

学位申請論文

網羅的遺伝子発現解析による口腔扁平上皮癌 発生母細胞の検討

獨協医科大学 口腔外科学

泉 さや香

要 旨 われわれは、“口腔扁平上皮癌と診断された症例のなかにも唾液腺由来の癌が含まれており生物学的悪性度が高い”という仮説をたて研究を進めている。まず、口底に発生した扁平上皮癌の遺伝子発現を Human Genome Survey Array (29,098 遺伝子) にて網羅的に解析し、クラスタリングを行うことにより、これらの腫瘍が粘膜扁平上皮由来か唾液腺由来かを検索できるマーカー(9 遺伝子) を同定した。さらに、これらのマーカーを用いて、口腔癌患者 73 症例(男性 45 例, 女性 28 例, 原発部位: 舌 36 例, 上顎歯肉 11 例, 下顎歯肉 9 例, 口底 6 例, 頬粘膜 5 例, 軟口蓋 2 例, 硬口蓋 2 例, 下唇 1 例, 上顎洞 1 例) の発生母細胞の検索を行った。各癌組織からトータル RNA を抽出し, cDNA を合成したのちそれぞれのマーカー遺伝子に対するプライマーを用いて PCR を行い, 電気泳動にて定性的に検討した。その結果 12 症例(約 16.4%) が唾液腺由来である可能性が示唆され, 唾液腺由来の口腔扁平上皮癌は, 粘膜由来の口腔扁平上皮癌と比較すると, 有意に転移能が高く, 予後が悪いことが明らかとなった。本マーカーを用いて口腔扁平上皮癌の発生母細胞を同定することは治療方針を決定するうえで重要な情報になる可能性が示唆された。

Key Words : 扁平上皮癌, マイクロアレイ, 唾液腺由来, 扁平上皮由来, 生物学的悪性度

緒 言

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^{1,2)}。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³⁾, 骨髄由来の細胞から胃癌が発生しうることを証明された⁴⁾。さらに Yamanaka らにより iPS 細胞が開発され, 多くの体細胞が幹細胞になる可能性を秘めていることが示された⁵⁾。

口腔癌の多くは扁平上皮癌 (squamous cell carcinoma : 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 3,000 個の小唾液腺が存在するといわれており, 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られる。Sato, Kawamata らは口腔癌, 唾液腺癌の研究を進める過程で⁶⁻⁹⁾, 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 TYS 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¹⁰⁾。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。

一方, われわれは, 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 GVHD 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, 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¹¹⁾。われわれは, 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。ネットワーク解析では FGF4 と Nanog を中心とするネ

平成 24 年 11 月 2 日受付, 平成 24 年 11 月 12 日受理
別刷請求先: 泉 さや香

〒 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

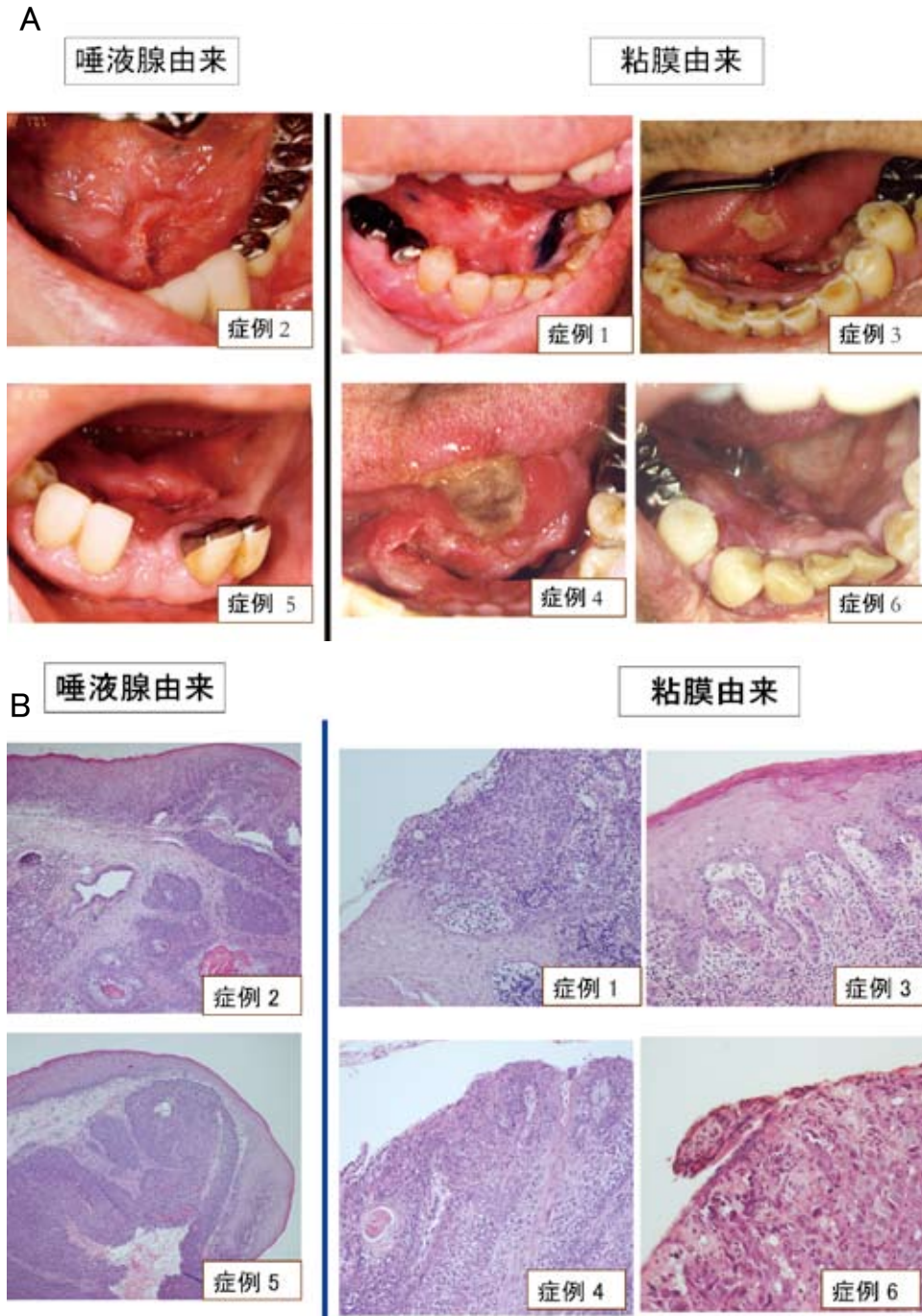


図1 マイクロアレイ解析を行った口底癌の肉眼所見および病理組織所見

A：肉眼所見. 唾液腺由来の腫瘍も、粘膜由来の腫瘍も肉眼所見はほぼ同様であり、それぞれに特徴的な所見は見られなかった。

B：病理組織所見. 唾液腺由来の腫瘍も、粘膜由来の腫瘍も病理組織所見はほぼ同様であり、癌組織の分化度も大きな差はなく、唾液腺由来と考えられる扁平上皮癌でも角化を示す部位が存在した。

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¹²⁾。

これまでの研究結果をもとに、われわれは以下のように

な仮説を立てている。すなわち、口腔扁平上皮癌は、(1) 上皮内に存在する幹細胞、(2) 唾液腺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

表1 マイクロアレイ解析を行った口底癌6症例の臨床病理学的特徴

	性別	年齢	組織型	pTNM分類	Anneroth	Y-K分類
症例1	男	56	扁平上皮癌	T3N2cM0	II	3
症例2	女	58	扁平上皮癌	T2N1M0	II	3
症例3	男	60	扁平上皮癌	T4N0M0	II	4D
症例4	男	60	扁平上皮癌	T2N1M0	I	3
症例5	男	74	扁平上皮癌	T4N2aM0	II	3
症例6	男	68	扁平上皮癌	T4N2cM0	II	3

表2 発生母細胞を検索した口腔扁平上皮癌の発生部位, 性別

原発部位	症例数 (%)	男性	女性
舌	36 (48.6)	22	14
上顎歯肉	11 (14.9)	4	7
下顎歯肉	9 (12.2)	6	3
口底	6 (8.2)	5	1
頬粘膜	5 (6.8)	4	1
軟口蓋	2 (2.7)	1	1
硬口蓋	2 (2.7)	1	1
下唇	1 (1.4)	1	0
上顎洞	1 (1.4)	1	0
合計	73 (100.0)	45	28

表3 発生母細胞を検索した口腔扁平上皮癌のTNM分類と病期別分類

	N0	N1	N2	N3	M1
T1	6	0	0	0	0
T2	28	6	3	0	0
T3	4	3	1	0	0
T4	3	9	10	0	0

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。

本研究では、上記仮説(2)を証明することを目的に、口腔扁平上皮癌と診断された組織の遺伝子発現を網羅的に検索し、その腫瘍の遺伝子発現のパターンが重層扁平上皮細胞に近いのか、唾液腺細胞に近いのかを解析し、口腔扁平上皮癌の発生母細胞（粘膜扁平上皮由来か、唾液腺由来か）を客観的に同定できるシステムを構築する。さらに、口腔扁平上皮癌症例で、発生母細胞の違いにより、生物学的悪性度（浸潤能、リンパ節転移能、遠隔転移能）、治療への反応性、予後が異なるか否かを検討する。すなわち、現在の臓器腫瘍、組織腫瘍という考え方に基づいた診断・治療態度を、発生母細胞別（発生体細胞性幹細胞別）腫瘍という概念で診断・治療をするという態度に変えるパラダイムシフトが可能であるか否かを検証する。

対象および方法

1. 症 例

(1) マイクロアレイ解析に用いた症例

2004年5月から2008年9月までに当科を受診し、研

究への患者の同意が得られた口底癌6症例の解析を行った(図1)。性別は男性5症例、女性1症例で、年齢は56歳から74歳で平均62.7歳であった。初診時の病理組織診断は6症例すべて扁平上皮癌であった(表1)。

(2) Reverse transcriptase polymerase chain reaction (以下RT-PCR)解析に用いた症例

1998年1月から2009年12月までに当科を受診し、研究への患者の同意が得られた症例で、病理組織学的に扁平上皮癌と診断された口腔癌73症例について検索を行った。73症例の腫瘍の発生部位は、舌36例、上顎歯肉11例、下顎歯肉9例、口底6例、頬粘膜5例、軟口蓋2例、硬口蓋2例、下唇1例、上顎洞1例であった(表2)。Stage1, 2の早期がんは43症例で、Stage3, 4の進行がんが30症例であった(表3)。

2. 細胞株

唾液腺由来扁平上皮癌の陽性コントロールとしてTYS細胞¹⁰⁾を、また口腔粘膜重層扁平上皮由来と考えられるOSC-20¹³⁾、HSC-4¹⁴⁾を使用した。全ての細胞は、10% (容量/容量、以下V/Vと略記する)牛胎児血清(Fetal Bovine Serum: FBS, EQITECH BIO, Inc.), 100 μg/ml ストレプトマイシン (Meiji Seika ファルマ株式会社.), 100 U/ml ペニシリン (Meiji Seika ファルマ株式会社.) 0.25 μg/ml アムホテシリン B (Sigma) を含むダルベッコ改変イーグル最少必須培地 (以下DMEMと略記する、日水製薬) を増殖培養液として用い、空気中に5%の割合で炭酸ガスを含む培養液中で37

表4 マーカー遺伝子に対するプライマーの設定

GeneNo.	Gene symbol	Upstream Primer Downstream Primer	PCR products (bp)	Annealing temp.	Cycles
Gene 1	NM002652	cattgccttctgttttctccag tagaggaaatcacctgggtgtg	506	60	30
Gene 2	NM001185	ggagacgttgattgtgaaag agtgaatggctgaggctttctt	507	60	30
Gene 3	NM015030	accatcctcaaaggattggcta tgaagatatggtggtggcattc	513	60	25
Gene 4	NM002343	agggaatggattgtggagaga tgctcaagcagttcaacatca	510	60	30
Gene 5	DMBT1	gaacaggtggagctggtctctt tgaaatgaccccgataatcaga	515	60	30
Gene 6	WFDC2	ctgcagaatgcttcagaacacc cctcttcgacctcaacacacag	502	60	30
Gene 7	NM152291	cagtgtcctggccagatgaaat tattggttgggaaaggagaag	217	60	30
Gene 8	NM006017	agcatcacaacagaggaagtgc cagacagcatctgattgacgtg	490	60	30
Gene 9	NM000740	atggagacctgaaagacatcg Tgccatttcattgtgaagaac	490	60	30

℃にて培養を行った。

3. RNA 抽出

対象患者において、化学療法、放射線照射が行われていない病変から癌組織を採取し、正常上皮の混入がなく、間質の混入が最小限で、小唾液腺の混入がないことを病理標本で確認の上、液体窒素で保存を行いマイクロアレイ解析のため、あるいはRT-PCR解析のためのRNA抽出に用いた。total RNAの抽出は、ISOGEN（ニッポンジーン）を用い、modified acid-guanidinium-thiocyanate-phenol-chloroform（AGPC）法にて行った。各組織（湿重量50-200mg）あるいは培養細胞葉10⁷個に1mlのISOGENを添加後、ホモジナイザー（Physcotron；日音医理工器器械、東京）にてホモジナイズし、0.2mlのクロロホルム（和光純薬）を加え遠心後、水相を回収した。その水相にイソプロパノール（和光純薬）を添加後、エタノール沈殿し、DEPC処理水に溶解した。抽出したtotal RNAは260nm、280nmで吸光度を測定し、定量すると同時にその比が1.6以上のものを以後の検索に用いた。1μgのtotal RNAを1%アガロースゲルにて電気泳動を行い28SリボソームRNAと18SリボソームRNAのバンドが明確に観察されるサンプルを分解の少ないRNAとしてマイクロアレイあるいはRT-PCR解析に用いた。

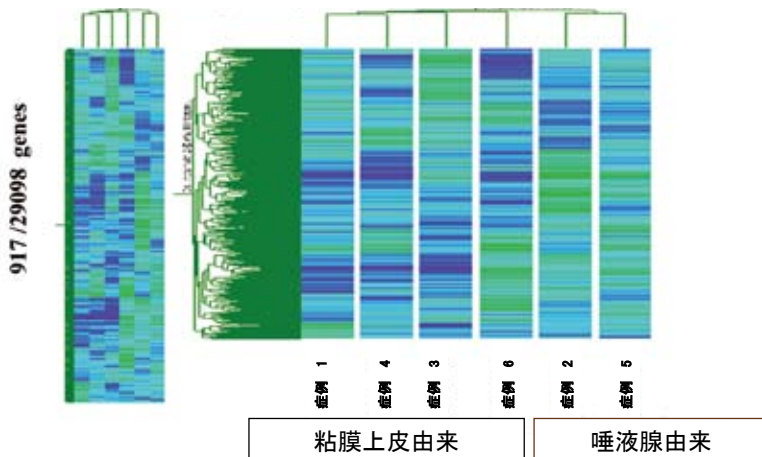
4. マイクロアレイ解析

使用したマイクロアレイは、Applied Biosystems社製のHuman Genome Survey Arrayで、29,098種類の遺伝子が搭載されている。データの読み取りは、同社製のAB1700 Chemiluminescent Microarray Analyzerを使用し、クラスタリングは、GeneSpring GX 7.3を用いて行った。これらの遺伝子を、さらにクラスタリング可能な最小の組み合わせを検討していくことにより、12個の遺伝子を同定した。

5. RT-PCR

RT-PCRは通法のごとく5μgのtotal RNA鋳型に、ランダムプライマー（タカラバイオ株式会社）、M-MLV-RT（タカラバイオ株式会社）を用いて逆転写しcDNAを合成した。目的の遺伝子の検索に先立って、内部コントロールとしてGAPDH、SCCA1を増幅しcDNAの質およびサンプル組織の大部分が上皮細胞（癌細胞）であることを定量PCR（TaqMan PCR）にて検討した。GAPDHはすべてのサンプルで増幅されたが、一部のサンプルでは30サイクルを超えないと立ち上がってこないものもあり、これらはcDNAの質が低いと考え検討からはずした。一方SCCA1もすべてのサンプルで増幅されたが、GAPDHが30サイクル以下で増幅しているにも関わらず35サイクル以上でしか立ち上がってこないものは、上皮成分がほとんど入っていないと考

A



B

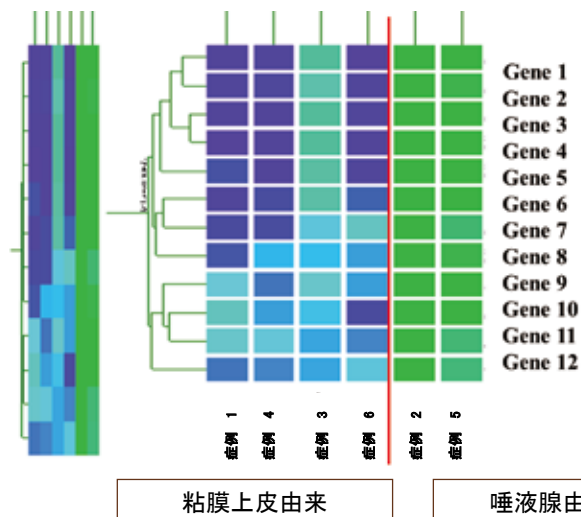


図2 マイクロアレイ解析

A: 917 遺伝子を用いたクラスタリング解析. マイクロアレイ解析の結果は, 6 症例全てで 29,098 種類の遺伝子発現を数値化し, すでにわれわれが持っている正常唾液腺と正常口腔粘膜のデータより, 唾液腺と口腔粘膜上皮で 3 倍以上の発現差が認められる遺伝子 917 種類を用いてクラスタリングを行った. 症例 1, 3, 4, 6 口腔粘膜上皮のグループに, 症例 2, 5 は唾液腺のグループに分けることができた. 黄緑色が高発現で, 青が低発現を示している.

B: 12 遺伝子を用いたクラスタリング解析. 二つのグループに分けることが出来る最少の遺伝子数は 12 遺伝子であった.

え検討から除外した.

目的の遺伝子の増幅は TYS 細胞あるいは OSC-20 細胞, HSC-4 細胞をテンプレートにし, 所定のプライマーで 55°C あるいは 60°C のアニーリング温度, 30 サイクルあるいは 35 サイクルで増幅を行った. プライマーの設定はバリエーションのコアになる部分を増幅でき, かつゲノム由来の産物を区別でき, アガロース電気泳動で解析可能な産物が増幅されるような設計とした (表 4). gene 10 はその構造, 機能が不明であり, mRNA 全体像がつかめないため, プライマーの設定はできず, gene 11 はバリエーションが多く, コアになる部分の増幅が不可能でありプライマーの設置が出来なかったため, RT-PCR は 9 遺伝子に対して行った. PCR の条件は, バックグラウンドが低く, 予想される位置に特異的に遺伝子が増幅されるアニーリング温度, 増幅サイクルを, そ

れぞれの遺伝子で設定した. また, 増幅された遺伝子断片は 1% アガロースゲルにて電気泳動し, その発現を定性的 (-: 発現なし, +: 弱陽性, ++: 中等度陽性, +++: 強陽性) に検討した.

6. 統計検定

統計処理には Stat View を使用し, χ^2 検定を行った. $p < 0.05$ を有意とした.

結果

1. マイクロアレイ解析

6 症例全てで 29,098 種類の遺伝子発現を数値化し, すでにわれわれが持っている唾液腺と口腔粘膜上皮で 3 倍以上の発現差が認められる遺伝子 917 種類を用いて, クラスタリングを行った (図 2A). その結果, 症例 1, 3,

表 5 マーカー遺伝子の特徴

Gene No.	Gene symbol	mRNA length (bp)	Genome	No. of AA	Putative function
Gene 1	NM002652	591	4 exons	147AA	Prolactin-related
Gene 2	NM001185	1278, var *	4 exons	299 AA	Secretory protein, zinc-binding
Gene 3	NM015030	11706, var *	64 exons	3014 AA	Leukemia-related
Gene 4	NM002343	2593, var *	18 exons	866 AA	Transferrin-related
Gene 5	DMBT1	5802, var *	53 exons	1786 AA	Tumor suppressor
Gene 6	WFDC2	570, var *	4 exons	125 AA	Protease inhibitor
Gene 7	NM152291	2467, var *	5 exons	378 AA	Secretory protein, Mucin family
Gene 8	NM006017	3977, var *	29 exons	866 AA	Stem cell related
Gene 9	NM000740	2757, var *	5 exons	591 AA	Cholinergic receptor family
Gene 10	CH471153	unknown	unknown	unknown	unknown
Gene 11	NM_006669	2971, var *	16 exons	651 AA	Leukocyte Ig-like receptor

* : 複数のバリエーションが存在する

4, 6 は口腔粘膜上皮のグループに、症例 2, 5 は唾液腺のグループに分けることができた。さらにこの 917 遺伝子の組み合わせを最少化することにより、これらの症例のクラスタリングが可能である遺伝子を 12 種類に絞り込んだ。これら 12 遺伝子を用いてクラスタリングしても、明らかに症例 1, 3, 4, 6 と症例 2, 5 の 2 群に分けることができる (図 2B)。以上の結果より、症例 1, 3, 4, 6 は粘膜由来、症例 2, 5 は唾液腺由来の口腔扁平上皮癌と考えられた。ここで、原発巣の肉眼所見、病理組織所見を見返してみても、唾液腺由来の腫瘍も、粘膜由来の腫瘍も、ほぼ同様でそれぞれに特徴的な所見は見られなかった (図 1)。

2. マーカー遺伝子の特徴

マイクロアレイで同定されたマーカー遺伝子は 12 個であったが、そのうち二つは、同一の遺伝子であったため、実際に含まれていた遺伝子は 11 個であった。WEB 上のデータベースで、11 遺伝子の mRNA の全貌 (mRNA の全長、コードするたんぱく質のアミノ酸数)、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)、予想されるたんぱく質の機能を検索した (表 5)。11 遺伝子は唾液腺の機能、構造に関連する遺伝子、幹細胞機能に関連するもの、腫瘍発生に関連するものが含まれていた。

3. 口腔扁平上皮癌組織におけるマーカー遺伝子の発現

唾液腺由来の扁平上皮癌から樹立された TYS 細胞は 9 遺伝子中 6 遺伝子の発現が強く認められた。しかしながら、粘膜扁平上皮由来の扁平上皮癌から樹立されたと考えられている HSC-4 と OSC-20 は gene 3 と gene 7

がごくわずかに発現しているのみであり、これらのマーカーが唾液腺由来の扁平上皮癌を同定するのに有用であることが示された (図 3, 表 6)。なお、gene 2 と gene 4 はこれらの細胞では発現が見られなかったが (図 3)、口腔扁平上皮癌組織で発現が見られたものがあり、それらを陽性コントロールとして使用した (PCR 結果は示していない)。

検索した 73 症例の中で、9 遺伝子のうち 5 個以上の遺伝子発現が見られた症例が 11 症例あった (表 6)。また、4 遺伝子しか検索できていないが、すべてで強い発現が見られた症例があり、これを加えた 12 症例 (16.4%) を小唾液腺由来扁平上皮癌と考え臨床病理学的な検討を行った (表 6)。これらの腫瘍の原発部位は、上顎歯肉、下顎歯肉、舌、頬粘膜、口底と、口腔のすべての部位に及んでいた (表 6)。

4. 発生母細胞別の口腔扁平上皮癌の臨床病理学的悪性度の比較

唾液腺由来と考えられる扁平上皮癌 12 症例と、粘膜由来扁平上皮癌 61 症例の初診時の原発巣の大きさ、進展範囲、病理組織学的な浸潤様式を比較したところ有意な差は認められず、両群の見かけの像は変わらないことが示された (図 4A, B)。

次に頸部リンパ節転移と、5 年生存率について検討した。唾液腺由来と考えられる症例は 12 症例中 7 例 (58.3%) に頸部リンパ節転移が認められ、粘膜上皮由来と考えられる症例は 61 例中 22 例 (36.0%) であり、唾液腺由来扁平上皮癌のほうが頸部リンパ節転移は有意に多かった (図 4C)。

また、カプランマイヤー法による累積 5 年生存率を両群で比較したところ、唾液腺由来と考えられる症例が

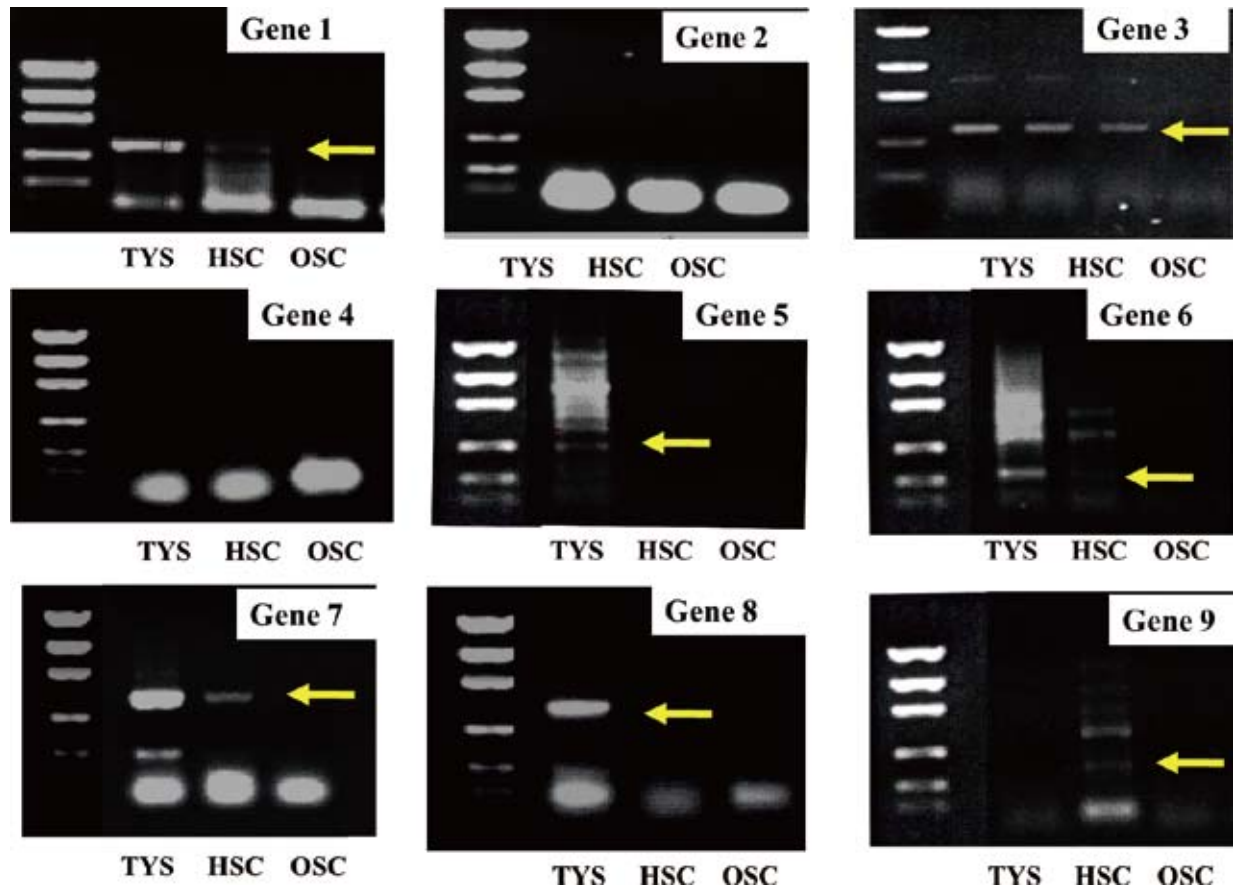


図3 9個のマーカー遺伝子の培養細胞での発現検索

唾液腺由来の扁平上皮癌から樹立されTYS細胞は9遺伝子中6遺伝子の発現が強く認められた。しかしながら、粘膜扁平上皮由来の扁平上皮癌から樹立されたと考えられているHSC-4とOSC-20はgene 3とgene 7がごくわずかに発現しているのみであった。なお、gene 2とgene 4はこれらの細胞では発現が見られなかった。

表6 口腔扁平上皮癌組織におけるマーカー遺伝子の発現

症例 No	原発部位	gene 1	gene 2	gene 3	gene 4	gene 5	gene 6	gene 7	gene 8	gene 9
1	上顎歯肉	+	+	+	—	—	—	—	+++	+
2	下顎歯肉	++	+	—	+	—	—	++	++	+
3	上顎歯肉	+	+	—	+	+++	—	+++	+	-
4	舌	+	+	NE	+	++	NE	+	+	NE
6	上顎歯肉	+	+++	+++	++	++	++	+++	+	+++
7	舌	+	+++	+++	++	NE	NE	NE	NE	NE
15	頬粘膜	—	+++	+	—	—	+	++	+	++
17	舌	++	+	—	—	+	+	+	++	+
56	上顎歯肉	+	+++	—	—	++	—	—	++	+
64	口底	+	+	—	—	++	+	—	++	+
68	上顎歯肉	+	—	+++	+++	—	++	+++	—	
72	舌	—	++	—	—	—	+	+	+++	+
TYS	唾液腺由来	+++	—	++	—	++	+	++	++	—
HSC	粘膜由来	—	—	+	—	—	—	+	—	—
OSC	粘膜由来	—	—	+	—	—	—	—	—	—

+++ : 強陽性, ++ : 中等度陽性, + : 陽性, - : 陰性, NE : not examined

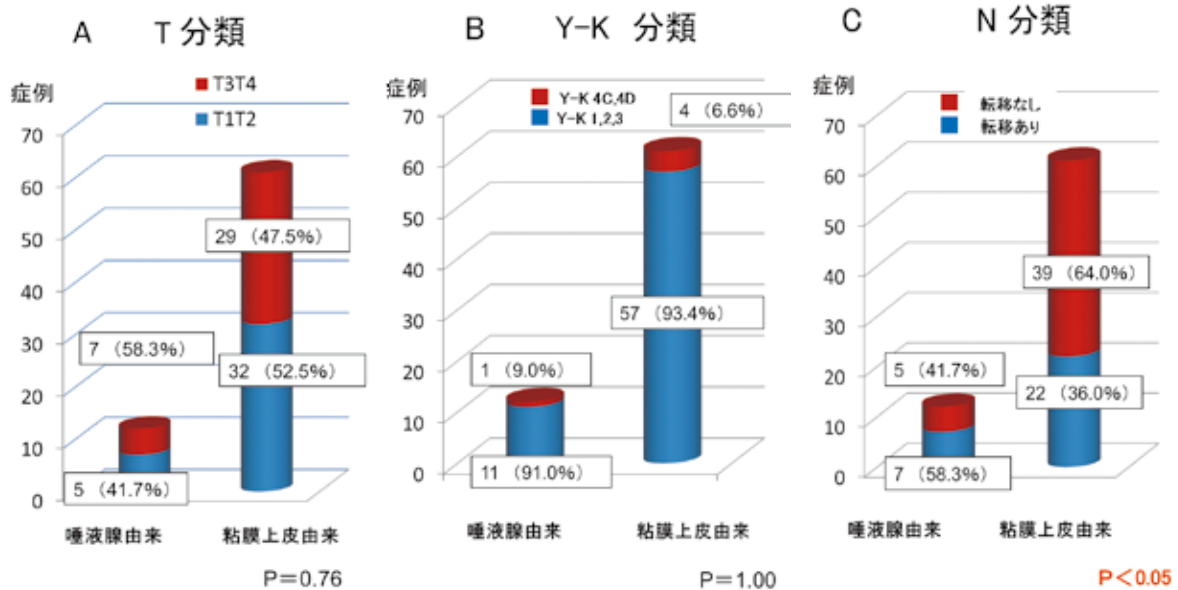


図4 唾液腺由来扁平上皮癌と粘膜由来扁平上皮癌の臨床病理学的特性

A: T分類, B: Y-K分類, C: N分類. 唾液腺由来扁平上皮癌と粘膜由来扁平上皮癌の初診時の原発巣の大きさ, 進展範囲, 病理組織学的な浸潤様式に有意な差は認められなかった. 唾液腺由来と考えられる症例は12症例中7例(58.3%)に頸部リンパ節転移が認められ, 粘膜上皮由来と考えられる症例は61例中22例(36.0%)であり, 唾液腺由来扁平上皮癌のほうが有意に多かった.

カプラン・マイヤー法による累積5年生存率

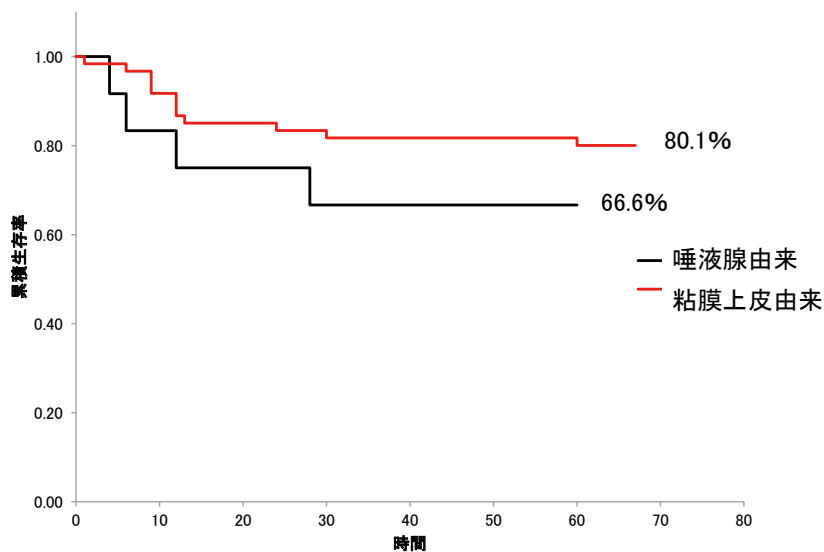


図5 唾液腺由来扁平上皮癌患者と粘膜上皮由来扁平上皮癌患者の5年生存率の比較
カプランマイヤー法による累積5年生存率を両群で比較したところ, 唾液腺由来と考えられる症例が66.6%で, 粘膜上皮由来が80.1%であり, 唾液腺由来の症例が約14%不良であったが, 症例数が少なく有意な差は見られなかった.

66.6%で, 粘膜上皮由来が80.1%であり, 唾液腺由来の症例が約14%不良であったが, 症例数が少なく有意な差は見られなかった(図5).

考 察

癌の生物学的悪性度を評価し, 治療方針に反映させる考え方は古くからなされてきた. ほとんどの場合は, 病理組織像^{15,16)}や遺伝子変異¹⁷⁾, 遺伝子発現^{18,19)}を指標

に検討されている。口腔扁平上皮癌の場合も TNM 分類²⁰⁾、病理組織学的な悪性度分類^{21,22)}、p53 とその関連分子の異常^{23~37)} の解析等がなされてきた。本研究では、そのような見かけの表現形質ではなく、癌の発生母細胞を同定し、発生母細胞の違いが生物学的な悪性度の決定に中心的な役割を演じているか否かを検証し、その情報を治療方針の決定に利用できるか否かを検討した。

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となった。従来、発生母細胞が異なる癌が、同一の癌として診断され、同一のプロトコルで治療が行われていることには問題があると思われる。また、研究分野においても異なった癌を同一の癌として、その生物学的な特性を比較していることになる。今回、唾液腺由来と考えられた口腔扁平上皮癌の発生部位は、上顎歯肉、下顎歯肉、舌、頬粘膜、口底であった。頬粘膜、口底には多数の小唾液腺が存在するため、発生した腫瘍が小唾液腺由来である可能性は理解できるが、歯肉、舌に発生した扁平上皮癌が小唾液腺由来である可能性はいかがであろうか。これらの症例の発生部位を再度検討すると、歯肉に発生した腫瘍は、いわゆる角化歯肉部からの発生ではなく、非角化部の頬粘膜寄りの部位からの発生で、腫瘍の進展で歯槽部への浸潤が見られるものであった。一方、舌に発生した腫瘍も、舌縁より下方の非角化部の口底側からの発生であり、その部位にも多くの小唾液腺が存在する部位であった。

一般に、唾液腺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。口腔扁平上皮癌の手術療法における安全域 (safety margin) は一般的には 10 mm と考えられている。一方、唾液腺癌は扁平上皮癌よりも大きな安全域を設定することが求められ、腺様嚢胞癌においては 20~25 mm 程度必要であると言われている。病理組織学的に扁平上皮癌と診断された症例でも唾液腺由来であることが想定される場合は、唾液腺腫瘍の切除の原則に準じて手術計画を立てる必要があるかもしれない。今回、発生母細胞の異なる腫瘍の化学療法感受性、放射線感受性の検証は、症例数が少なく行えなかったが、術前化学療法や術後化学療法、補助化学療法、放射線治療を計画する場合も、今回の結果は重要である。病理組織学的に扁平上皮癌だったから、抗癌剤感受性が高いだろうと、臓器腫瘍、組織腫瘍という考え方に基づいた診断・治療態度で、安易に術前化学療法を選択することにより、腫瘍の増大による up-staging で手術不可能になる症例があるが、それらの腫瘍を選別できる可能性がある。

頸部リンパ節転移に対する治療態度としても、唾液腺由来扁平上皮癌に対しては、術前の画像診断の基準を引き下げ、疑わしきリンパ節があれば、積極的に頸部廓清を施行することも考慮すべきであろう。遠隔転移の予防、治療に対する態度は難しい点が多い。遠隔転移の可能性が高いとしても、それに対する予防法、治療法は確立していないため、その情報をどのように活用するかが問題である。しかも唾液腺癌は扁平上皮癌と比較すると抗癌剤感受性が低く、有効な抗癌剤も報告されていない。癌の遠隔転移の成立はすでに全身に播種された細胞のうち、幹細胞の特性を保持した細胞が、その異所環境に適応することにより、増殖できる足場を構築し、免疫細胞の攻撃を回避することにより、腫瘍を形成すると考えられる。このような考え方に基づいて、唾液腺由来扁平上皮癌に対しては、まず、適切な局所治療により原発、所属リンパ節の腫瘍を完全に排除し、遠隔臓器に存在する dormant な癌細胞に対して、増殖抑制剤 (抗癌剤や分子標的薬) の投与と並行して、免疫治療 (樹状細胞治療や癌ペプチドワクチン治療) を行うことにより遠隔転移の予防が可能かもしれない。

本研究で明らかにされた概念を確固たるものにするためには症例数を増やし、簡便に検索するシステムを構築する必要がある。現在、これら 9 遺伝子産物に対する免疫染色の条件設定を行っており、他施設共同研究により病理標本からこれら遺伝子産物の発現が検索できれば、発生母細胞別腫瘍の診断の重要性が確認でき、治療方針の立案にも利用可能であることが検証できると考えている。

結 論

口腔扁平上皮癌は、粘膜扁平上皮由来と小唾液腺由来が混在している可能性が高いことが示された。小唾液腺由来の口腔扁平上皮癌は粘膜重層扁平上皮由来の口腔扁平上皮癌と比較して、リンパ節転移能が高く、5 年生存率が低いことが明らかとなった。

謝 辞 稿を終えるにあたり、本研究に対しご指導を賜った口腔外科学講座今井裕教授、本研究の実施に際し終始ご指導を戴いた口腔外科学講座川又均准教授に心から謝意を表します。また、研究の円滑な発展のために特別のご配慮を戴いた口腔外科学講座の教室員の方々に深謝いたします。

参考文献

- 1) Alison MR, Poulson R, Jeffery R, Dhillon AP, Quaglia A, Jacob J, Novelli M, Prentice G, Williamson J, Wright

- NA : Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature* **406** : 257, 2000.
- 2) Jackson KA, Majka SM, Wang H, Pocius J, Hartley CJ, Majesky MW, Entman ML, Michael LH, Hirschi KK, Goodell MA : Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* **107** : 1395-1402, 2001.
 - 3) Okamoto R, Yajima T, Yamazaki M, Kanai T, Mukai M, Okamoto S, Ikeda Y, Hibi T, Inazawa J, Watanabe M : Damaged epithelia regenerated by bone marrow-derived cells in the human gastrointestinal tract. *Nat Med* **8** : 1011-1017, 2002.
 - 4) Houghton J, Stoicov C, Nomura S, Rogers AB, Carlson J, Li H, Cai X, Fox JG, Goldenring JR, Wang TC : Gastric cancer originating from bone marrow-derived cells. *Science* **306** : 1568-1571, 2004.
 - 5) Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K and Yamanaka S : Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* **131** : 861-872, 2007.
 - 6) Nakashiro K, Kawamata H, Hino S, Uchida D, Miwa Y, Hamano H, Omotehara F, Yoshida H, Sato M : Down-regulation of TSC-22 (transforming growth factor beta-stimulated clone 22) markedly enhances the growth of a human salivary gland cancer cell line in vitro and in vivo. *Cancer Res* **58** : 549-555, 1998.
 - 7) Kawamata H, Nakashiro K, Uchida D, Hino S, Omotehara F, Yoshida H, Sato M : Induction of TSC-22 by treatment with a new anti-cancer drug, vesnarinone, in a human salivary gland cancer cell. *Br J Cancer* **77** : 71-78, 1998.
 - 8) Azuma M, Yoshida H, Kawamata H, Yanagawa T, Furumoto N, Sato M : Cellular proliferation and ras oncogene of p21 21,000 expression in relation to the intracellular cyclic adenosine 3' : 5'-monophosphate levels of a human salivary gland adenocarcinoma cell line in culture. *Cancer Res* **48** : 2898-2903, 1988.
 - 9) Azuma M, Kawamata H, Kasai Y, Yanagawa T, Yoshida H, Sato M : Induction of cells with a chondrocyte-like phenotype by treatment with 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 in a human salivary acinar cell line. *Cancer Res* **49** : 5435-5442, 1989.
 - 10) Yanagawa T, Hayashi Y, Yoshida H, Yura Y, Nagamine S, Bando T, Sato M : An adenoid squamous carcinoma-forming cell line established from an oral keratinizing squamous cell carcinoma expressing carcinoembryonic antigen. *Am J Pathol* **124** : 496-509, 1986.
 - 11) Arai Y, Arai H, Aoyagi A, Yamagata T, Mitani K, Kubota K, Kawamata H, Imai Y : A Solid Tumor of Donor Cell-Origin After Allogeneic Peripheral Blood Stem Cell Transplantation : *Am J Transplant* **6** : 3042-3043, 2006.
 - 12) Kawamata H, Imai Y : Activation of the stem cell-related gene network in the metastasized lymph nodes from SCC of oral floor. *Proceedings of 69th Annual Meeting of the Japan Cancer Association*, p107, 2010
 - 13) Kawashiri S, Kumagai S, Kojima K, Harada H, and Yamamoto E : Development of a New Invasion and Metastasis Model of Human Oral Squamous Cell Carcinomas, *Oral Oncol, Eur J Cancer* **31B** : 216-221, 1995.
 - 14) Momose F, Araida T, Negishi A, Ichijo H, Shioda S, Sasaki S : Variant sublines with different metastatic potentials selected in nude mice from human oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med* **18** : 391-395, 1989.
 - 15) Friedl P, Locker J, Sahai E, Segall JE : Classifying collective cancer cell invasion. *Nat. Cell Biol* **14** : 777-783, 2012.
 - 16) Aznavoorian S, Murphy AN, Stetler-Stevenson WG, Liotta LA : Molecular aspects of tumor cell invasion and metastasis. *Cancer* **71** : 1368-1383, 1993.
 - 17) Lazarov M, Kubo Y, Cai T, Dajee M, Taratani M, Lin Q, et al : CDK4 coexpression with Ras generates malignant human epidermal tumorigenesis. *Nature Medicine* **8** : 1105-1114, 2002.
 - 18) Sasahira T, Kurihara M, Bhawal U.K, Ueda N, Shimamoto T, Yamamoto K, et al : Downregulation of miR-126 induces angiogenesis and lymphangiogenesis by activation of VEGF-A in oral cancer. *British Journal of Cancer* **107** : 700-706, 2011.
 - 19) Sulzmaier FJ, Valmiki MK, Nelson DA, Caliva MJ, Geerts D, Matter ML, White EP, Ramos JW : PEA-15 potentiates H-Ras-mediated epithelial cell transformation through phospholipase D. *Oncogene* **31** : 3547-3560, 2012.
 - 20) Leon B, John WE, Peter R, David S : The WHO Classification of Head and Neck Tumours. Editorial and Consensus Conference in Lyon, France, July 16-19, 2003.
 - 21) Shivakumar M.S, Narayan T.V, Balasundari S, Leeky M, Sathana S : Role of angiogenesis in oral squamous

- cell carcinoma development and metastasis : an immunohistochemical study. *Int J Oral Sci* **3** : 216-224, 2011.
- 22) Song F, Qiong LT, Ying JL, Wei LC, Jin SL, Zhi QH, et al : A review of clinical and histological parameters associated with contralateral neck metastases in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Sci* **3** : 180-191, 2011.
- 23) Kawamata H, Omotehara F, Nakashiro K, Uchida D, Shinagawa Y, Tachibana M, Imai Y, Fujimori T : Oncogenic mutation of the p53 gene derived from head and neck cancer prevents cells from undergoing apoptosis after DNA damage. *Int J Oncol* **30** : 1089-1097, 2007.
- 24) Hoque MO, Kawamata H, Nakashiro K, Omotehara F, Hino S, Uchida D : Dysfunction of the p53 tumor suppressor pathway in head and neck cancer. *Int J Oncol* **21** : 119-126, 2002.
- 25) Shinagawa Y, Kawamata H, Omotehara F, Nakashiro K, Hoque MO, Furihata T, Horiuchi H, Imai Y, Fujimori T, Fujibayashi T : Evaluation of the chemosensitivity of head and neck cancer cells based on the diverse function of mutated-p53. *Int J Oncol* **22** : 383-389, 2003.
- 26) Yamamoto E, Kohama G : Mode of invasion, Bleomycin sensitivity and clinical course in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer* **26** : 2175-2180, 1983.
- 27) Michikawa C, Uzawa N, Sato H, Okada Y, Amagasa T : Epidermal growth factor gene copy number aberration at the primary tumor is significantly associated with extracapsular spread in oral cancer. *Br J Cancer* **104** : 850-855, 2011.
- 28) Kawamata H, Uchida D, Nakashiro K, Hino S, Omotehara F, Yoshida H, Sato M : Haematogenous cytokeratin 20 mRNA as a predictive marker for recurrence in oral cancer patients. *Br J Cancer* **80** : 448-452, 1999.
- 29) Uchida D, Kawamata H, Nakashiro K, Omotehara F, Hino S, Hoque MO, et al : Low-dose retinoic acid enhances in vitro invasiveness of human oral squamous-cell-carcinoma cell lines. *Br J Cancer* **85** : 122-128, 2001.
- 30) Begum NM, Nakashiro K, Kawamata H, Uchida D, Shintani S, Ikawa Y : Expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and the growth inhibitory effect of its synthetic ligands in human salivary gland cancer cell lines. *Int J Oncol* **20** : 599-605, 2002.
- 31) Kawamata H, Uchida D, Nakashiro K, Hino S, Omotehara F, Yoshida H, Sato M : Haematogenous cytokeratin 20 mRNA as a predictive marker for recurrence in oral cancer patients. *Br J Cancer* **80** : 448-452, 1999.
- 32) Doi Y, Kawamata H, Ono Y, Fujimori T, Imai Y : Expression and cellular localization of TSC-22 in normal salivary glands and salivary gland tumors : implications for tumor cell differentiation. *Oncol Rep* **19** : 609-616, 2008.
- 33) Kawamata H, Omotehara F, Nakashiro K, Uchida D, Hino S, Fujimori T. Vesnarinone : a differentiation-inducing anti-cancer drug. *Anticancer Drugs* **14** : 391-395, 2003.
- 34) Uchida D, Omotehara F, Nakashiro K, Tateishi Y, Hino S, Begum NM, Fujimori T, Kawamata H : Posttranscriptional regulation of TSC-22 (TGF-beta-stimulated clone-22) gene by TGF-beta 1. *Biochem Biophys Res Commun* **305** : 846-854, 2003
- 35) Hino S, Kawamata H, Omotehara F, Uchida D, Begum NM, Yoshida H, Sato M, Fujimori T : Leucine zipper structure of TSC-22 (TGF-beta stimulated clone-22) markedly inhibits the anchorage-independent growth of salivary gland cancer cells. *Oncol Rep* **9** : 371-374, 2002.
- 36) Kawamata H, Uchida D, Hamano H, Kimura-Yanagawa T, Nakashiro KI, Hino S, et al : Active-MMP2 in cancer cell nests of oral cancer patients : correlation with lymph node metastasis. *Int J Oncol* **13** : 699-704, 1998.
- 37) Kawamata H, Nakashiro K, Uchida D, Harada K, Yoshida H, Sato M : Possible contribution of active MMP2 to lymph-node metastasis and secreted cathepsin L to bone invasion of newly established human oral-squamous-cancer cell lines. *Int J Cancer* **70** : 120-127, 1997.