお, 陽性コントロールとしてリンパ節を用いた. 染色の判定は, 病理専門医, 歯科口腔外科専門医の 2 名にて行った. 腫瘍細胞が占める陽性パーセントを測定し, それぞれの染色強度を弱陽性, 中等度, 強陽性と 3 段階に評価した. すなわち CXCR4 では腫瘍細胞に占める陽性率が 25% 以上かつ染色の強度が中等度以上を陽性 (発現群), それ以外を陰性 (非発現群) と判定した. また, SDF-1 では腫瘍細胞の陽性率が 25% 以上で, かつ染色の強度が弱陽性以上を陽性 (発現群) とそれ以外を陰性 (非発現群) として判定した. (図 2)

### 3. 統計解析

統計学的検討は Fisher's exact test, Student's T-test を用いて行い, 生存率の解析は, Kaplan-Meier 法により生存率を求め, 生存曲線検定は log rank test により

行い,  $P < 0.05$  をもって有意差ありとした.

## 結 果

### 1. 遺伝子発現検索

1) Real time RT-PCR 法による SDF-1 並びに CXCR4 の発現

遺伝子発現検索においては, SDF-1 発現は, 53 例中 26 例 (49.1%), 非発現は 27 例 (50.9%), CXCR4 発現は 53 例中 24 例 (45.3%), 非発現は 29 例 (54.7%) に認められた.

2) SDF-1 並びに CXCR4 の発現と年齢との関連について

SDF-1 では, 発現群の平均年齢は,  $59.0 \pm 12.4$  歳, 非発現群では,  $56.8 \pm 16.6$  歳で, 発現群・非発現群間に有意な差を認めなかった ( $P = 0.757$ ) (表 1). また, 同様に CXCR4 では, 発現群の平均年齢は,  $56.4 \pm 16.2$  歳, 非発現群では,  $58.7 \pm 13.7$  歳で, 発現群・非発現群間に有意な差を認めなかった ( $P = 0.883$ ) (表 2).

表1 SDF-1 (遺伝子) 発現と臨床病理学因子の検討

	SDF-1 expression (n=53)		
	Positive (26)	Negative (27)	P-value
Mean age ± SD	59.0 ± 12.4	56.8 ± 16.6	0.757
Gender			
Male	17 (50.0%)	17 (50.0%)	1.000
Female	9 (47.4%)	10 (52.6%)	
pT			
pT1	2 (22.2%)	7 (77.8%)	0.300
pT2	11 (50.0%)	11 (50.0%)	
pT3	6 (54.5%)	5 (45.5%)	
pT4	7 (63.6%)	4 (36.4%)	
pN			
Positive	16 (69.6%)	7 (30.4%)	0.013
Negative	10 (33.3%)	20 (66.7%)	
Stage			
Stage I	2 (20.0%)	6 (80.0%)	0.197
Stage II	6 (40.0%)	10 (60.0%)	
Stage III	8 (61.5%)	5 (38.5%)	
Stage IV	10 (62.5%)	6 (37.5%)	
Histology			
Well	15 (60.0%)	10 (40.0%)	0.270
Moderate	8 (36.4%)	14 (63.6%)	
Poor	3 (50.0%)	3 (50.0%)	
Y-K classification			
Y-K 1	0 (0%)	4 (100%)	0.195
Y-K 2	5 (62.5%)	3 (37.5%)	
Y-K 3	16 (53.3%)	14 (46.7%)	
Y-K 4	5 (45.5%)	6 (54.5%)	

表2 CXCR4 (遺伝子) 発現と臨床病理学因子の検討

	CXCR4 expression (n=53)		
	Positive (24)	Negative (29)	P-value
Mean age ± SD	56.4 ± 16.2	58.7 ± 13.7	0.883
Gender			
Male	16 (47.1%)	18 (52.9%)	0.780
Female	8 (42.1%)	11 (57.9%)	
pT			
pT1	2 (22.2%)	7 (77.8%)	0.473
pT2	11 (50.0%)	11 (50.0%)	
pT3	6 (54.5%)	5 (45.5%)	
pT4	5 (45.5%)	6 (54.5%)	
pN			
Positive	13 (56.5%)	10 (43.5%)	0.175
Negative	11 (36.7%)	19 (63.3%)	
Stage			
Stage I	1 (12.5%)	7 (87.5%)	0.200
Stage II	9 (56.3%)	7 (43.7%)	
Stage III	7 (53.8%)	6 (46.2%)	
Stage IV	7 (43.8%)	9 (56.2%)	
Histology			
Well	13 (52.0%)	12 (48.0%)	0.545
Moderate	8 (36.4%)	14 (36.3%)	
Poor	3 (50.0%)	3 (50.0%)	
Y-K classification			
Y-K 1	2 (50.0%)	2 (50.0%)	0.837
Y-K 2	3 (37.5%)	5 (62.5%)	
Y-K 3	15 (50.0%)	15 (50.0%)	
Y-K 4	4 (36.4%)	7 (63.6%)	

### 3) SDF-1 並びに CXCR4 の発現と性別との関連について

SDF-1 では、男性は発現群 17 例 (50.0%)、非発現群は 17 例 (50.0%)、女性は、発現群 9 例 (47.4%)、非発現群は 10 例 (52.6%) で、両者に有意な差は認めなかった (P=1.000) (表1)。また CXCR4 については、男性では発現群 16 例 (47.1%)、非発現群 18 例 (52.9%)、女性では発現群は 8 例 (42.1%)、非発現群は 11 例 (57.9%) であり、両者に有意な差は認めなかった (P=0.780) (表2)。

### 4) SDF-1 並びに CXCR4 の発現と原発腫瘍の大きさ (pT) との関連について

SDF-1 においては、各 pT ステージにおける SDF-1 mRNA 発現に有意な違いはなく、また、SDF-1 発現群、非発現群における pT ステージの程度 (分布) にも有意な差を認めなかった (p=0.300) (表1)。

また、CXCR4 では、各 pT ステージにおける CX-

CR4 mRNA 発現に有意な違いはなく、また、CXCR4 発現群、非発現群における pT ステージの程度 (分布) にも有意な差を認めなかった (p=0.473) (表2)。

### 5) SDF-1 並びに CXCR4 の発現と頸部リンパ節転移 (pN) との関連について

SDF-1 についてみると、転移例では、発現群は 16 例 (69.6%)、非発現群は 7 例 (30.4%)、非転移例においては、発現群 10 例 (33.3%)、非発現群 20 例 (66.7%) で SDF-1 が発現している症例は有意に頸部リンパ節転移が多い結果であった (p=0.013) (表1)。

また、CXCR4 では、転移例の発現群は 13 例 (56.5%)、非発現群は 10 例 (43.5%)、非転移例においては、発現群 11 例 (36.7%)、非発現群 19 例 (63.3%) で、CXCR4 発現・非発現とリンパ節転移の有無とについて比較したところ、両者に差は認めなかった (p=0.175) (表2)。

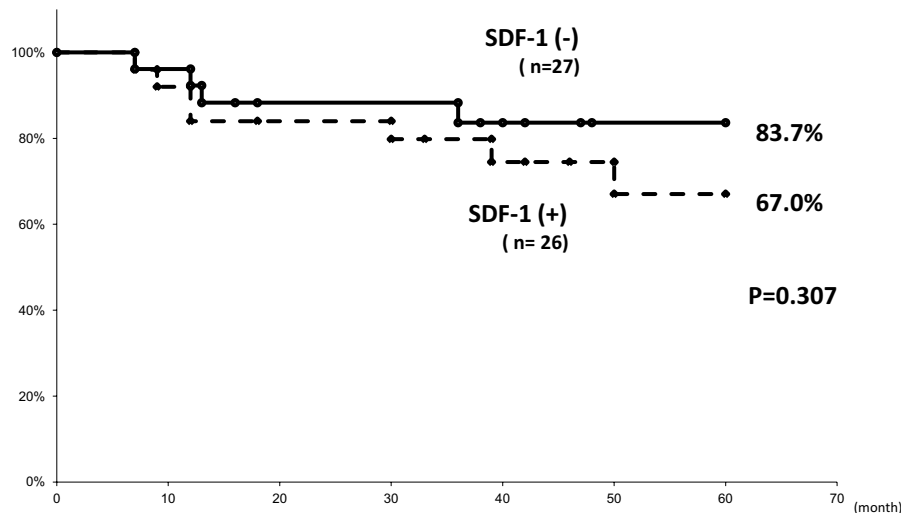


図3 SDF-1 (遺伝子) 発現・非発現の5年生存率

6) SDF-1並びにCXCR4の発現と病期分類 (p Stage) との関連について

SDF-1では、各p StageにおけるSDF-1mRNA発現に有意な違いはなく、また、SDF-1発現群、非発現群における病期分類 (p Stage) の程度 (分布) にも有意な違いは認められなかった ( $p=0.197$ ) (表1)。

CXCR4では、各p Stageにおける発現に有意な違いはなく、また、CXCR4発現群、非発現群における病期分類 (p Stage) の程度 (分布) にも有意な違いは認められなかった ( $p=0.200$ ) (表2)。

7) SDF-1並びにCXCR4の発現と分化度との関連について

SDF-1においては、各分化度におけるSDF-1mRNA発現に有意な違いはなく、また、SDF-1発現群、非発現群における分化度の程度 (分布) にも有意な違いは認められなかった ( $p=0.270$ ) (表1)。

CXCR4においては、各分化度におけるCXCR4mRNA発現に有意な違いはなく、また、CXCR4発現群、非発現群における分化度の程度 (分布) にも有意な違いは認められなかった ( $p=0.545$ ) (表2)。

8) SDF-1並びにCXCR4の発現とY-K分類との関連について

SDF-1においては、各Y-K分類におけるSDF-1mRNA発現に有意な違いはなく、またSDF-1発現群、非発現群におけるY-K分類の程度 (分布) にも有意な違いは認められなかった ( $p=0.195$ ) (表1)。

CXCR4については、各Y-K分類におけるCXCR4mRNA発現に有意な違いはなく、またCXCR4発現群、非発現群におけるY-K分類の程度 (分布) にも

有意な違いは認められなかった ( $p=0.837$ ) (表2)。

9) SDF-1並びにCXCR4の発現と5年生存率との関連について

SDF-1においては、発現群の5年生存率は83.7%、非発現群の5年生存率は67.0%で、両者に有意な差は認めなかった ( $p=0.307$ ) (図3)。CXCR4では、発現群の5年生存率は84.7%、非発現群の5年生存率は61.9%で、両者に有意差は認めなかった ( $p=0.136$ ) (図4)。

しかし、SDF-1、CXCR4の両者が発現した群 (5例) と、両者ともに非発現症例 (12例) を比較したところ、両者ともに発現している症例の5年生存率は48.9%、共に非発現症例は、88.2%であり、SDF-1およびCXCR4の両者が共に発現している症例は、有意に5年生存率が不良であった ( $p=0.038$ ) (図5)。

## 2. 免疫組織化学染色による発現検索

### 1) 免疫染色法によるSDF-1並びにCXCR4の発現

免疫染色による発現検索においては、SDF-1免疫組織化学染色の発現群は53例中4例 (7.5%) であり、CXCR4免疫組織化学染色の発現群は53例中26例 (49.1%) であった。

### 2) 年齢との関連について

SDF-1では、発現群の平均年齢は、 $63.8 \pm 2.5$ 歳、非発現群では、 $57.7 \pm 14.6$ 歳で、発現群・非発現群に有意な差を認めなかった ( $P=0.440$ ) (表3)。CXCR4では、発現群の平均年齢は、 $57.7 \pm 14.8$ 歳、非発現群では、 $58.7 \pm 15.2$ 歳で、発現群・非発現群に有意差は認めなかった ( $P=0.665$ ) (表4)。

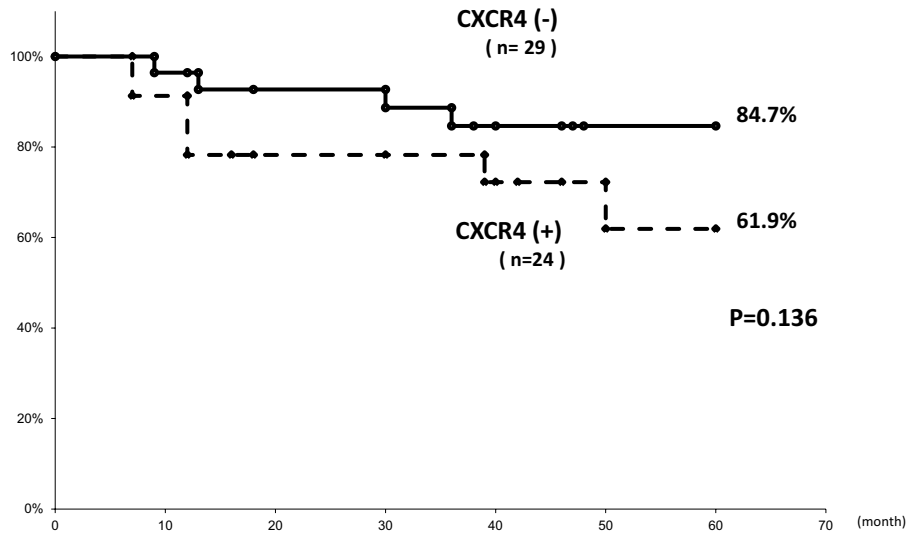


図4 CXCR4 (遺伝子) 発現・非発現の5年生存率

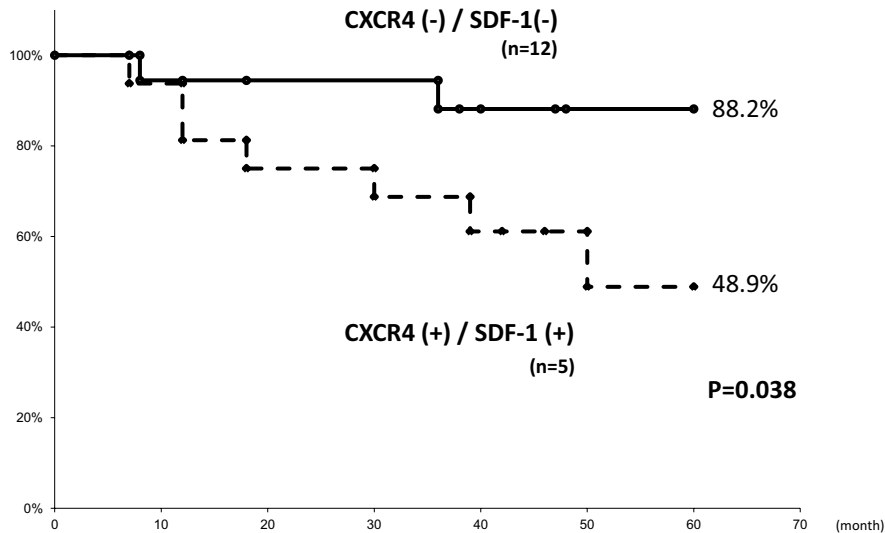


図5 SDF-1, CXCR4 (遺伝子) 発現・非発現の5年生存率

### 3) 性別との関連について

SDF-1では、男性は発現群2例(5.9%)であり、非発現群は32例(94.1%)、女性は、発現群2例(10.5%)、非発現群は17例(89.5%)で、両者に有意な差は認めなかった( $P=0.612$ ) (表3)。またCXCR4は、男性では発現群16例(47.0%)、非発現群は18例(53.0%)、女性では発現群10例(52.6%)、非発現群は、9例(47.4%)であり、両者に有意な差は認めなかった( $P=0.779$ ) (表4)。

### 4) 原発腫瘍 (pT) との関連について

SDF-1においては、各pTにおける免疫組織化学染色の発現に有意な違いはなく、またSDF-1発現群、非発現群におけるpTステージの程度(分布)にも有意な

違いは認められなかった( $p=0.914$ ) (表3)。

また、CXCR4では、各pTにおける免疫組織化学染色の発現に有意な違いはなく、またCXCR4発現群、非発現群におけるpTステージの程度(分布)にも有意な違いは認められなかった( $p=0.591$ ) (表4)。

### 5) 頸部リンパ節転移 (pN) との関連について

SDF-1についてみると、頸部リンパ節転移における免疫組織化学染色の発現に有意な違いは認められなかった( $p=0.305$ ) (表3)。

また、CXCR4についてみると頸部リンパ節転移における免疫組織化学染色の発現に有意な違いは認められなかった( $p=0.172$ ) (表4)。

表 3 SDF-1 (免疫組織化学染色) 発現と臨床病理学因子による検討

	SDF-1 expression (n=53)		
	Positive (4)	Negative (49)	P-value
Mean age ± SD	63.8 ± 2.5	57.7 ± 14.6	0.440
Gender			
Male	2 (5.9%)	32 (94.1%)	0.612
Female	2 (10.5%)	17 (89.5%)	
pT			
pT1	1 (11.1%)	8 (88.9%)	0.914
pT2	1 (4.6%)	21 (95.4%)	
pT3	1 (9.1%)	10 (90.9%)	
pT4	1 (9.1%)	10 (90.9%)	
pN			
Positive	3 (13.0%)	20 (87.0%)	0.305
Negative	1 (3.3%)	29 (96.7%)	
Stage			
Stage I	1 (12.5%)	7 (87.5%)	0.061
Stage II	0 (0.0%)	16 (100%)	
Stage III	3 (23.8%)	10 (76.2%)	
Stage IV	0 (0.0%)	16 (100%)	
Histology			
Well	3 (12.0%)	22 (88.0%)	0.200
Moderate	0 (0.0%)	22 (100%)	
Poor	1 (16.7%)	5 (83.3%)	
Y-K classification			
Y-K 1	0 (0.0%)	4 (100%)	0.623
Y-K 2	1 (12.5%)	7 (87.5%)	
Y-K 3	3 (10.0%)	27 (90.0%)	
Y-K 4	0 (0.0%)	11 (100%)	

表 4 CXCR4 (免疫組織化学染色) 発現と臨床病理学因子による検討

	CXCR4 expression (n=53)		
	Positive (26)	Negative (27)	P-value
Mean age ± SD	57.7 ± 14.8	58.7 ± 15.2	0.665
Gender			
Male	16 (47.0%)	18 (53.0%)	0.779
Female	10 (52.6%)	9 (47.4%)	
pT			
pT1	5 (55.6%)	4 (44.4%)	0.591
pT2	10 (45.5%)	12 (54.5%)	
pT3	7 (63.6%)	4 (36.4%)	
pT4	4 (36.4%)	7 (63.6%)	
pN			
Positive	14 (60.9%)	9 (39.1%)	0.172
Negative	12 (40.0%)	18 (60.0%)	
Stage			
Stage I	4 (50.0%)	4 (50.0%)	0.368
Stage II	6 (37.5%)	10 (62.5%)	
Stage III	9 (69.2%)	4 (30.8%)	
Stage IV	7 (43.8%)	9 (56.2%)	
Histology			
Well	14 (56.0%)	10 (44.0%)	0.189
Moderate	11 (50.0%)	11 (50.0%)	
Poor	1 (20.0%)	5 (80.0%)	
Y-K classification			
Y-K 1	0 (0.0%)	4 (100%)	0.108
Y-K 2	6 (75.0%)	2 (25.0%)	
Y-K 3	15 (50.0%)	15 (50.0%)	
Y-K 4	5 (45.5%)	6 (54.5%)	

## 6) 病期分類 (p Stage) との関連について

SDF-1 では、各 p Stage における免疫組織化学染色の発現に有意な違いはなく、また、SDF-1 発現群、非発現群における p Stage の程度 (分布) にも有意な違いは認められなかった ( $p=0.061$ ) (表 3)。

CXCR4 においては CXCR4 では、各 p Stage における免疫組織化学染色の発現に有意な違いはなく、また、CXCR4 発現群、非発現群における p Stage の程度 (分布) にも有意な違いは認められなかった ( $p=0.368$ ) (表 4)。

## 7) 分化度との関連について

SDF-1 においては、各分化度における SDF-1 免疫組織化学染色の発現に有意な違いはなく、また、SDF-1 発現群、非発現群における分化度の程度 (分布) にも有意な違いは認められなかった ( $p=0.200$ ) (表 3)。

CXCR4 においては、各分化度における CXCR4 免疫組織化学染色の発現に有意な違いはなく、また、

CXCR4 発現群、非発現群における分化度の程度 (分布) にも有意な違いは認められなかった ( $p=0.189$ ) (表 4)。

## 8) Y-K 分類との関連について

SDF-1 においては、各 Y-K 分類における SDF-1 免疫組織化学染色の発現に有意な違いはなく、また SDF-1 発現群、非発現群における Y-K 分類の程度 (分布) にも有意な違いは認められなかった ( $p=0.623$ ) (表 3)。

CXCR4 については、各 Y-K 分類における CXCR4 免疫組織化学染色の発現に有意な違いはなく、また CXCR4 発現群、非発現群における Y-K 分類の程度 (分布) にも有意な違いは認められなかった ( $p=0.108$ ) (表 4)。

## 9) 5 年生存率との関連について

SDF-1 においては、発現群の 5 年生存率は 100%、

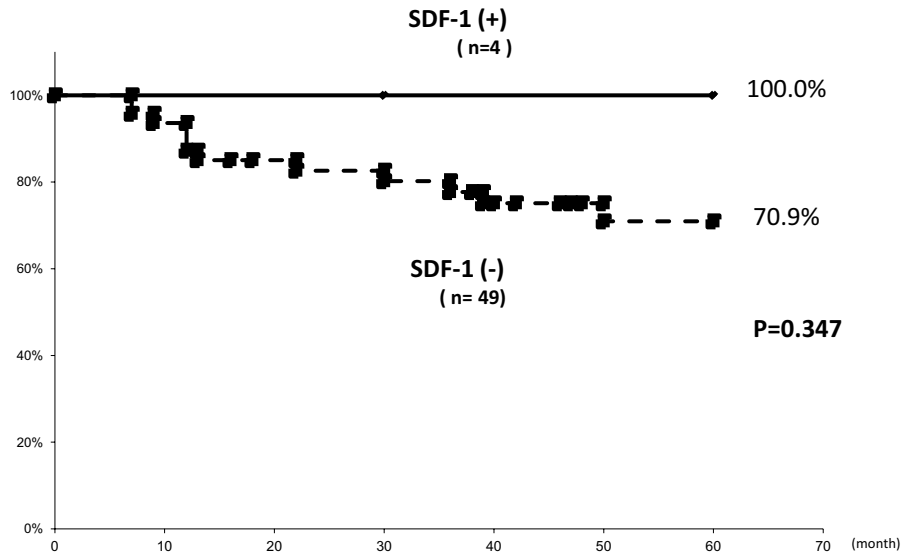


図6 SDF-1 (免疫組織化学染色) 発現・非発現の5年生存率

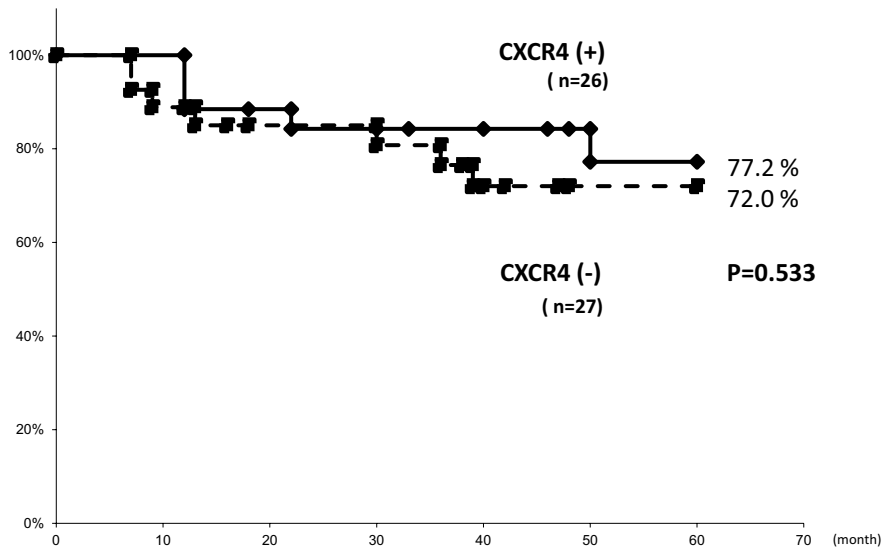


図7 CXCR4 (免疫組織化学染色) 発現・非発現の5年生存率

非発現群の5年生存率は70.9%で、両者に有意な差は認めなかった ( $p=0.347$ ) (図6). CXCR4 では発現群の5年生存率は77.2%, 非発現群の5年生存率は72.0%で、両者に有意な差は認めなかった ( $p=0.533$ ) (図7).

SDF-1, CXCR4 の両者がともに発現した群と、両者ともに非発現症例を比較したところ、両者ともに発現群の5年生存率は100%, 共に非発現症例は78.3%であり、5年生存率に差は認めなかった ( $p=0.372$ ) (図8).

## 考 察

舌扁平上皮癌は、各種治療法の進歩により治療成績の向上がみられているものの、なお、十分な結果が得られるに至っていない。その理由の一つとして、舌癌は領域リンパ節転移が高頻度に生じることがあげられてお

り<sup>11)</sup>、その制御の可否は治療成績を大きく左右すると考えられている<sup>12~15)</sup>。

癌におけるリンパ節転移の成立には、癌細胞自身の血中あるいはリンパ流路に入る能力が重要であると考えられ、Epithelial adhesion molecule (EpCAM)<sup>16)</sup>、MMP-2、MMP-9<sup>17)</sup>、VEGF<sup>17)</sup>などが報告されているが、いまだに明らかになっていないのが現状である。

近年、癌の転移には癌細胞自身の血中あるいはリンパ流路に入る能力よりも、流入後に生じる癌細胞と転移臓器との親和性が重要で、その親和性を決定するシステムとして、ケモカインシステムがあげられている<sup>18)</sup>。従来、ケモカインは4つのシステイン残基の位置が保存された構造で定義された分子量約8~12KDaの小型のサイトカインのファミリーで、それらのメンバーの多くは、炎



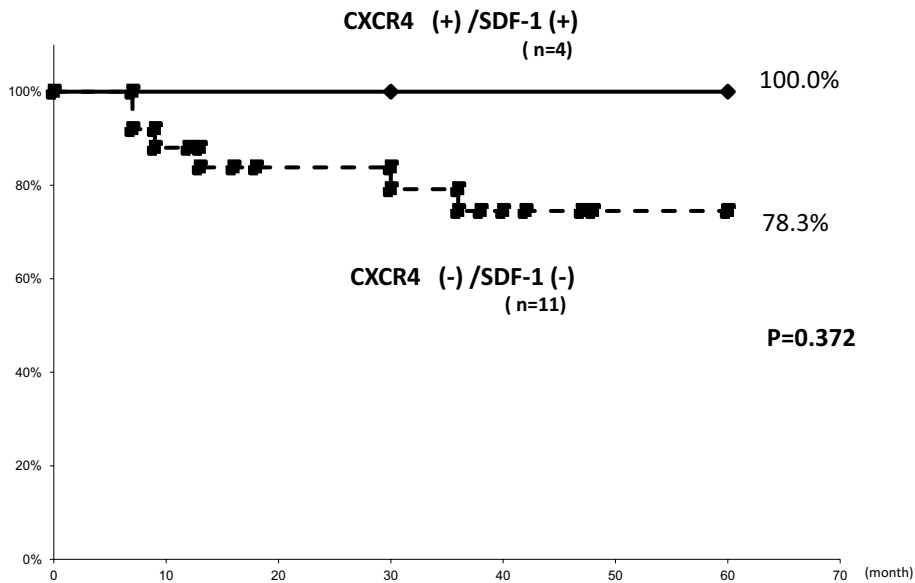


図8 SDF-1, CXCR4 (免疫組織化学染色) 発現・非発現の5年生存率

症時に炎症局所に白血球を誘導するサイトカインと考えられている<sup>19)</sup>。現在同定されているケモカインの受容体はすべて膜7回貫通型G蛋白質結合型で、このタイプの受容体は酵母の情報伝達にも利用されており、哺乳動物においても、ホルモン、神経伝達物質、オートコイドなどの多種類のメディエーターの細胞間の情報伝達に用いられている<sup>20)</sup>。

しかし、2001年Mullerらは、乳癌の臓器特異的な転移は、ケモカインのひとつであるstromal cell-derived factor-1 (SDF-1)とその特異的レセプターであるCXCR4のケモカインシステム(以下、SDF-1/CXCR4)によると、従来とは異なる概念を報告した<sup>1)</sup>。以来、癌転移の研究として、CXCR4/SDF-1 pathwayが注目されるようになり、現在までに胃癌<sup>2,3)</sup>、食道癌<sup>4,5)</sup>、前立腺癌<sup>6)</sup>、大腸癌<sup>7)</sup>などで検討されている。

口腔扁平上皮癌においても内田ら<sup>21)</sup>によりケモカインシステムの概念が導入され、検討されているがなお充分とは言えない。

本研究では、舌扁平上皮癌の未治療生検材料を用い、CXCR4およびSDF-1の発現を定量化PCR法並びに免疫組織化学的手法を用い検討をおこなった。口腔はその解剖学的部位により、舌、歯肉(上顎、下顎)、口底、頬粘膜、口蓋に分類されているが、これらを同一の臓器すなわち口腔として検討することの問題点やリンパ流路の相異などを理由に、口腔を構成するそれぞれの部位別に検討されている<sup>12-14)</sup>。

そのため、今回われわれは、リンパ節転移が口腔癌のなかでも高頻度に見られる舌扁平上皮癌について検討した。われわれが渉猟し得た限り、舌扁平上皮癌の臨床検

体を対象にCXCR4およびSDF-1の発現を遺伝子レベルで検討した報告はなく、本報告が最初の報告である。

その結果、遺伝子解析では、SDF-1発現症例にリンパ節転移症例が有意に多くみられたが、他の因子ではSDF-1の発現との関連はみられなかった。また、免疫組織化学染色における検討では、いずれの臨床病理学的因子とSDF-1発現との関連は認められなかった。他の領域においては、既述したように食道癌、胃癌、前立腺癌、大腸癌などで検討されており、癌の転移には、SDF-1とCXCR4両者の発現が関与する<sup>7)</sup>、あるいはCXCR4発現のみが関連する<sup>5)</sup>ことが報告されている。また、口腔癌では、腫瘍細胞自身が発現するケモカインレセプターCXCR4と、リンパ節自身が発現するケモカインSDF-1の結合が癌細胞をリンパ節へ誘導する要因になることが報告<sup>22)</sup>されている。

しかし、その一方でSASAKIら<sup>4)</sup>は食道扁平上皮癌において、SDF-1の発現はリンパ節転移と相関するが、CXCR4の発現は関連しないと述べ、Kwak<sup>23)</sup>らは、胃癌におけるCXCR4の発現は臨床所見と関連せず、ケモカインレセプターのみ発現では腫瘍の特性を調整することはなく、SDF-1の発現が重要であると報告している。また、口腔癌において、CXCR4発現腫瘍細胞はSDF-1をオートクラインし、腫瘍細胞の浸潤・増殖を促進する。さらにそのSDF-1は、腫瘍細胞中のCXCR4を賦活化すること<sup>24)</sup>、また、CXCR4発現腫瘍細胞はSDF-1により浸潤能が刺激されるが、CXCR4非発現腫瘍細胞はSDF-1による走化、浸潤能の影響を受けないこと<sup>25)</sup>、など、CXCR4のみならず、SDF-1の発現が重要であることが報告されている<sup>22)</sup>。これらはわ

れわれの結果を支持するもので、今回の結果と合わせ勘案すると、舌扁平上皮癌では、CXCR4 発現腫瘍細胞からオートクラインに作られた SDF-1 は、腫瘍細胞中の CXCR4 をアクチベートし転移臓器との親和性を高め、腫瘍の転移能を高める可能性が示唆された。

SDF-1 並びに CXCR4 における mRNA 発現と蛋白発現に相違がみられた。その理由として、1) mRNA の発現量が少ないこと、2) 蛋白質は合成されるものの turnover が早く検出できないこと、3) 蛋白質発現を抑制する microRNA の発現に差があること、などが考えられるが詳細には不明である。

SDF-1 あるいは CXCR4 の発現と治療成績との関連についてみると、SDF-1/CXCR4 のいずれかが発現している症例では、その発現の有無と 5 年累積生存率に有意な差は認められないが、SDF-1/CXCR4 両者ともに発現している症例は、SDF-1/CXCR4 両者共に発現しない症例と比べ、5 年累積生存率が有意に低かった。これまでの報告では、SDF-1/CXCR4 の発現と治療成績との関連は、SDF-1 の発現が予後不良の予測になること<sup>4)</sup>、また、CXCR4 は予後とは関連しない<sup>23)</sup>、など明確にされていない。

しかし、In vitro において、既述したように SDF-1/CXCR4 システムは、腫瘍細胞の走化、浸潤性を促進すること<sup>26)</sup>、また、マトリックス・メタロプロテナーゼを誘導すること<sup>17)</sup>、さらに、リンパ流路へ流入出する口腔扁平上皮癌細胞は、SDF-1/CXCR4 システムにより上皮間葉転換を生じること<sup>25)</sup>、などが明らかにされており、SDF-1/CXCR4 ケモカインシステムが、舌扁平上皮癌においても浸潤、転移に関与し、治療成績に影響を及ぼすと考えることは妥当と思われる。

以上のような SDF-1/CXCR4 ケモカインシステムが転移並びに生命予後に関与することを根拠に、ケモカインシステムを標的にした治療法の可能性が論じられている。既に海外においては、CXCR4 受容体抑制薬であるプレリキサホルが、非ホジキンリンパ腫および多発性骨髄腫における、自家骨髄移植において造血幹細胞の流動化を容易にすることから臨床応用が開始<sup>20)</sup>されており、さらに SDF-1/CXCR4 システムを標的にした転移抑制療法に対する研究も始められている<sup>18)</sup>。現在、腫瘍細胞の分化、アポトーシス誘導活性、細胞増殖抑制活性を有するとされるベスナリノンが、CXCR4 の発現調節機構を有する薬剤として注目をあびているが<sup>18)</sup>、合成阻害剤、中和抗体などの応用も踏まえつつ、新たな口腔癌治療の一助となりえることが期待される。

## 結 論

今回の結果より、SDF-1/CXCR4 システムは、舌扁平上皮癌のリンパ節転移および生命予後に関与する因子になり得ることが示唆された。しかしながら、必ずしも一致した見解が得られておらず、なお検討する余地が残されていると考えられた。

謝 辞 稿を終えるにあたり、終始ご教授を賜りました獨協医科大学口腔外科学講座、今井 裕教授に深甚なる感謝の意を表します。また、病理学のご指導をいただきました、獨協医科大学越谷病院病理部 上田善彦教授に深謝申し上げます。

## 参考文献

- 1) Muller A, Homey B, Hortensia S, et al : Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* **410** : 50-56, 2001.
- 2) Tsuboi K, Kodera Y, Nakanishi H, et al : Expression of CXCL12 and CXCR4 in pT3-stage gastric cancer does not correlate with peritoneal metastasis. *Oncol Rep* **20** : 1117-1123, 2008.
- 3) Ishigami S, Natsugoe S, Okumura H, et al : Clinical implication of CXCL12 expression in gastric cancer. *Ann Surg Oncol* **14** : 3154-3158, 2007.
- 4) Sasaki K, Natsugoe S, Ishigami S, et al : Expression of CXCL12 and its receptor CXCR4 in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* **21** : 65-71, 2009.
- 5) Wang DF, Lou N : Expression of CXCL12/CXCR4 and its correlation to prognosis in esophageal squamous cell carcinoma : *Chinese Jour of cancer* **28** : 154-158, 2009.
- 6) Akashi T, Koizumi K : Chemokine receptor CXCR4 expression and prognosis in patients with metastatic prostate cancer. *Cancer Sci* **99** : 539-542, 2008.
- 7) Yapp AC, Shia J, Butte JM, et al : CXCR4 Expression Predicts Patient Outcome and Recurrence Patterns after Hepatic Resection for Colorectal Liver Metastases. *Ann Surg Oncol* : Epub ahead of print, 2011.
- 8) Yamamoto E, Miyakawa A, Kohama G : Mode of invasion and lymph node metastasis in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Head Neck Surg* **6** : 938-947, 1984.
- 9) 善啓史 : 口腔癌患者の末梢血および骨髄液中における循環腫瘍細胞の検出. *愛媛医学* **21** : 162-173, 2002.
- 10) 斎藤輝海, 長尾徹, 神谷祐司, 他 : 口腔扁平上皮癌にお

- ける頸部リンパ節転移に関する p53, PTEN, Ki67 の免疫組織学的研究. 愛院大歯誌 **43** : 627-634, 2005.
- 11) 新谷悟, 中城公一, 日野聡史, 他 : 口腔癌におけるセンチネルリンパ節 (SN) 生検の臨床応用成績 とくに舌癌における SN 検出部位と転移陽性リンパ節との関連. 頭頸部癌 **31** : 79-83, 2005.
  - 12) 狩野岳史, 新垣敬一, 仲宗根敏幸, 他 : Stage I,II 舌癌の頸部リンパ節転移に関する検討 一次転移と後発転移の比較. 頭頸部癌 **33** : 449-453, 2007.
  - 13) 木村幸紀, 柳澤昭夫, 山本智理子, 他 : Stage I・II 舌癌頸部リンパ節後発転移例の予後 節外進展の組織像との関係. 頭頸部癌 **35** : 9-14, 2009.
  - 14) 大鶴洋, 郡司明美, 萬篤憲, 他 : Stage I,II 舌扁平上皮癌における組織内照射後の頸部後発リンパ節転移に関する検討. 頭頸部癌 **32** : 445-448, 2006.
  - 15) Kishimoto K, Mandai T, Sasaki A : Angiogenic Factors Predicting Prognosis and Metastasis in Oral Squamous Cell Carcinoma. Dentistry in Japan **43** : 74-77, 2007.
  - 16) Yamamoto S, Kawasaki G, Yoshitomi I, et al : Clinicopathologic significance of EpCAM expression in squamous cell carcinoma of the tongue and its possibility as a potential target for tongue cancer gene therapy. Oral Oncol **43** : 869-877, 2007.
  - 17) Moles M, Montoya J, Avila IR : Bases moleculares de la cancerizacion de cavidad oral. Av Odontostomatol **24** : 55-60, 2008.
  - 18) 内田大亮 : CXCR4 を標的とした口腔扁平上皮癌のリンパ節転移制御. 口腔組織培養学会 **17** : 35-40, 2008.
  - 19) 長澤丘司 : ケモカイン受容体と血管形成 SDF-1/PBSF とその受容体 CXCR4 の研究から. 感染・炎症・免疫 **30** : 70-76, 2000.
  - 20) Teicher BA, Fricker SP : CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer : Clin Cancer Res **16** : 2927-2931, 2010.
  - 21) 内田大亮 : ケモカインシステムによる口腔癌のリンパ節転移機構. 四国歯誌 **18** : 195-201, 2006.
  - 22) Helensia HO, Erica TS, Claudio RL, et al : Involvement of CXCL12 and CXCR4 in lymph node metastases and development of oral squamous cell carcinoma. Tumor Biol **29** : 262-271, 2008.
  - 23) Kwak MK, Hur K, Park DJ, et al : Expression of chemokine receptors in human gastric cancer : Tumour Biol **26** : 65-70, 2005.
  - 24) Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, et al : Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion : Cell **121** : 335-348, 2005.
  - 25) Almofti A, Uchida D, Begum NM, et al : The clinicopathological significance of the expression of CXCR4 protein in oral squamous cell carcinoma. Int J Oncol **25** : 65-71, 2004.
  - 26) Furusato B, Mohamed A, Uhlen M, et al : CXCR4 and cancer. Pathol Int **60** : 497-505, 2010.