九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

A study on the expression and function of p75 neurotrophin receptor (p75NTR) in oral squamous cell carcinoma

清末, 崇裕
九州大学大学院歯学府口腔顎顔面病態学講座顎顔面腫瘍制御学分野

https://doi.org/10.15017/19957

出版情報：九州大学, 2010, 博士（歯学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：

口腔扁平上皮癌における p75 neurotrophin receptor (p75NTR) の発現および機能に関する研究

A study on the expression and function of p75 neurotrophin receptor (p75NTR) in oral squamous cell carcinoma

2011 年

九州大学大学院歯学府口腔顎顔面病態学講座
顎顔面腫瘍制御学分野
清末 崇裕

指導教員

九州大学大学院歯学研究院口腔顎顔面病態学講座
顎顔面腫瘍制御学分野
中村 誠司 教授

本研究の一部は下記の学術雑誌に投稿中である。

Immunohistochemical localization of p75 neurotrophin receptor (p75NTR) in oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma

Takahiro Kiyosue, Shintaro Kawano, Ryota Matsubara, Yuichi Goto, Mitsuhiro Hirano
Takeshi Toyoshima, Ryoji Kitamura, Kazunari Oobu, and Seiji Nakamura

Submitted to **Journal of Oral Pathology and Medicine**

略語一覧

ANOVA: analysis of variance

BDNF: brain-derived neurotrophic factor

cDNA: complementary DNA

CK: cytokeratin

CSC: cancer stem cell (癌幹細胞)

DEPC: dietyl pyrocarbonate

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DTT: dithiothreitol

GAPDH: glycelaldehyde-3-phosphate dehydrogenase

HYP: epithelial hyperplasia (上皮性過形成)

iPS cell: induced pluripotent stem cell

MLD: mild dysplasia (軽度異形成)

MOD: moderate dysplasia (中等度異形成)

NGF: nerve growth factor

NOE: normal oral epithelium (正常口腔粘膜上皮)

NT-3: neurotrophin-3

NT-4: neurotrophin-4

OL: oral leukoplakia (口腔白板症)

OSCC: oral squamous cell carcinoma (口腔扁平上皮癌)

PBS: phosphate-buffered saline

p75NTR: p75 neurotrophin receptor

RT-PCR: reverse transcriptase-polymerase chain reaction

SED: severe dysplasia (重度異形成)

siRNA: small interfering RNA

TA cell: transit-amplifying cell

TNF: tumor necrosis factor

TrkA: tropomyosin receptor kinase A

目　次

要 旨 ―――― 5

緒 言 ―――― 8

材料および方法 ―――― 12

結 果 ―――― 20

研究 1

口腔白板症および口腔扁平上皮癌の生検材料における **p75NTR** の免疫組織化学的検討

1-1. 正常組織および口腔白板症の生検材料における **p75NTR** の発現 ―――― **20**

1-2. 口腔扁平上皮癌の生検材料における **p75NTR** の発現 ―――― **23**

1-3. 口腔扁平上皮癌の生検材料における **p75NTR** の発現と臨床所見との関連 ―――― **26**

研究 **2**

口腔扁平上皮癌細胞株における **p75NTR** の発現および機能解析に関する検討

2-1. ヒト扁平上皮癌細胞株における **p75NTR** の発現 ―――― **29**

2-2. recombinant human β-NGF が **OSCC** の細胞増殖に与える影響 ―――― **30**

2-3. p75NTR シグナルインヒビターが **OSCC** の細胞増殖に与える影響 ―――― **31**

2-4. ***p75NTR***、***TrkA***、***NGF*** ノックダウンが **OSCC** の細胞増殖に与える影響 ―――― **32**

考 察 ―――― 34

謝 辞 ―――― 39

参考文献 ―――― 40

要　旨

癌は長期にわたる遺伝子変異の蓄積により発生するが、遺伝子変異が蓄積するためには長期間生体内に存在する細胞が必要となる。皮膚、肝臓、骨髄など多くの組織に存在している組織幹細胞は、細胞周期が遅いため長期間生体内に留まっており、分化の方向性が決まった細胞と比べ遺伝子変異を蓄積しやすいことから、癌の発生に関与する重要な細胞の１つとして考えられている。近年、癌組織にも組織幹細胞と同様の性質 (自己複製能、多分化能)を有する癌幹細胞 (cancer stem cell: CSC)が明らかになってきており、癌の形成･維持に関与していることが示唆されているが、その由来については明らかではない。しかし、組織幹細胞と同様の性質を有することから、組織幹細胞が癌化したものと考えられ、近年、組織幹細胞に特異的なマーカーを用いて様々な臓器の癌組織において分離、同定されつつある。しかしながら、口腔扁平上皮癌 (oral squamous cell carcinoma: OSCC)においてはその存在は明らかにされていない。そこで、本研究では正常口腔粘膜の上皮幹細胞マーカーである p75 neurotrophin receptor (p75NTR)に着目し、OSCC の形成や分化および増殖にどのように関与しているかを検索した。そのため、まず OSCC およびその前癌病変である口腔白板症 (oral leukoplakia: OL)の生検材料における p75NTR の発現を免疫組織化学的に解析し、上皮性異形成や OSCC の組織学的悪性度との関連について検討を行った。さらに、OSCC 細胞株を用いて、その発現および機能について検討した。

以下に本研究で得られた結果をまとめた。

1. 口腔白板症および口腔扁平上皮癌の生検材料における p75NTR の免疫組織化学的検討

正常口腔粘膜上皮 (normal oral epithelium: NOE)、OL および OSCC の生検材料における p75NTR、細胞増殖活性のマーカーである Ki-67、上皮基底細胞のマーカーである

cytokeratin 5 (CK5)の発現を免疫組織化学的に検索したところ、NOE では p75NTR は上皮基底層のみに、Ki-67 は主に傍基底層に、そして CK5 は上皮基底層に発現が認められた。OL においては、軽度異形成 (mild dysplasia: MLD)、中等度異形成 (moderate dysplasia: MOD)、および重度異形成 (severe dysplasia: SED)と上皮性異形成の程度にかかわらず、p75NTR の発現は NOE と同様上皮基底層のみに発現していた。しかし、Ki-67、CK5 は上皮異形成の程度が重度になるにつれて、発現率が高くなっていた。

OSCC においては、高分化型ではこれらが癌胞巣の最外層に限局して発現していたが、中分化および低分化型 OSCC ではほぼすべての癌細胞に発現が認められた。また、p75NTR 陽性率と臨床病理組織学的所見との関連を検討したところ、分化度においては低分化な OSCC ほどこれらの陽性率が有意に高くなり、浸潤様式においても grade が高いほど p75NTR 陽性率は有意に高かった。また、頸部リンパ節転移の発生頻度においては、非転移群に比べ転移群において p75NTR 陽性率が有意に高かった。また、疾患特異的累積生存率は、p75NTR 低発現群 (<60%)と比較して高発現群 (≧60%)は有意に低く、予後が不良であった。

2. 口腔扁平上皮癌細胞株における p75NTR の発現および機能解析に関する検討

OSCC 細胞株（HSC-2、HSC-3、SQUU-A、SQUU-B、SAS）を用いて p75NTR、高親和性ニューロトロフィン受容体である tropomyosin receptor kinase A (TrkA)、p75NTR および TrkA の共通のリガンドである nerve growth factor (NGF)および CK5 の mRNA の発現を検討したところ、*p75NTR*、*TrkA*、*NGF* は全ての OSCC 細胞株で発現が認められ、*p75NTR* の発現量は HSC-2 細胞で最も多かった。また、*CK5* は p75NTR 同様 HSC-2 細胞で多く発現しており、*TrkA* は SQUU-B、*NGF* は SQUU-A 細胞で多く認められた。

次に、p75NTR シグナルが OSCC 細胞株の増殖に与える影響について検討を行った。まず、リガンドである recombinant human β-NGF で HSC-2 細胞を刺激すると有意に細胞

増殖が促進された。また、p75NTR シグナルインヒビターが OSCC の細胞増殖に与える影響を検討したところ、p75NTR シグナルインヒビター導入群では細胞増殖が有意に抑制されていた。さらに、*p75NTR* siRNA、*TrkA* siRNA、*NGF* siRNA が細胞増殖に与える影響について検討したところ、それぞれの siRNA 導入群で細胞増殖が抑制されていた。

本研究で得られた結果より、p75NTR は NOE および OL では細胞増殖活性の低い未分化な幹細胞様の細胞に発現し、OSCC では細胞増殖活性の高い未分化な細胞に発現していることが示唆された。また、p75NTR 陽性率は OSCC における頸部リンパ節転移および予後の予測因子として有用であることが示された。さらに、p75NTR シグナルは NGF の刺激によって OSCC の細胞増殖が促進されたこと、p75NTR シグナルインヒビターの導入および siRNA 導入により細胞増殖が抑制されたことから、p75NTR は細胞増殖に関与している可能性が示唆された。

緒　言

身体を構成する数十兆もの細胞は分裂や増殖、プログラミングされた細胞死 (アポトーシス)を繰り返している。このような働きは、正常な状態では身体が新しい細胞を必要とした時だけ誘導されるよう厳密に制御されている。ところが、ある特定の遺伝子に突然変異が生じると、このプロセスや秩序が乱れ、身体が必要としてない場合でも活発に細胞分裂を起こし、死すべき細胞が死ななくなる。このようにして生じた過剰な細胞は組織の中で細胞塊を形成し癌が発生する。この癌に至るプロセスは単一ではなく、複数の遺伝子が変異をきたし (Initiation)、細胞が増殖し (Promotion)、進行する (Progression) といった段階を経て癌化が進んでいく多段階発癌説 (multistep carcinogenesis)により説明されてきた (1)。これによれば、分化の方向性が決まった細胞がたとえ癌化しても、体内からいずれ廃出されるため癌が定着しないと考えられており、遺伝子変異を蓄積するには生体内に長期間存在しうる細胞の存在が必要となる。そのような性質を持った細胞の候補として、各組織に存在している組織幹細胞が考えられる。幹細胞には、理論上生体を構成する全ての細胞に分化する能力を持った胚性幹細胞 (Embryonic stem cell: ES 細胞)と各組織に存在している組織幹細胞がある。さらに最近では、Yamanaka らによりヒト皮膚線維芽細胞から人工的に作成され、ES 細胞と同様の性質をもった細胞 (induced pluripotent stem cell: iPS 細胞)が報告されている (2、3)。これらの幹細胞は、いずれも自らと同じ細胞を作り出す自己複製能と様々な細胞に分化し得る多分化能を持つことが知られている。

癌細胞は正常な細胞と比較すると高い増殖能、細胞の不死化、周囲組織へ浸潤、離れた部位への転移といった特徴を有している。しかしながら、これらの能力はすべての癌細胞が有しているわけではなく、ごく一部の細胞集団のみが有していると考えられてい

る。これらの細胞集団は、自己複製能や多分化能といった幹細胞の性質を持ち、癌組織中で自分と同じ細胞を維持しながら、その細胞が分化することによって様々な性質をもった癌細胞を生み出している (造腫瘍能)と考えられている。このような幹細胞様の性質をもつ癌細胞は癌幹細胞 (cancer stem cell: CSC)と呼ばれ、この癌幹細胞から癌が発生、進行するという癌幹細胞仮説が近年提唱されはじめている。CSC は、急性骨髄性白血病においてはじめて同定され (4)、以後、乳癌、大腸癌、肝癌、脳腫瘍などの固形腫瘍においてもその存在が確認されている (5-8)。さらに、癌幹細胞はさまざまな抗癌剤や放射線療法に抵抗性を示すため、再発や転移の原因細胞である可能性も示唆されている (9、10)。それゆえ、CSC の同定は今後の癌の治療において重要な役割を持つものと推察される。しかしながら、この CSC の発生起源については議論が分かれており、CSC は正常組織幹細胞と同様の特徴を有することから、現時点では組織幹細胞が癌化したものと考えられている (11)。

頭頸部癌の約 80%を占める扁平上皮癌においても、Prince らにより、ヒト頭頸部扁平上皮癌の CSC マーカーの候補として、ヒアルロン酸レセプターである CD44 が報告された (12)。これによると、癌細胞を $CD44^+$ 細胞と $CD44^-$ 細胞にソーティングし、免疫不全マウスの皮下にこれらの細胞を移植したところ、$CD44^+$ 細胞のみが腫瘍形成を示したことから、$CD44^+$ 細胞は CSC の特徴である造腫瘍能を有していることが示されている。ゆえに、CD44 は頭頸部扁平上皮癌における CSC を同定するのに有用な分子マーカーの 1 つであると考えられている。しかしながら、癌細胞の中で $CD44^+$ 細胞が占める割合は 10.4%～35.1%であり、全腫瘍細胞中数%以下と考えられている他臓器の CSC の割合に比べかなり多いため、$CD44^+$細胞を CSC としてみなすことを疑問視する声もある。

近年、Nakamura らが正常口腔粘膜の上皮幹細胞マーカーとして低親和性ニューロトロ

フィン受容体である p75 neurotrophin receptor (p75NTR)の有用性を示しており、前述のように CSC が正常組織内の組織幹細胞から発生するという仮説を考慮すると、p75NTR は OSCC における CSC のマーカーとして有用である可能性が推察される (13)。p75NTR は 1 回膜貫通部分を持つ TNF (tumor necrosis factor)受容体ファミリーの一員であり、1987 年に Radeke MJ らによってはじめてクローニングされた分子である (14)。神経細胞のみならず、そのリガンドである nerve growth factor (NGF)に応答するほぼ全ての細胞に発現しているとされている (15)。さらに、後の研究により、p75NTR は brain- derived neurotrophic factor (BDNF)、neurotrophin-3 (NT-3)、neurotrophin-4 (NT-4)に対する低親和性受容体として機能することも確認されている (16)。p75NTR は神経系を中心に、細胞の生存、アポトーシス、増殖、分化などの細胞シグナルを伝達することが知られており (17-25)、近年では、胃癌や食道癌などにおいても p75NTR の発現が確認されている (26-29)。Huang らは、食道扁平上皮癌において、p75NTR 陽性細胞が自己複製能や造腫瘍能などの、CSC 様の特徴を持つことを示唆している (30)。OSCC においては、p75NTR の発現や機能に関する報告はほとんどないが、同じ重層扁平上皮に由来する食道癌において、p75NTR^{+}細胞が CSC 様の特徴を示したことは、OSCC においても CSC を同定するマーカーとして有用である可能性が示唆される。

OSCC には前癌病変として口腔白板症 (oral leukoplakia: OL)があり、「口腔粘膜に生じた摩擦によって除去できない白色の板状あるいは斑状の角化性病変で、臨床的あるいは病理組織学的に他のいかなる疾患にも分類されないような白斑」と定義されている。OL はその大部分が上皮性異形成を伴わないが、上皮性異形成を伴うものは癌化しやすいと考えられている (31)。また、上皮性異形成はその程度に応じて軽度異形成 (mild dysplasia: MLD)、中等度異形成 (moderate dysplasia: MOD)、重度異形成 (severe dysplasia:

SED)に分類されており、Burkhardt らの報告では MLD の 5%、SED の 43%に癌化が認められ、上皮性異形成の程度が重度であるものほど OSCC に進展する可能性が高いことが示されている (32)。それゆえ、OL が OSCC へ癌化する過程を観察することは、OSCC が発生する分子メカニズムの解明に大きく貢献できるものと思われる。

これらの研究背景をもとに、本研究ではまず前癌病変である OL および OSCC の生検材料における p75NTR の発現を免疫組織化学的に解析し、その発現と臨床病理学的所見との関連性を評価するとともに、p75NTR が OSCC の組織学的悪性度および予後の指標として有用であるかについて検討した。さらに、OSCC の細胞増殖における p75NTR の機能を明らかにするため、OSCC 細胞株を用いて分子生物学的に解析を行った。

材料および方法

1. 対象患者

対象は、2004 年 1 月から 2008 年 12 月に九州大学病院顎口腔外科を受診し、臨床的に OL と診断された 112 例 (男性：72 例、女性：40 例、平均年齢：61.9±13.6 歳〈12～91 歳〉)および病理組織学的に OSCC と診断された 81 例 (男性：58 例、女性：23 例、平均年齢：62.6±15.1 歳〈19～88 歳〉)である。これらの生検材料を採取し、直ちに 4%パラホルムアルデヒド 24～48 時間浸漬固定後、パラフィン包埋を行った。ミクロトーム (Leica Microsysrems, Japan)にて 5 μm の切片を作製し、ヘマトキシリンーエオジン(HE)染色および免疫組織化学染色に用いた。また、対照群として正常口腔粘膜上皮(normal oral epithelium: NOE)10 例を用いた。OL 112 例および OSCC 81 例のうちわけを(表 1、表 2)に示す。

表 1 OL 患者のうちわけ

項目	症例数 (%)
性別	
男性	72 (64.3)
女性	40 (35.7)
発生部位	
歯肉	48 (42.9)
舌	41 (36.6)
口蓋	12 (10.7)
頬粘膜	10 (8.9)
口唇	1 (0.9)
上皮性異形成の程度	
hyperplasia	76 (67.9)
mild dysplasia	22 (19.6)
moderate dysplasia	8 (7.1)
severe dysplasia	6 (5.4)

表 **2** OSCC 患者のうちわけ

項目	症例数 (%)
性別	
男性	58 (71.6)
女性	23 (28.4)
発生部位	
舌	42 (51.9)
歯肉	27 (33.3)
口底	9 (11.1)
頬粘膜	3 (3.7)
臨床発育様式	
表在型	8 (9.9)
外向型	15 (18.5)
内向型	58 (71.6)
臨床病期	
Ⅰ	15 (18.5)
Ⅱ	28 (34.6)
Ⅲ	12 (14.8)
Ⅳ	26 (32.1)
組織学的悪性度分類	
grade 分類 (WHO 分類)	
grade 1	62 (76.5)
grade 2	14 (17.3)
grade 3	5 (6.2)
浸潤様式による分類	
(山本-小浜の分類)	
grade 1	2 (2.5)
grade 2	17 (21.0)
grade 3	43 (53.1)
grade 4C	15 (18.5)
grade 4D	4 (4.9)

2. 生検材料の病理組織学的診断

OL は WHO 診断基準に従って、上皮性異形成を伴わないもの (上皮性過形成：hyperplasia; HYP)と伴うものに分類した。さらに、上皮性異形成を伴うものはその程度に応じて、MLD、MOD、SED に分類した (33)。OSCC においては組織学的悪性度分類として、grade 分類 (WHO)と山本・小浜の分類 (YK 分類)を用いた (34、35)。grade 分類は腫瘍細胞の分化度に応じて、grade 1 (高分化型)、grade 2 (中分化型)、grade 3 (低

分化型)に分け、YK 分類は宿主境界部における浸潤様式に応じて、grade 1、2、3、4C、4D に分類した。

YK 分類を以下に示す: grade 1: 腫瘍と宿主の境界線が明瞭である。grade 2: 境界線にやや乱れがある。grade 3: 境界線は不明瞭で大小の癌胞巣が散在している。grade 4C: 境界線は不明瞭で小さな癌胞巣が索状に浸潤している。grade 4D : 境界線は不明瞭で癌は胞巣を作らず、瀰漫性に浸潤している。

3. 免疫組織化学染色法

免疫組織化学染色では p75NTR の他に、増殖活性のマーカーとして Ki-67、基底細胞のマーカーとして cytokeratin 5 (CK5)を用いた。パラフィン包埋切片をキシレンに 20 分間、100%、95%、85%、75%エタノールの順にそれぞれ 5 分間浸漬し脱パラフィン処理および水和処理を行い、Target Retrieval Solution (Dako, Denmark)を用いて、抗原の賦活処理 (121°C、5 分)を行った。切片を phosphate-buffered saline (PBS)にて洗浄後、内因性ペルオキシダーゼ除去のため、1%過酸化水素水を常温で 30 分間反応させ、その後、抗体の非特異的吸着を防ぐために 10%ヤギ正常血清 (ヒストファインブロッキング試薬Ⅱ; Nichirei Bioscience, Japan)を室温で 1 時間反応させた。一次抗体にはウサギポリクローナル抗 p75NTR 抗体 (1: 200, Promega, USA)、マウスモノクローナル抗 Ki-67 抗体 (1: 100, Dako Cytomation, Denmark)、ウサギモノクローナル抗 CK5 抗体 (1: 100, Epitomics, USA)を用い、室温で 3 時間反応させた。PBS にて洗浄後、二次抗体としてペルオキシダーゼ標識 IgG ポリクローナル抗体 (Nichirei Bioscience, Japan)を用い、室温で 1 時間反応させた。PBS にて洗浄後、3,3'-diaminobenzidine・4HCl (DAB substrate kit; Nichirei Bioscience, Japan)にて可視化し、さらに、ヘマトキシリン (Mayer's hematoxylin solution; Wako, Japan)を用いて対比染色を行った。75%、85%、95%、100%

エタノールにそれぞれ 5 分間浸漬させ、脱水処理後、MOUNT-QUICK (Daido Sangyo, Japan)を用いて封入した。陰性対照として一次抗体の代わりに PBS を用いた。

また、切片より 0.5 mm^2 の範囲を任意に 3 か所選択して、陽性細胞数を計測し、それらを全上皮系細胞数で除したものを陽性率として算出した後、臨床的および病理組織学的所見との関連を統計学的に解析した。また、OSCC 患者のうち、p75NTR 陽性率が 60%以上であったものを高発現群とし、60%未満であったものを低発現群として 2 群に分類し、生存分析を行った。

4. 細胞培養

本研究では、口腔扁平上皮癌細胞株である HSC-2 (口底癌由来)、HSC-3 (舌癌由来)、SQUU-A (舌癌由来; 非転移株)、SQUU-B (舌癌由来; 高転移株)、SAS (低分化型舌癌由来)、ヒトグリオブラストーマ細胞株 U87MG を使用した (36)。培地は、Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)/F-12 (Sigma-Aldrich, USA)に 10％ fetal bovine serum (FBS) (Sigma-Aldrich, USA)、100 units/ml ペニシリン、および 100 units/ml ストレプトマイシン (P/S)を添加したものを用い、37°C、5％CO_2 存在下で細胞培養を行った。

5. RNA の抽出および complementry DNA (cDNA)の合成

RNA 抽出は acid guanidium-phenol-cloroform 法を用いた。まず、培養皿中の細胞に TRIzol® (Invitrogen, USA)を 1.0 ml 加え、セルスクレーパーにて破砕した。その後、これらに 0.2 ml のクロロホルム (Nacalai tesque, Japan)を加えて撹拌し、4°C、14,000 rpm で 15 分間遠心分離を行った後、RNA を含む水層を採取した。これに 1 ml のイソプロパノール (Nacalai tesque, Japan)を加えて撹拌後、4°C、14,000 rpm で 10 分間遠心分離し、上清の除去後に得られた RNA ペレットを 75％エタノール (Nacalai tesque, Japan)

にて洗浄した。さらに、4°C、10,000 rpm で 5 分間遠心分離し、再沈殿させたペレットを乾燥させ、50 μl の 0.1%ジエチルピロカーボネート (dietyl pyrocarbonate: DEPC) 処理水 (Nacalai tesque, Japan)に溶解した。その後、吸光度計 (NANO DROP 1000; Thermo Scientific, USA)にて RNA の濃度を測定した。

cDNA の合成には、DEPC 処理水に約 2.0 μg の total RNA、25 units/μl の recombinant RNase inhibitor (Nacalai tesque, Japan)を 1.0 μl、100 mM Tris-HCl (pH 8.8)、500 mM 塩化カリウムおよび 0.8%Nonidet P40 を含む 10×Taq DNA Polymerase buffer を 2.0 μl、25 mM 塩化マグネシウム溶液 (以上、Bio Basic, Canada)を 4.0 μl、2.0 mM dNTPmix (Toyobo, Japan)を 2.0 μl、50 μm Random Hexamers を 1.0 μl、50 units/μl MuLV Reverse Transcriptase (以上、Roche Diagnostics, Swiss)を 1.0 μl 加えて合計 20 μl とし、42°C で 15 分間インキュベートした。その後、99 °C で 5 分間加温して酵素を失活させ、5°C で 5 分間冷却し、これを mRNA の発現解析に用いた。

6. Reverse transcriptase (RT)- polymerase chain reaction (PCR)法および real-time PCR 法による mRNA の発現解析

RT-PCR は滅菌水に template DNA を 100 ng、10×*Taq* DNA polymerase Buffer を 1.25 μl、25 mM 塩化マグネシウム溶液を 1.0 μl、5 units/μl Taq DNA polymerase を 0.1 μl (以上、Bio Basic, Canada)、2.0 mM dNTPmix (Toyobo, Japan)を 0.5 μl、20 pM センスおよびアンチセンスプライマーをそれぞれ 0.5 μl 加えて全反応量を 13.5 μl とした。反応条件は、熱変性は 94°C で 1 サイクル目が 3 分、2 サイクル目以降は 30 秒間で行い、伸長反応は 72°C、30 秒間とした。

real-time PCR は Brilliant® II SYBR® Green QPCR Master Mix (Straragene, USA)を用いて行った。滅菌水に Master Mix を 10 μl、template DNA を 10 ng、20 pM センスおよび

アンチセンスプライマーをそれぞれ 0.5 μl 加え、全反応量を 20.0 μl とした。反応条件は、熱変性は 95°C で 1 サイクル目が 5 分、2 サイクル目以降は 10～30 秒間で行い、伸長反応は 72°C、10～30 秒間とし、全 45 サイクルの増幅を行った。mRNA の発現を解析する分子は *p75NTR*、高親和性神経栄養因子受容体である *tropomyosin receptor kinase A* (*TrkA*)、p75NTR および TrkA の共通のリガンドである *NGF*、および *CK5* である。また、これら mRNA の発現量を定量化するため、ハウスキーピング遺伝子である *glycelaldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (*GAPDH*)を用いて補正し、ΔΔCt 法により相対的発現量を算出した。なお、得られた PCR 産物を 2.0%アガロースゲル (Invitrogen, USA)上で電気泳動を行い、エチジウムブロマイド染色後に、紫外線により可視化した。各プライマー配列、PCR 産物のフラグメントサイズ、アニーリング温度 (表 3) に示す。

表 3 PCR のプライマーと反応条件

mRNA	PCR産物のサイズ（bp）	プライマーの塩基配列 (5'→3')	アニーリングの温度 (°C)
p75NTR	111	センス AACCTCATCCCTGTCTATTG	61
		アンチセンス GTTGGCTCCTTGCTTGTT	
TrkA	80	センス CAGCCGGCACCGTCTCT	68
		アンチセンス TCCAGGAACTCAGTGAAGATGAAG	
NGF	188	センス CCAAGGGAGCAGCTTTCTATCCTGG	61
		アンチセンス GGCAGTGTCAAGGGAATGCTGAAGT	
CK5	207	センス GGTTGATGCACTGATGGATG	62
		アンチセンス TACCAGGACTCGGCTTCTGT	
GAPDH	104	センス ATCAGCAATGCCTCCTGCAC	60
		アンチセンス ATGGCATGGACTGTGGTCAT	

7. 細胞増殖解析

7-1. recombinant β-NGF が OSCC の細胞増殖に与える影響

まず、p75NTR のリガンドである β-NGF の細胞増殖効果を検討するために、96 穴

プレートに 3.0×10^2 /well の HSC-2 細胞を播種し、2 時間のスタベーション処理後、5 ng/ml の recombinant human β-NGF (R＆D Systems, USA)を添加し、無血清培地にて培養を行った。また、陰性対象は recombinant human β-NGF 無添加で培養された細胞とし、recombinant human β-NGF 添加時、および添加後 24、48、72、96、120 時間のそれぞれの生細胞数を WST-1 Cell Counting Kit (Dojin, Japan)を用いて計測した。各 well にテトラゾリウム塩 (WST-1: 4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5- tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate)を 10 μl ずつ添加し、37°C、5％CO_2 存在下で 2 時間、呈色反応を行った。その後、テトラゾリウム塩が細胞内脱水素酵素により還元されて生じた水溶性ホルマザン色素をマイクロプレートリーダー (MULTI SKAN FC; Thermo Scientific, USA)にて測定した (測定波長：450 nm、参照波長：620 nm)。なお、使用した WST-1 Cell Counting Kit において、細胞数と生成する水溶性ホルマザンの量が直線的な比例関係にあることを確認した。

7-2. p75NTR シグナルインヒビターが OSCC の細胞増殖に与える影響

次に、p75NTR シグナルインヒビターの添加による OSCC 細胞株の増殖に与える影響について検討した。p75NTR シグナルインヒビターとして TAT-Pep5 (Calbiochem, USA) (37、38)を用いた。96 穴プレートの無血清培地中に 3.0×10^2 /well の HSC-2 細胞を播種後、100 nM の TAT-Pep5 を添加し、5 ng/ml の recombinant human β-NGF で刺激を加えた。37°C、5％CO_2 下で培養し、p75NTR シグナルインヒビター添加時、および添加後 24、48、72、96、120 時間のそれぞれの生細胞数を前述と同じ方法で、WST-1 Cell Counting Kit を用いて計測した。対照群として p75NTR シグナルインヒビター無添加で recombinant human β-NGF のみを添加した細胞、p75NTR シグナルインヒビターのみ添加した細胞、および無血清培地のみで培養された細胞を使用した。

7-3. *p75NTR*、*TrkA*、*NGF* の small interfering RNA (siRNA)導入が OSCC の細胞増殖に与える影響

p75NTR、*TrkA*、*NGF* の siRNA をそれぞれ OSCC 細胞株に遺伝子導入し、*p75NTR*、*TrkA*、*NGF* それぞれのノックダウンが OSCC の細胞増殖に与える影響を検討した。なお、siRNA 導入にはリポフェクション法 (使用試薬 Oligofectamine™, Invitrogen, USA)を用いた。RNA 抽出用に、24 穴プレートに HSC-2 細胞を 2.5×10^4 /well 播種し、細胞増殖用に、96 穴プレートに HSC-2 細胞を 3.0×10^2 /well 播種し、37°C、5%CO_2 下で 24 時間培養した。24 時間後無血清 DMEM/ F-12 に交換し 120 nM の *p75NTR* siRNA、*TrkA* siRNA、*NGF* siRNA (以上 Sigma-Aldrich, USA)を導入した。さらに、37℃、5%CO_2 下で 6 時間培養後 10%FBS および P/S 含有 DMEM/ F-12 に交換した。siRNA 導入効率を確認するため、48 時間後の RNA を抽出し real-time PCR 法により発現解析を行い、siRNA 導入時、および導入後 24、48、72、96、120 時間のそれぞれの生細胞数を WST-1 Cell Counting Kit を用いて計測した。また、対照群として scrambled siRNA (Mission siRNA Universal Negative Control: Sigma-Aldrich, USA)を用いた。

9. 統計学的解析

統計処理にはKruskal-Wallis test、Mann-Whitney *U*-test、multiple comparison test (Tukey-Kramer honestly significant difference test)、analysis of variance (ANOVA)を用いた。また、生存分析においてはKaplan-Meier法により解析を行い、統計処理にはlog-rank test を用いた。なお、統計解析ソフトとしてJMP software version 8 (SAS Institute, USA)を使用し、$p<0.05$の場合を統計学的有意差ありとした。

結 果

研究 1

口腔白板症および口腔扁平上皮癌の生検材料における p75NTR の免疫組織学的検討

1-1. 正常口腔粘膜および口腔白板症の生検材料における p75NTR の発現

本研究では、まず NOE および OL の生検材料における p75NTR の発現を検索するために免疫組織学的染色を行った。その結果を図 1 に示す。

NOE および OL において、p75NTR、Ki-67、および CK5 はすべての標本で発現が認められた。NOE では p75NTR の発現は基底細胞の細胞膜のみに限局して発現していた (図 1; b)。 Ki-67 は傍基底層の細胞の核に、CK5 は上皮基底層の細胞質に発現が認められた (図 1; c, d)。HYP におけるこれらの発現様式は NOE と同様であった。一方、上皮性異形成では、Ki-67 は NOE と比較して異形成の程度が重度になるにつれ、傍基底層から表層へ広範囲に発現しており、SED では上皮のほぼ全層に発現が認められた (図 1; g, k, o)。CK5 も Ki-67 と同様に上皮性異形成の程度が重度になるにつれ広範囲に発現していた (図 1; h, l, p)。しかし、p75NTR は上皮性異形成の程度にかかわらず、その発現様式に変化は認めず基底層に限局して発現していた (図 1; f, j, n)。また、p75NTR および Ki-67 の発現を定量化するため、それぞれの陽性率を算出し、上皮性異形成の程度との関連について検討した。その結果、p75NTR 陽性率は、上皮性異形成を伴う OL と、NOE および HYP を比較しても有意な差は認められず (図 2; Mann-Whitney *U*-test, N.S.)、さらに、その上皮性異形成の程度が重度になってもその陽性率に有意な差を認めなかった (図 2; Kruskal-Wallis test, N.S.)。一方、Ki-67 陽性率において、上皮性異形成を伴う OL は NOE および HYP と比較して有意に高く (図 2; Mann-Whitney *U*-test, $^{\dagger}p<0.0001$)、上皮性異形成の程度が重度になるに伴いその陽性率は高くなっていた (図 2; Kruskal-Wallis test, $^{*}p<0.0001$)。

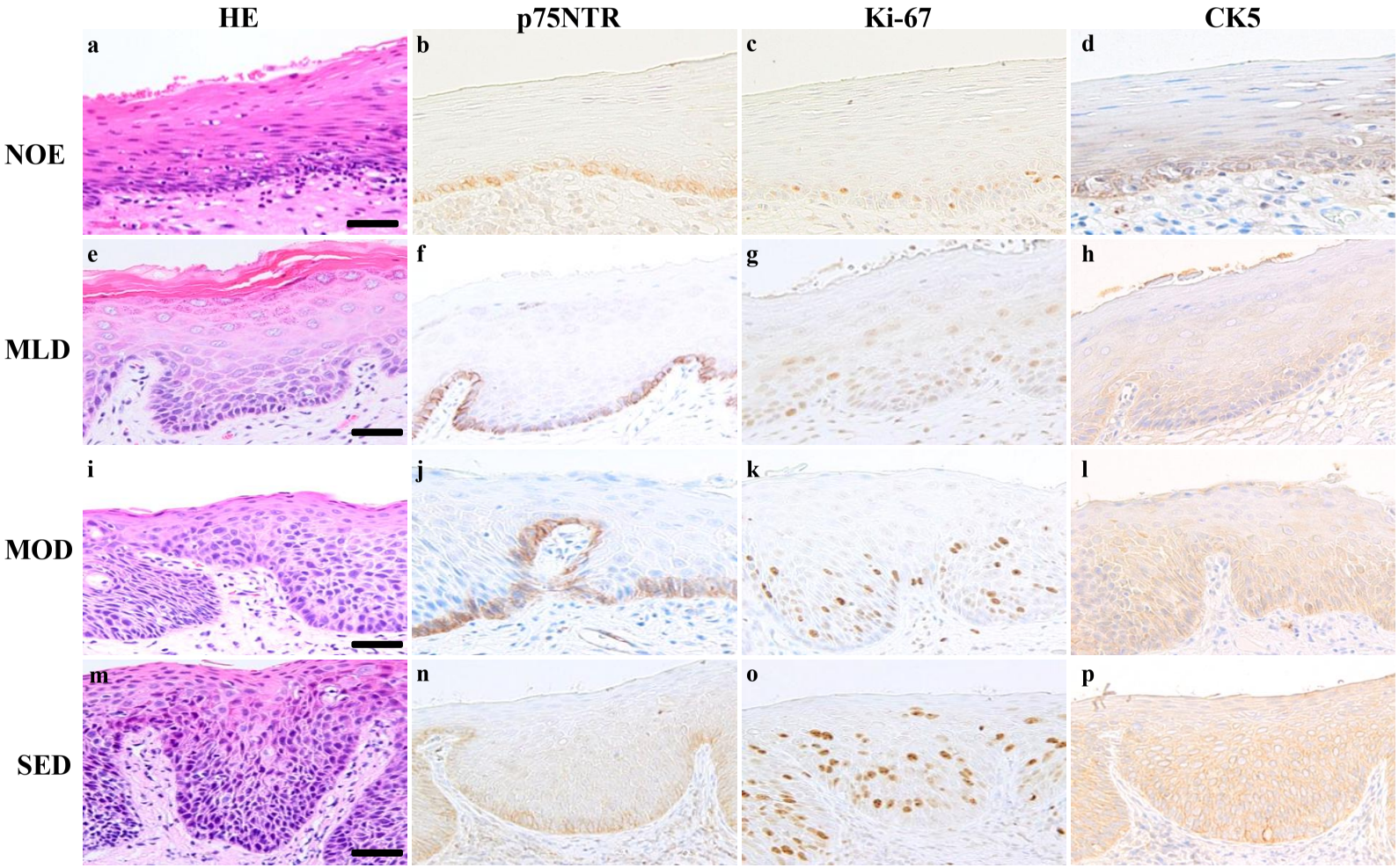


図1 NOEおよびOLにおける免疫組織化学染色

NOE、OLにおいてp75NTRは基底層のみに発現を認めた。Ki-67はNOEでは主に傍基底層に発現を認め、上皮性異形成の程度が重度になるにつれ基底層より上方へ広範囲に発現を認めた。CK5も同様の発現様式であった。(scale bars: 100 μm)

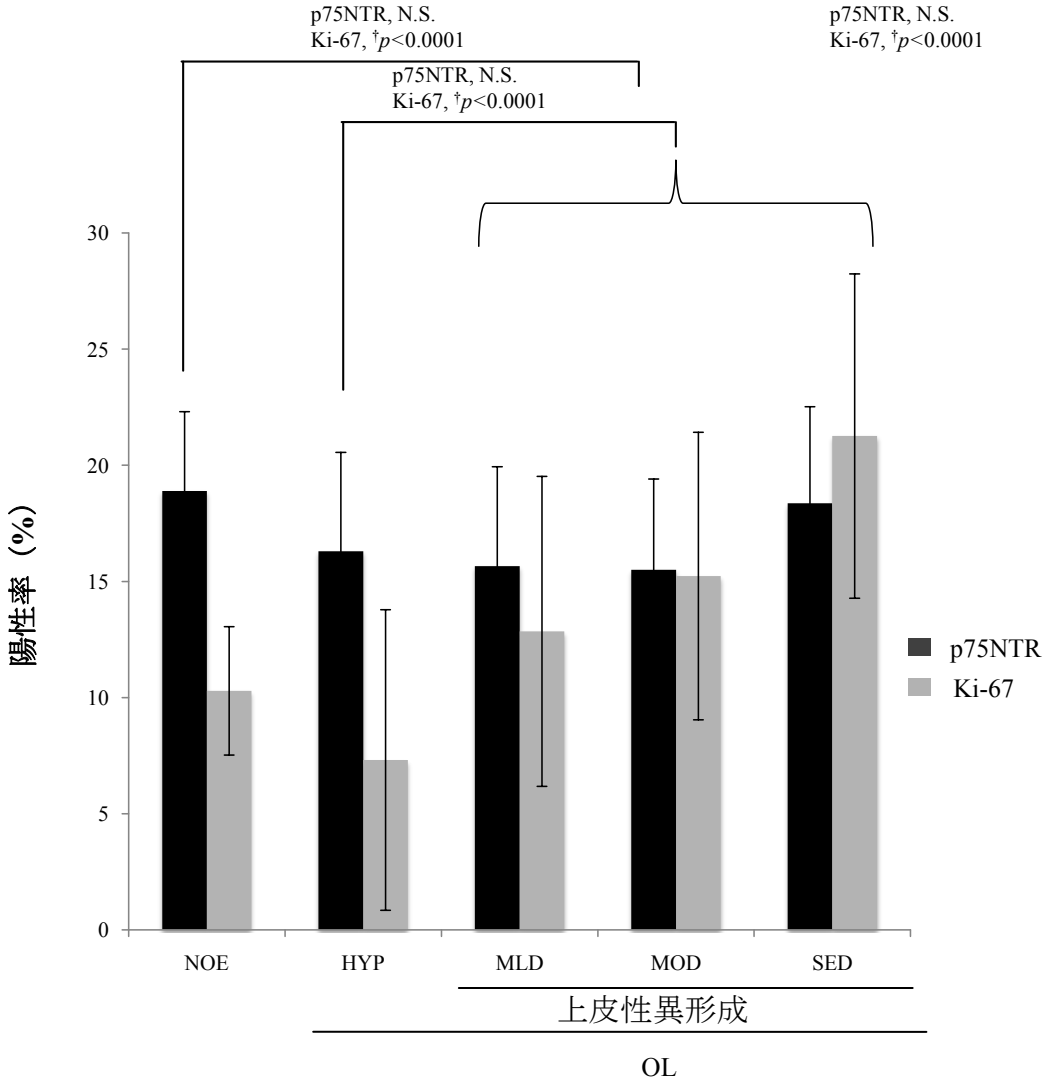


図 2 NOE および OL における p75NTR および Ki-67 の陽性率と上皮性異形成の程度との関連

Ki-67 陽性率は NOE および HYP よりも、MLD、MOD、および SED において有意に高く、上皮性異形成が重度になるにつれ増加していた。p75NTR は上皮性異形成の程度にかかわらず、陽性率はほとんど変わらなかった。
グラフは陽性率の平均±標準偏差を示しており、統計分析は*Kruskal-Wallis test および†Mann-Whitney *U*-test を用いた。(N.S.: not significant)

1-2. 口腔扁平上皮癌の生検材料における p75NTR の発現

次に、口腔扁平上皮癌（OSCC）の生検材料における p75NTR の発現を免疫組織化学的染色法により検索した。結果を図 3 に示す。

p75NTR、Ki-67、および CK5 は OSCC の分化度の違いによって異なる発現様式を呈していた。grade 1 においては、p75NTR の発現は癌胞巣の最外層に限局していた（図 3; b）。また、Ki-67 および CK5 は、癌胞巣の最外層より 2、3 層までに発現を認めた（図 3; c, d）。一方、grade 2、3 における p75NTR、Ki-67、および CK5 の局在は grade 1 とは異なり、ほぼすべての癌細胞に発現が認められた（図 3; p75NTR, f, j; Ki-67, g, k; CK5, h, l）。また、p75NTR は grade 1 では細胞膜に発現していたが、grade 2、3 では、細胞質にも認められた。

さらに、NOE および OL と同様に、p75NTR および Ki-67 の各陽性率を算出し、病理組織学的所見との関連について検討を行った。図 4 に示すように、腫瘍細胞の分化度においては低分化なものほど p75NTR の陽性率が有意に高く、Ki-67 においても p75NTR と同様の結果を示した（Kruskal-Wallis test,*$p<0.001$）。さらに、YK 分類において、grade 1/2/3 群と grade 4C/4D 群で比較すると、grade 4C/4D 群において有意に p75NTR 陽性率が高かった (Mann-Whitny *U*-test,$^{\dagger}p<0.001$)。

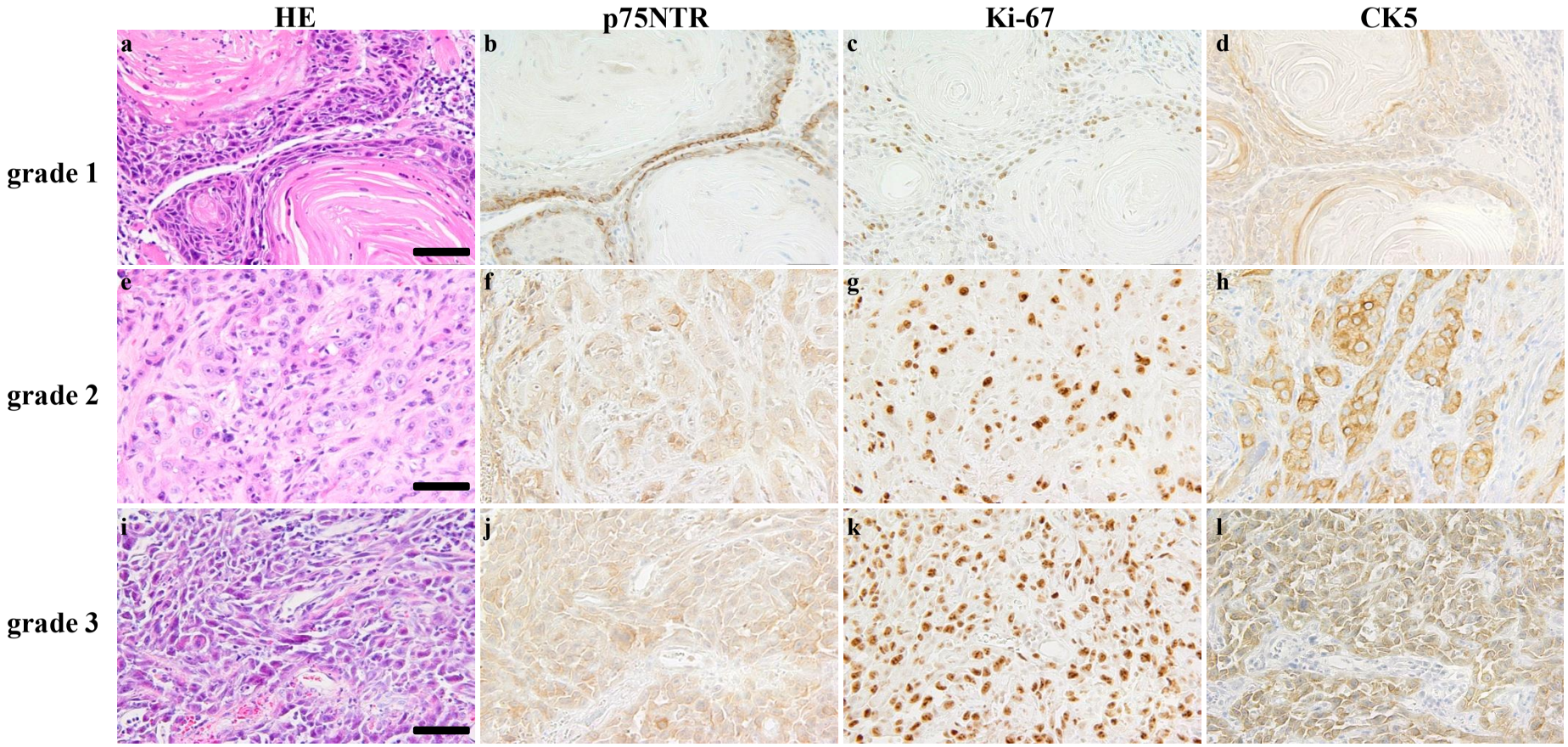


図3 OSCCにおける免疫組織化学染色

grade 1ではp75NTRは癌胞巣の最外層のみに発現を認めたが、grade 2および3ではほとんどすべての細胞に発現していた。Ki-67およびCK5も同様に低分化になるほどその発現が上昇していた。(scale bars: 100 μm)

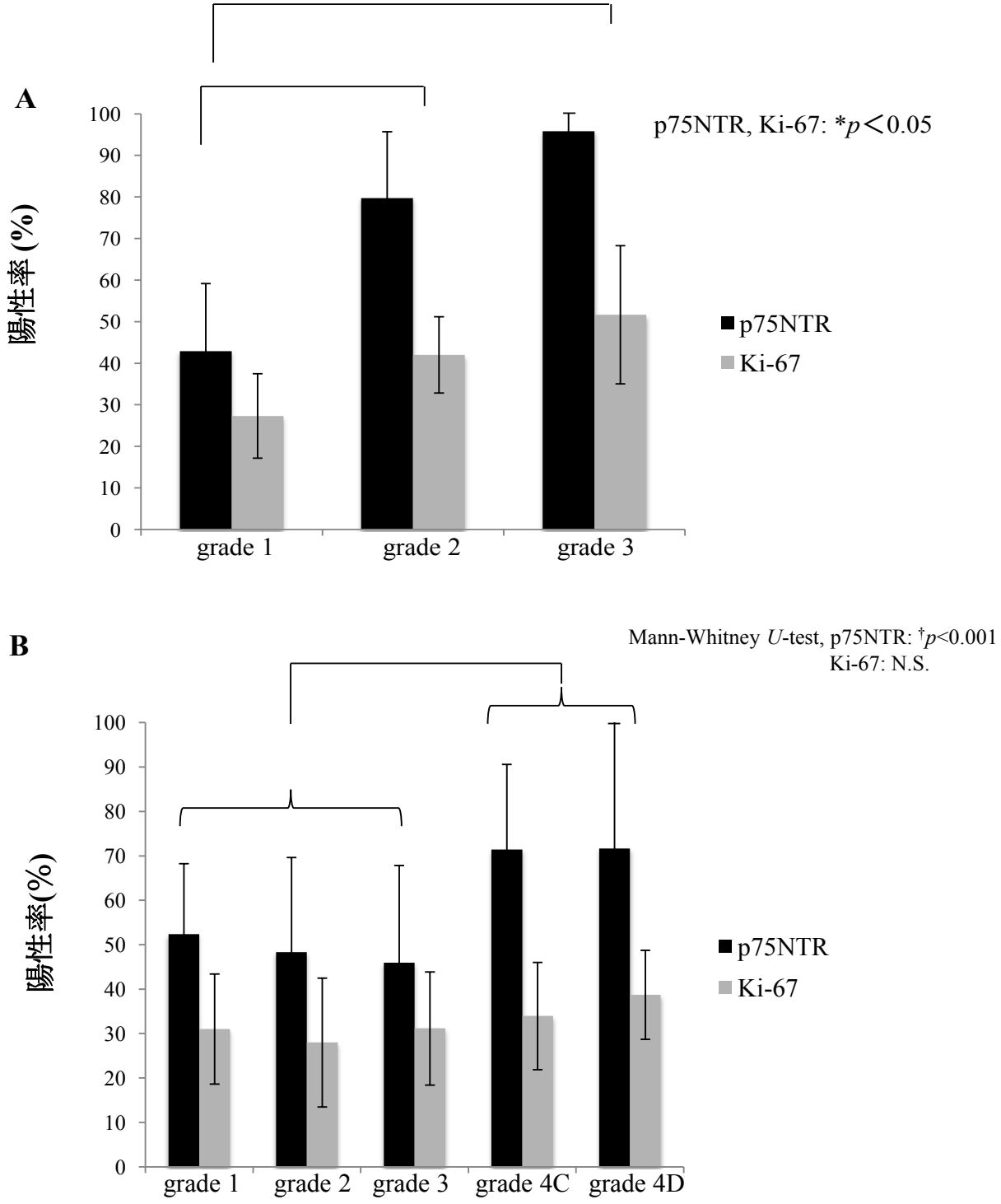


図 4 OSCC における p75NTR および Ki-67 の陽性率と病理組織学的所見との関連 (A: grade 分類、B: YK 分類)

(A) p75NTR、Ki-67 の陽性率は低分化なものほど有意に高かった。

(B) YK 分類において、YK 4C/4D 群は YK 1/2/3 群に比べ、p75NTR 陽性率は有意に高かった。

グラフは陽性率の平均±標準偏差を示しており、統計分析は*Kruskal-Wallis test、†Mann-Whitny *U*-test を用いた。(N.S.: not significant)

1-3. 口腔扁平上皮癌の生検材料における p75NTR の発現と臨床所見との関連

次に、OSCC 生検材料における p75NTR 陽性率と臨床所見との関連について検討を行った。表 4 に示すように、性別、原発部位、臨床発育様式、T 分類、臨床病期分類、局所再発の有無、遠隔転移の有無に関しては統計学的に有意な差を認めなかった。しかしながら、頸部リンパ節転移においては、非転移群に比べて転移群の p75NTR 陽性率が有意に高かった (表 4; Mann-Whitny *U*-test, $p < 0.05$)。Ki-67 はすべての項目において統計学的有意差を認めなかった。

さらに、Kaplan-Meier 法を用いて生存分析を行ったところ、p75NTR 高発現群および低発現群における累積 3 年全生存率はそれぞれ 58.2%、80.3%であり、これら 2 群間に有意差は認められなかった (図 5 A; log-rank test, $p=0.058$)。また、疾患特異的累積 3 年生存率はそれぞれ 58.2%、83.1%であり、低発現群と比較して高発現群において有意に予後が不良であった (図 5 B; log-rank test, $^{*}p<0.05$)。

表 4 OSCC における p75NTR および Ki-67 陽性率と臨床所見との関連

項目	症例数	陽性率 (%) p75NTR		陽性率 (%) Ki-67	
性別					
男性	58	52.2±24.7	[a]N.S.	32.7±11.9	[a]N.S.
女性	23	53.4±21.3		28.1±14.8	
発生部位					
舌	42	48.2±20.6	[b]N.S.	29.1±10.8	[b]N.S.
歯肉	27	55.0±28.0		33.7±15.9	
口底	9	60.0±22.0		34.6±11.4	
頬粘膜	3	69.5±22.0		32.4±12.3	
臨床発育様式					
表在型	8	50.9±24.3	[b]N.S.	27.0±6.5	[b]N.S.
外向型	15	46.2±20.9		30.7±11.0	
内向型	58	54.4±24.4		32.2±13.9	
臨床 T 分類					
T1	16	48.2±21.6	[c]N.S.	25.3±9.4	[c]N.S.
T2	35	52.5±23.9		31.9±11.5	
T3	8	59.7±17.2		36.2±14.1	
T4	22	53.2±27.3		33.2±15.5	
臨床病期					
Ⅰ	15	45.2±18.8	[c]N.S.	24.6±9.3	[c]N.S.
Ⅱ	28	53.3±22.6		31.2±11.5	
Ⅲ	12	53.1±26.4		32.0±11.1	
Ⅳ	26	55.7±26.4		33.2±15.5	
局所再発					
無	69	54.1±23.8	[a]N.S.	32.5±13.1	[a]N.S.
有	12	43.5±21.7		25.0±9.3	
頸部リンパ節転移					
無	45	48.1±23.4	[a]$p<0.05$	29.9±11.9	[a]N.S.
有	36	58.7±23.8		33.1±13.9	
遠隔転移					
無	74	51.9±23.5	[a]N.S.	31.4±13.0	[a]N.S.
有	7	59.2±26.3		31.0±11.4	

a: Mann-Whitney *U*-test, b: multiple comparison test (Tukey-Kramer honestly significant difference test)

c: Kruskal-Wallis test

(N.S.: not significant)

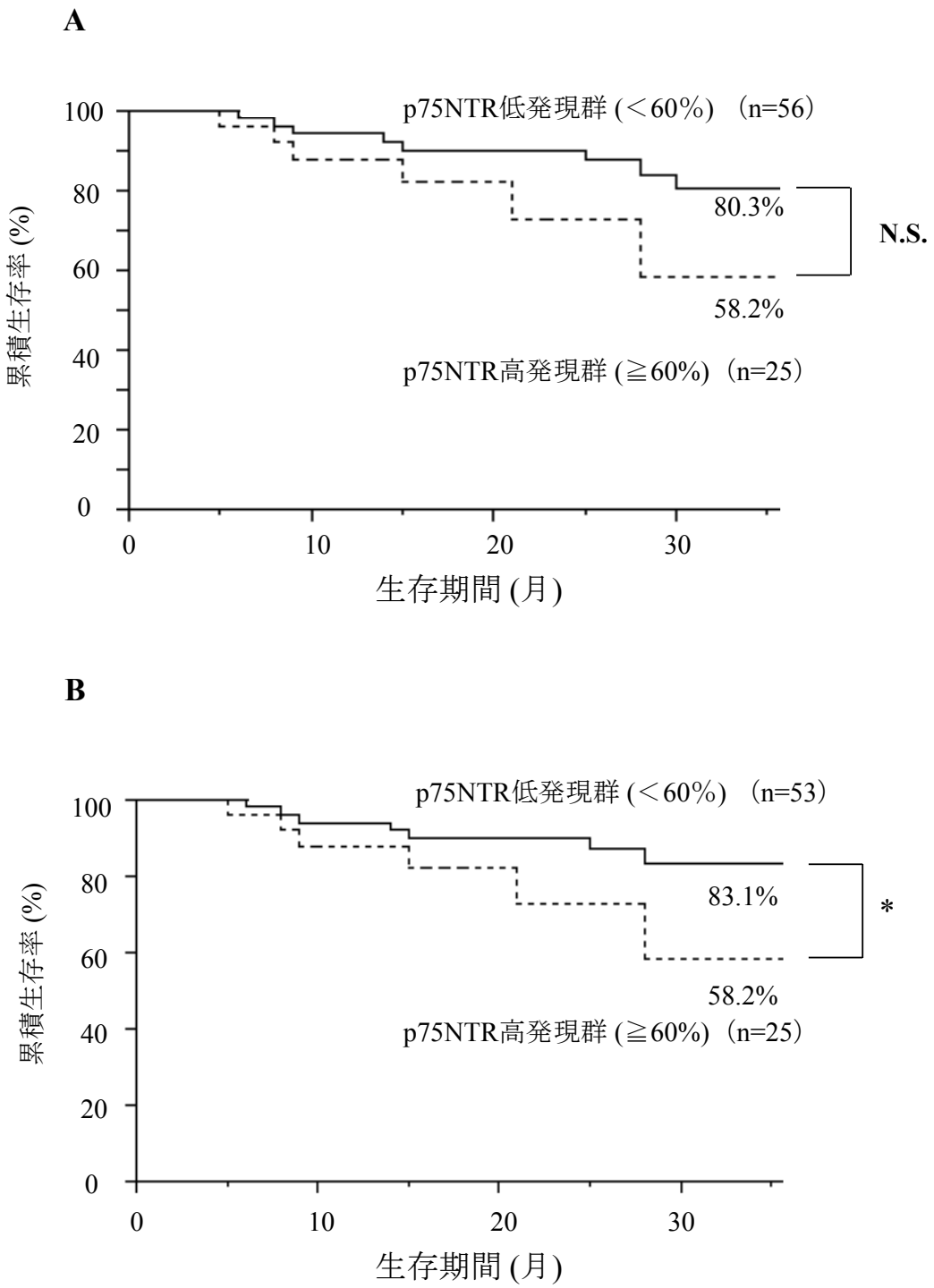


図 5 p75NTR 陽性率と累積生存率との関連 (Kaplan-Meier 法) (A: 全生存率、B: 疾患特異的生存率)

p75NTR 高発現群と低発現群における累積 3 年全生存率はそれぞれ 58.2%、80.3%であった。また、疾患特異的累積 3 年生存率はそれぞれ 58.2%、83.1%であり、p75NTR 高発現群は低発現群に比べ有意に予後不良であった。

なお、統計処理には log-rank test を用いた。(*p<0.05) (N.S.: not significant)

研究 2

OSCC における p75NTR の発現および機能解析に関する検討

2-1. OSCC における p75NTR の発現

まず、OSCC 細胞株での *p75NTR*、*TrkA*、*NGF*、および *CK5* の発現を RT-PCR 法にて検索した。*p75NTR*、*TrkA*、*NGF* はすべての細胞株で発現が認められたが、*CK5* は SQUU-B 細胞、U87MG 細胞で発現が認められなかった。さらに real-time PCR 法にてそれぞれの mRNA の発現量を定量化した。*p75NTR* は HSC-2 細胞で発現量が最も多く、SQUU-B 細胞で最も少なかった。一方、*TrkA* は SQUU-B 細胞に高発現していた。NGF は SQUU-A 細胞で最も発現が多く、CK5 は p75NTR と同様に HSC-2 細胞で最も発現量が多かった (図 6)。

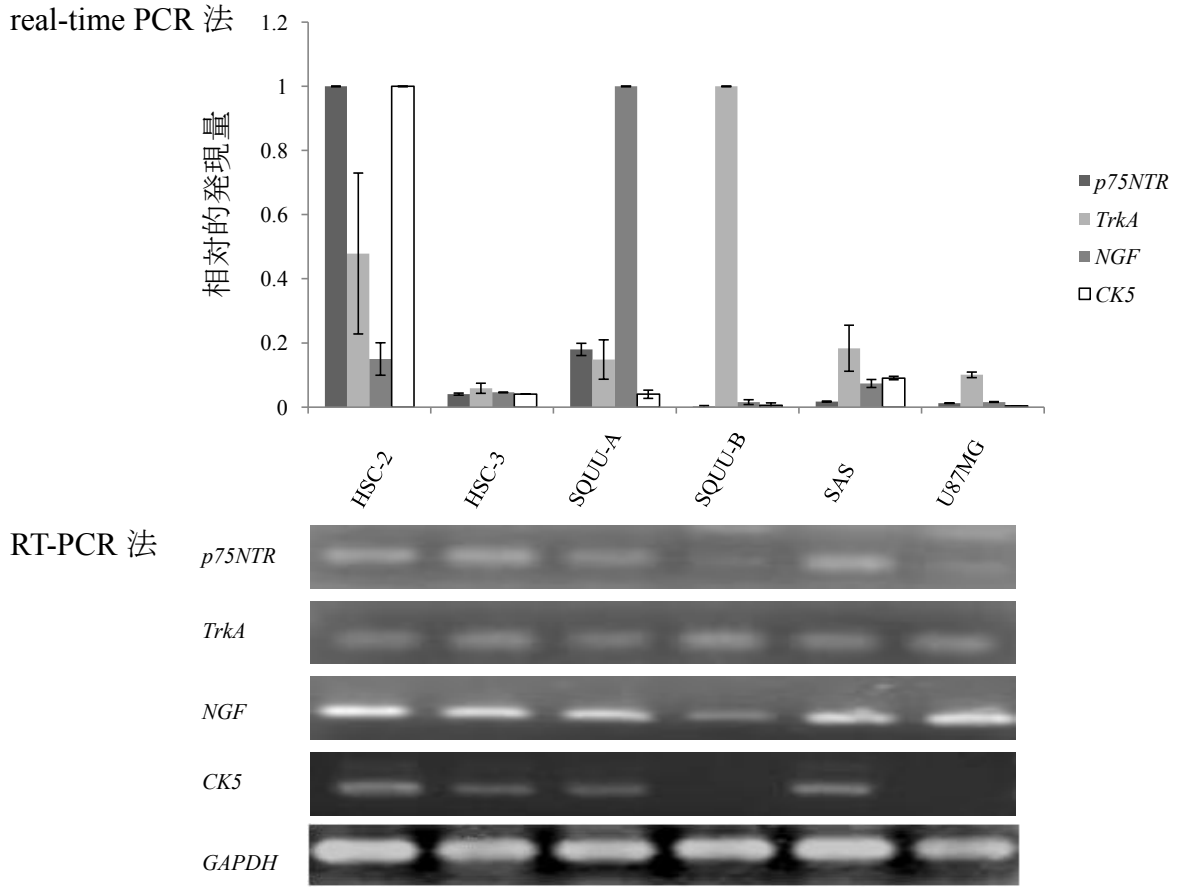


図 6 OSCC 細胞株における *p75NTR*、*TrkA*、*NGF* および *CK5* の発現

p75NTR および *CK5* は HSC-2 細胞で最も発現量が多く、*TrkA* は SQUU-B 細胞で、*NGF* は SQUU-A 細胞で最も発現量が多かった。

2-2. recombinant β-NGF が OSCC の細胞増殖に与える影響

まず、OSCC 細胞における β-NGF の細胞増殖への効果を検討するため、recombinant human β-NGF を HSC-2 細胞に添加した。β-NGF 添加群は無添加群に比べ有意に細胞増殖が促進されていた (図 7; ANOVA, $p<0.01$)。

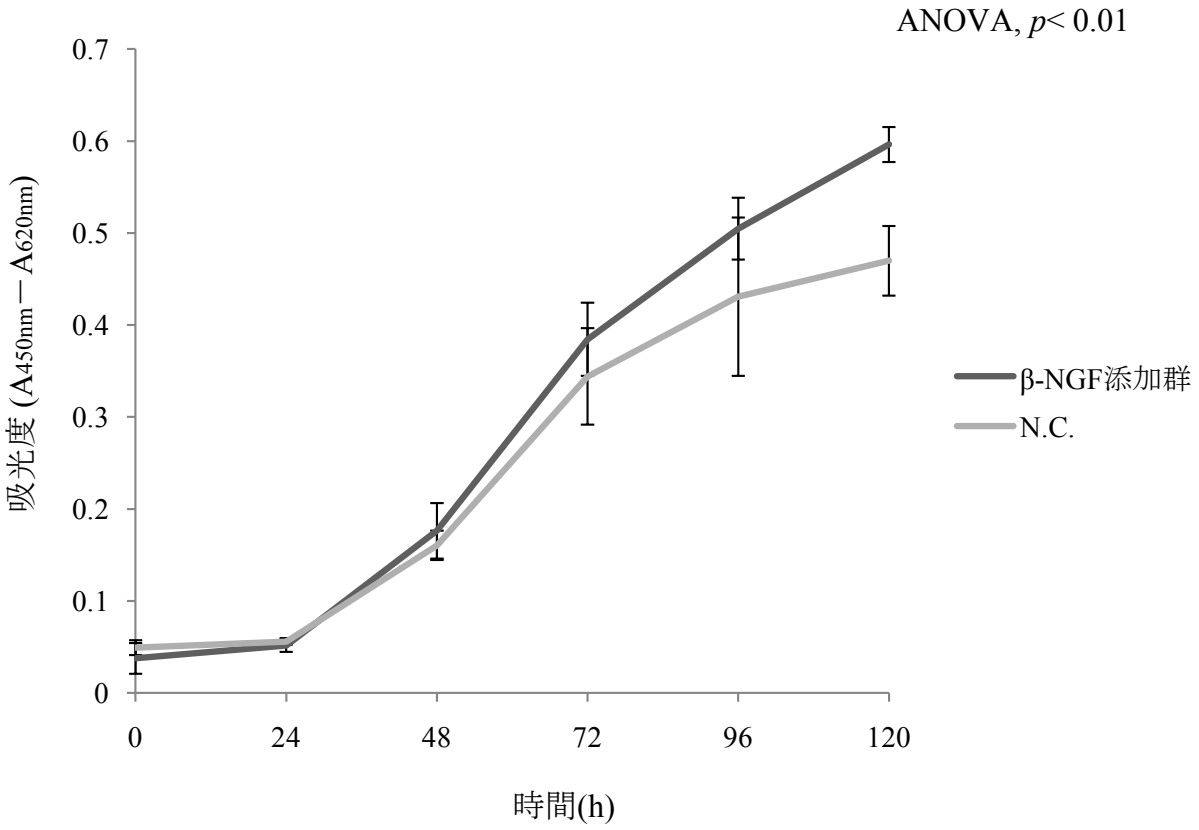


図 7 recombinant β-NGF protein が OSCC の細胞増殖に与える影響
β-NGF 添加群は対照群に比べ有意に細胞増殖が促進されていた。
グラフは独立して行った 3 回のデータの平均±標準偏差　を示しており、対照群に対する NGF 添加群における生細胞数の統計学的有意差を示す。
(ANOVA, $p<0.01$)
N.C.は無血清培地のみで培養した群を示す。

2-3. p75NTR シグナルインヒビターが OSCC の細胞増殖に与える影響

次に、p75NTR シグナル阻害による OSCC の細胞増殖への影響を検討するために、β-NGF 刺激下に p75NTR シグナルインヒビター (TAT-Pep5)を HSC-2 細胞に添加した。シグナルインヒビター添加群は β-NGF の刺激が存在しても、無添加群に比べ細胞増殖が有意に抑制され、さらに、シグナルインヒビターのみ添加した群は他の群に比べ、より細胞増殖が抑制されていた。 (図 8; ANOVA, $p< 0.01$)。

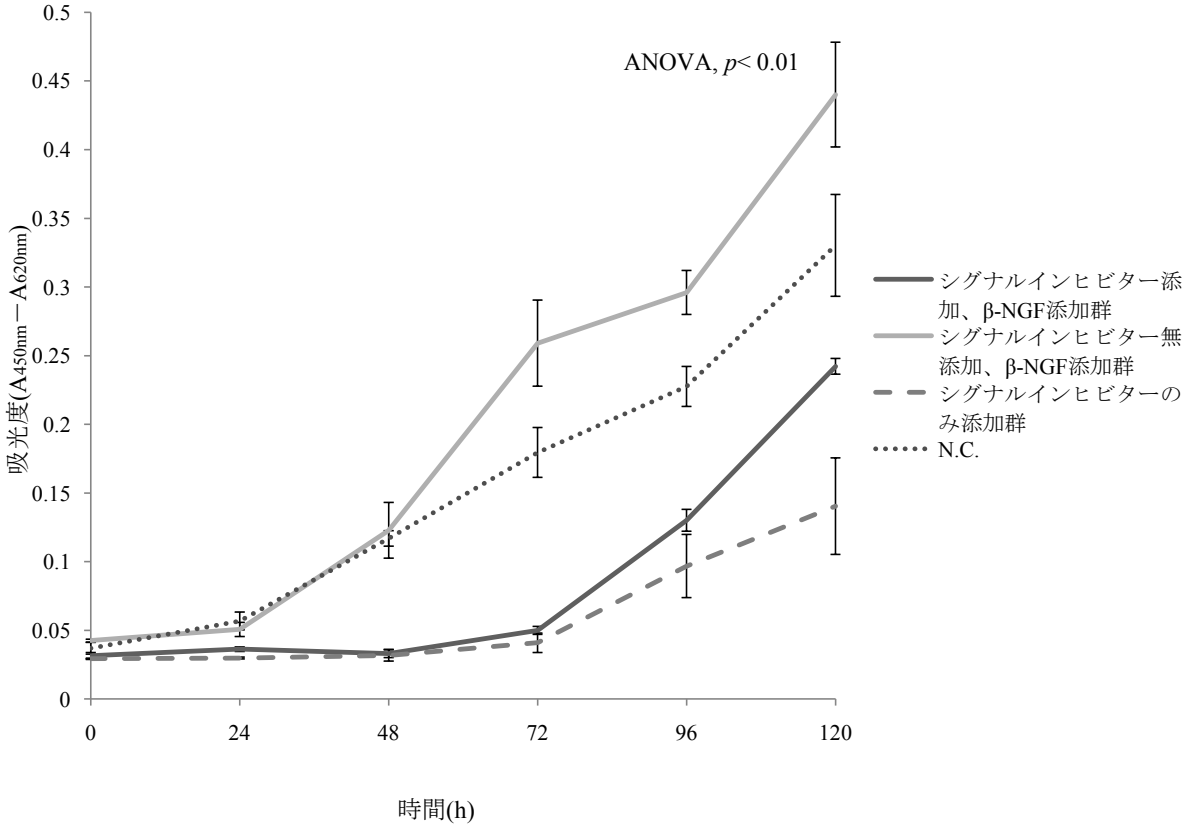


図 8 p75NTR シグナルインヒビターが OSCC の細胞増殖に与える影響

p75NTR シグナルインヒビターを添加した群は β-NGF 刺激が存在しても無添加群に比べ有意に細胞増殖が抑制されていた。

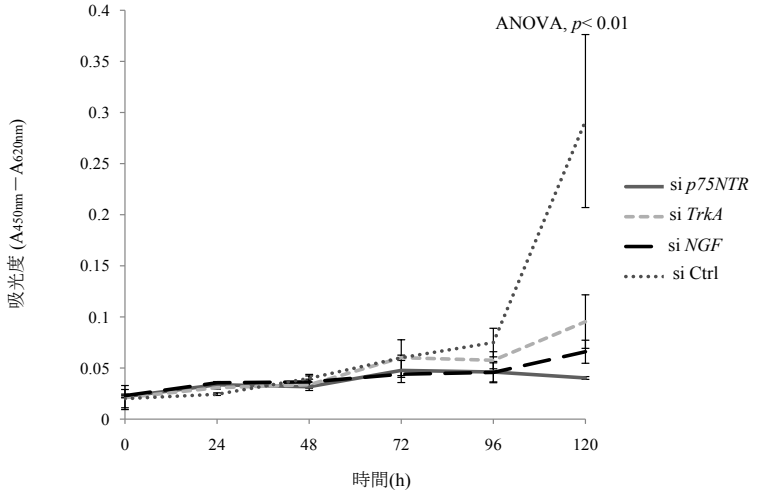
グラフは独立して行った 3 回のデータの平均±標準偏差を示しており対照群に対する p75NTR シグナルインヒビター添加群における生細胞数の統計学的有意差を示す。(ANOVA, $p<0.01$)

N.C.は無血清培地のみで培養した群を示す。

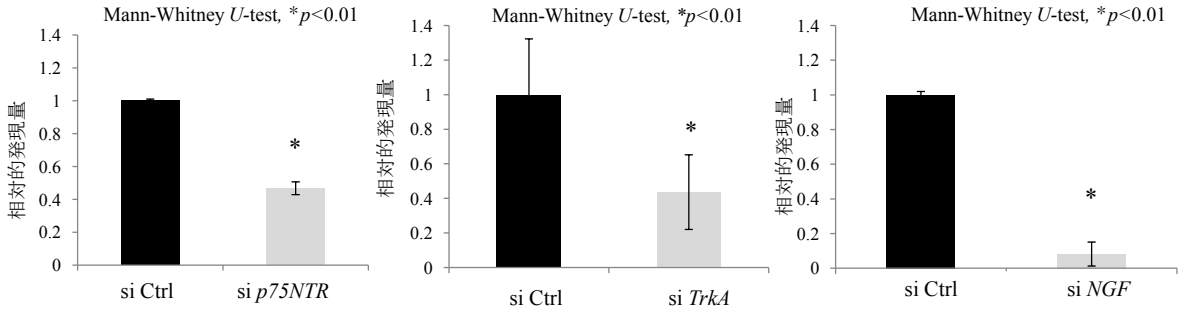
2-4. *p75NTR*、*TrkA*、*NGF* のノックダウンが OSCC の細胞増殖へ与える影響

p75NTR、*TrkA*、*NGF* の siRNA 導入が OSCC の細胞増殖にどのような影響を及ぼすか検討した。その結果、*p75NTR* siRNA 導入群、*TrkA* siRNA 導入群、*NGF* siRNA 導入群の全てにおいて、対照群と比較して細胞増殖が有意に抑制されていた (ANOVA, $p<0.01$) (図 9; A)。なお、*p75NTR* siRNA 導入効率は 53.3%、*TrkA* siRNA 導入効率は 56.5%、*NGF* siRNA 導入効率は 91.8%であった (図 9; B)。

A



B　real-time PCR 法



RT-PCR 法

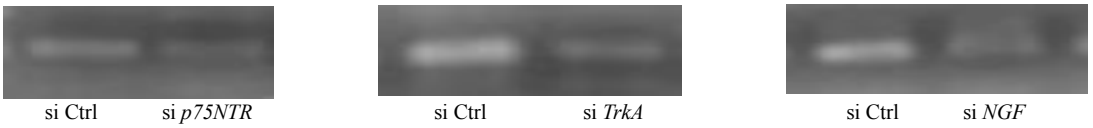


図 9 *p75NTR*、*TrkA*、および *NGF* ノックダウンが OSCC の細胞増殖に与える影響 (A: 増殖曲線、B: real-time PCR および RT-PCR)

(A) *p75NTR* siRNA 導入群、*TrkA* siRNA 導入群、*NGF* siRNA 導入群の全てで、対照群に比べ有意に細胞増殖が抑制されていた。

グラフは独立して行った 3 回のデータの平均±標準偏差を示しており対照群に対する siRNA 添加群における生細胞数の統計学的有意差を示す。(ANOVA, $p<0.01$)

(B) *p75NTR*、*TrkA*、*NGF* の siRNA 導入率はそれぞれ 53.3%、56.5%、91.2%であった。下段はそれぞれの RT-PCR の結果を示す。

グラフは独立して行った 3 回のデータの平均±標準偏差を示しており対照群の相対的発現量に対する統計学的有意差を示す。(Mann-Whitney *U*-test, $*p<0.01$)

si Ctrl は scrambled siRNA 導入群を示す。

考　察

OSCC に対する治療は、外科的切除を主体とした放射線療法や化学療法との三者併用療法が一般的であり、当科における OSCC 患者の累積 5 年生存率は約 80%と良好な治療成績が得られている。しかし、裏を返せば、約 20%の症例は現在の治療法では救済できていないことになる。再生医学を目指した近年の活発な幹細胞研究の貢献もあり、器官発生のみならず、癌組織が発生する分子メカニズムも明らかにされつつある。そのような中で、癌細胞のヒエラルキーの頂点に位置している CSC が新たな癌治療の標的細胞となっており、白血病などの一部の悪性腫瘍において CSC に対する分子標的薬の開発が進められている (39、40)。

CSC に対する分子標的薬が効率よく作用するためには、その標的とする分子の発現が CSC に特異的か、他の正常細胞との発現の差が大きいことが重要である。特に、抗癌剤の影響を受けやすい造血幹細胞での発現が低いことは必須であり、抗体医薬として作用させる場合には、抗体が容易に作用できる細胞膜表面に標的分子が発現しているのが望ましいと考えられる。これらの背景を踏まえ、本研究では、口腔粘膜上皮幹細胞のマーカーとされている p75NTR に着目した。p75NTR は細胞膜表面に存在するニューロトロフィン受容体であり、これまでに造血幹細胞における発現は報告されていないことから、OSCC の CSC に対する標的分子となり得るかもしれないと考えた。そこで、まず研究 1 において、OL および OSCC における p75NTR の発現を免疫組織化学的に検索した。

NOE において、p75NTR は上皮基底層のみに限局して発現していた。Nakamura らは、口腔粘膜の基底層に上皮幹細胞が存在していることを示しており (13)、本研究の結果と一致していた。また、基底層に存在する p75NTR 陽性細胞は増殖活性のマーカーである

Ki-67 をほとんど発現しておらず、過去の報告と同様に上皮幹細胞は細胞周期が非常に緩やかであることを示していた (41、42)。OL においても p75NTR の発現様式は変わらず、上皮性異形成の程度にかかわらず基底層のみに限局して発現していた。しかしながら、基底細胞のマーカーである CK5 および Ki-67 は、上皮性異形成が重度になるに伴ってその発現率が高くなっていた。これらの結果より、上皮性異形成において観察される基底層の肥厚は、p75NTR^{+}の上皮幹細胞が増殖したものではなく、p75NTR^{-}/Ki-67^{+}の細胞、すなわち幹細胞から一段階分化の進んだ transit-amplifying cell (TA 細胞)が増殖したことによって生じると考えられた (43、44)。

一方、OSCC における p75NTR の発現は、高分化型では癌胞巣の最外層の基底細胞様細胞にのみ発現を認めたが、中分化型および低分化型ではほぼ全ての癌細胞において発現が認められ、細胞膜のみならず細胞質全体が染色されていた。他臓器の癌組織においても、本研究と同様に低分化になると細胞質に強く発現することが報告されているが (27)、その詳細については不明である。興味深いことに、NOE および OL において p75NTR は増殖活性の低い細胞に発現していたが、OSCC では逆に増殖活性の高い細胞で発現が認められた。これは、正常な上皮幹細胞はニッチと呼ばれる微小環境によって幹細胞の増殖が制御されているが (45、46)、上皮幹細胞が癌化し浸潤する際に、ニッチから離脱したために、細胞増殖活性のある未分化な細胞に発現した可能性が推察された。

OSCC における p75NTR の発現と臨床所見との関連では、頸部リンパ節転移群は非転移群と比較して有意に p75NTR の陽性率が高かった。OSCC の頸部リンパ節転移は、YK 分類と強く相関することが知られており、OSCC の予後予測因子として広く用いられている。特に、grade 4C および 4D は高頻度に頸部リンパ節転移をきたす高悪性度の腫瘍と考えられている (35)。本研究において、grade 4C と 4D における p75NTR の陽性率は

grade1-3 の陽性率よりも有意に高かったことから、p75NTR 陽性率と YK 分類は相関していることが示唆された。さらに、p75NTR 高発現群は低発現群に比べ疾患特異的累積生存率が低かった。Søland らは、OSCC の原発巣において p75NTR 陽性率が高いほど予後不良であることを示しており、本研究の結果と一致していた (47)。これら知見より、p75NTR の発現は YK 分類と同様に OSCC の予後予測因子として有用であることが示唆された。

次に、研究 2 において、OSCC 細胞株を用い p75NTR の機能解析を行った。まず、5 種類の OSCC 細胞株において *p75NTR*、*TrkA*、*NGF*、*CK5* の発現を検索したところ、これらの mRNA の発現量はそれぞれの OSCC 細胞株間で異なっていた。転移能が低いとされる HSC-2 (48)や SQUU-A (49)で *p75NTR* の発現量が多く、高転移株である SQUU-B (49)において最も発現量が少なかった。 一方、*TrkA* は SQUU-B で最も発現量が多かった。Lagadec らは乳癌において、TrkA を過剰発現することで腫瘍の増大や、転移能が増強することを示しており(50)、本研究においても、転移能の高い SQUU-B において TrkA の発現が高かったことは非常に興味深い結果であると考えられる。

さらに、研究 1 の結果より、OSCC において p75NTR が細胞活性の高い細胞に発現していることが示唆されたため、p75NTR シグナルと細胞増殖の関係について検討した。まず、p75NTR のリガンドである recombinant human β-NGF を添加したところ、細胞増殖が促進された。β-NGF は p75NTR および TrkA の二つのレセプターに結合し細胞内にシグナルを伝達するが、その機能はレセプターの発現様式によって多様に変化することが知られている (51-57)。すなわち、p75NTR と TrkA がともに発現し、共受容体として機能した場合には細胞生存シグナルが伝達され、p75NTR が単独で発現した場合はアポトーシスが誘導される。本研究では、p75NTR および TrkA のどちらも OSCC 細胞株にお

いて発現を認めたことから、β-NGF が p75NTR と TrkA の共容体のリガンドとして作用した結果、細胞増殖に働いている可能性が示唆された。次に、p75NTR シグナルインヒビターである TAT-Pep5 の添加が、OSCC 細胞株の増殖に与える影響について検討を行った。p75NTR のシグナルは、まず p75NTR にリガンドが結合することにより始まり、細胞内へとシグナルが伝達される。そのシグナルの下流に Rho-GDI と Rho-GDP の複合体があり、それらを解離させることでシグナルが細胞核内へ伝達される。この複合体の解離は Rho-GDP がリン酸化され Rho-GTP に変化することによって生じることが明らかにされており、TAT-Pep5 は、Rho-GDI と Rho-GDP の解離を阻害することで p75NTR のシグナル伝達を阻害すると考えられている (37)。研究 2 の結果で示したように、p75NTR シグナルを阻害することで β-NGF 存在下でも有意に細胞増殖が抑制されていたことから、p75NTR シグナルは OSCC の細胞増殖に関与していることが示唆された。さらに、p75NTR シグナルインヒビターのみを添加した群は、無血清培地のみで培養した細胞群と比較して、細胞増殖が有意に抑制されていた。このことから、OSCC 細胞がオートクラインに何らかの NGF を含むニューロトロフィンを分泌し、p75NTR シグナルを活性化することにより細胞増殖を行っていた可能性が示唆された。Naderi らは TAT-Pep5 が乳癌細胞株の細胞増殖に与える影響について検討した結果、p75NTR のシグナル阻害により細胞増殖が抑制されるという結果を報告しており(58)、本研究と同様の結果であった。さらに、*p75NTR*、*TrkA* および *NGF* に対する siRNA 導入による OSCC 細胞株の細胞増殖に及ぼす効果について検討した。その結果、*p75NTR*、*TrkA*、*NGF* の siRNA を導入群は対照群に比べ有意に細胞増殖が抑制されていた。Eric らは、乳癌細胞株において、*NGF* の発現をノックダウンすることで細胞増殖が抑制されたと報告している (59)。また、Tsunoda らは、食道癌において NGF が過剰発現しており、そのレセプターである p75NTR

と TrkA を介したオートクラインループによって細胞増殖が維持されていることを示している (26)。

以上の結果より、OSCC において p75NTR は TrkA と共受容体として働き、そのリガンドである NGF が結合することにより、細胞増殖に関与している可能性が示唆された。しかし、p75NTR のリガンドには、本研究で用いた NGF だけではなく、NT-3、NT-4、および BDNF があり、それらが複雑にかかわりあい OSCC の増殖、分化、浸潤、転移を制御している可能性があり、さらなる詳細な解析が必要であると考えられる。また、p75NTR を発現している細胞が自己複製や造腫瘍能といった CSC の細胞特性を有しているかについても colony formation assay や免疫不全マウスへの細胞移植実験による腫瘍形成の観察などによって証明していかなければならない。

固形癌における CSC の研究まだ発展途上の状態であるが、今後急速に解析が進展し、CSC を標的とした新たな治療法が開発されることが期待される。

謝　辞

稿を終えるにあたり、このような研究の機会を与えて頂きましたとともに終始御懇篤なる御指導、御校閲を賜りました九州大学大学院歯学府口腔顎顔面病態学講座顎顔面腫瘍制御学分野中村誠司教授に深甚なる謝意を表します。さらに、直接御指導、御校閲を頂きました九州大学大学院歯学府口腔顎顔面病態学講座顎顔面腫瘍制御学分野川野真太郎助教に謹んで感謝の意を表します。また、常に研究の協力ならびに励ましの言葉を頂きました九州大学大学院歯学府口腔顎顔面病態学講座顎顔面腫瘍制御学分野の教室員の皆様に深く感謝いたします。

参考文献

1. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* 1990; **61 (5)**: 759-767.

2. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic about fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006; **126 (4)**: 663-676.

3. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Ichisaka T, Yamamoto S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell.* 2007; **131 (5)**: 861-872.

4. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that orginates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med.* 1997; **3 (7)**: 730-737.

5. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hemandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Nat.l Acad. Sci. USA*. 2003; **100 (11)**: 6890.

6. Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Piozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, De Maria R. Identification and expression of human colon-cancer-initiating cells. *Nature.* 2007; **445(7123):** 111-115.

7. Dalerba P, Dylla SJ, Park IK, Liu R, Wang X, Cho RW, Hoey T, Gurney A, Huang EH, Simeone DM, Shelton AA, Parmiani G, Castelli C, Clarke MF. Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2007; **104 (24)**: 10158-10168.

8. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Boon VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB. *Cancer Res.* 2003; **63 (18)**: 5821-5828.

9. Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, Dewhirst MW, Bigner DD, Rich JN. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of DNA damage response. *Nature.* 2006; **444**: 756-760.

10. Gentao Liu, Xiangpeng Yuan, Zhaohui Zeng, Patrizia Tunici, Hiushan Ng, Iman R. Abdulkadir, Lizhi Lu, Dwain Irvin, Keith L. Black, John S. Yu. Analysis of gene expression and chemoresistance of $CD133^{+}$ cancer stem cells in glioblastoma. *Molecular Cancer.* 2006; **5**: 67.

11. Reya T, Morison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature.* 2001; **414 (6859)**: 105-111.

12. Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, Wolf GT, Kaplan MJ, Dalerba P, Weissman IL, Clarke MF, Ailles LE. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc. Ntal. Acad. Sci .USA.* 2007; **104 (3)**: 973-978.

13. Nakamura T, Endo K, Kinoshita S. Identification of Human Oral Keratinocyte Stem/Progenitor Cells by Neurotrophin Receptor p75 and Role of Neurotrophin/p75 Signaling. *Stem Cells.* 2007; **25**: 628-638.

14. Radeke MJ, Misko TP, Hsu C, Herzenberg LA, Shooter EM. Gene transfer and molecular cloning of the rat nerve growth factor. *Nature.* 1987; **325 (6105)**: 593-597.

15. Meakin SO, Shooter EM. The nerve growth factor family of receptors. *Trends Neurosci.* 1992; **15 (9)**: 323-331.

16. Bothwell M. $p75^{NTR}$: A Receptor After All. *SCIENCE.* 1996; **272**: 506-507.

17. Smith CA, Farrah T, Goodwin RG. The TNF Receptor Superfamily of Cellular and Viral Proteins: Activation, Costimulation, and Death. *Cell.* 1994; **76**: 959-962.

18. Kuner P, Hertel C. NGF Induces Apotosis in a Human Neurotrophin Receptor $p75^{NTR}$. *Journal of Neuroscience Research.* 1998; **54**: 465-474.

19. Rabizadeh S, Oh J, Zhong LT, Yang J, Bitler CM, Butcher LL, Bredesen DE. Induction of Apotosis by Low-Affinity NGF Receptor. *SCIENCE.* 1993; **261**: 345-348.

20. Dechant G, Barde YA. Signaling through the neurotrophin receptor $p75^{NTR}$. *Current*

Opinion in Neurobiology. 1997; **7**: 413-418.

21. Carter BD, Kaltschmidt C, Kaltschmidt B, Offenhauser N, Bohm-Matthaei R, Baeuerle PA, Barde YA. Selective Activation of NF-κB by Nerve Growth Factor Through the Neurotrophin Receptor p75. *Sciencs.* 1996; **272**: 542-545.

22. Frade JM, Rodriguez-Tebar A, Barde YA. Induction of cell death by endogenenous nerve growth factor through its p75 receptor. *Nature.* 1996; **383**: 166-168.

23. Yaar M, Zhai S, Pilch PF, Doyle SD, Eisenhauer PB, Fine RE, Glichrest BA. Binding of β-Amyloid to the p75 Neurotrophin Receptor Induces Apoptosis. *The Journal of Clinical Investigation* 1997; **100**: 2333-2340.

24. Carter BD, Lewin GR. Neurotrophins Live or Let Die: Does $p75^{NTR}$ Decide? *Neuron.* 1997; **18**: 187-190.

25. Yoon SO, Casaccia-Bonnefil P, Carter B, Chao MV. Competitive Signaling Between TrkA and p75 Nerve Growth Factor Receptors Determines Cell Survival. *The Journal of Neuroscience.* 1998; **18 (9)**: 3273-3281.

26. Tsunoda S, Okumura T, Ito T, Soma T, Watanabe G, Kaganoi J, Itami A, Sakai Y, Shimada Y. Significance of nerve growth factor overexpression and its autocrine loop in oesophageal squamous cell carcinoma. *British Journal of Cancer.* 2006; **95**: 322-330.

27. Okumura T, Tsunoda S, Mori Y, Ito T, Kikuchi K, Wang TC, Yasumoto S, Shimada Y. The Biological Role of the Low-Affinity p75 Neurotrophin Receptor in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2006; **12 (17)**: 5096-5103.

28. Jin H, Pan Y, Zhao L, Zhai H, Li X, Sun L, He L, Chen Y, Hong L, Fan YDD. p75Neurotrophin Receptor Suppresses the Proliferation of Human Gastric Cancer Cells. *Neoplasia.* 2007; **9 (6)**: 471-478.

29. Sun ZG, Huang SD, Zhang BR, Xu ZY, Gong DJ, Yuan Y. Isolation and identification of cancer stem cells from humesophageal carcinoma. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2009; **89 (5)**:

291-295. Article in Chinese.

30. Huang SD, Yuan Y, Liu XH, Gong DJ, Bai CC, Wang F, Luo JH, Xu ZY. Self-renewal and chemotherapy resistance of $p75^{NTR}$ positive cells in esophageal squamous cell carcinoma. *BMC Cancer.* 2009; **9**: 9.

31. Kramer IR, Lucas RB, Pindborg JJ, Sobin LH. Definition of leukoplakia and related lesions: an aid to studies on oral precancer. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 1978; **46:** 518-539.

32. Burkhardt A. Premalignant changes in the mouth mucosa. Proposals for nomenclature by an international expert commission. *Pathologe.* 1985; **6:** 126-132.

33. Gale N, Pilch BZ, Sindramsky D, EI Nagger A, Westra W, Califano W, Johnson N, MacDonald D. G. Epithelial precursor lesions. In: Barnes L, Eveson J, Reichart P, Sidransky D, eds. World Health Organization classification of tumors. *Pathology and genetics of head and neck tumors.* Lyon: Iarc Press, 2005; 177-179.

34. Wahi PN, Cohen B, Luthra UK *et al.* Histological consideration. In: Wahi PN, Cohen B, Luthra UK *et al.*, eds. Histological typing of oral and orpharyngeal tumors. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 1977; 15-19.

35. Yamamoto E, Miyakawa A, Kohama G. Mode of invasion and lymph node metastasis in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Head Neck Surg.* 1984; **6:** 938-947.

36. Bastida E, Ordinas A, Jamieson GA. Differing plarelet aggregating effects by two tumor cell lines: absence of role for platelet-derived ADP. *Am J Hematol.* 1981; **11 (4)**: 367-378.

37. Yamashita T, Tohyama M. The p75 receptor acts as a deisplacement factor that releases Rho from Rho-GDI. *Nature neuroscience.* 2003; **6 (5)**: 461-467.

38. Yoshizaki K, Yamamoto S, Yamada A, Yuasa K, Iwamoto T, Fukumoto E, Harada H, Saito M, Nakasima A, Nonaka K, Yamada Y, Fukumoto S. Neurotrophic Factor Neurotrophin-4

Regulates Ameloblastin Expression via Full-length *TrkB*. *The Journal of Biological Chemistry.* 2008; **283 (6)**: 3385-3391.

39. Ohno R, Asou N, Ohnishi K. Treatment of acure promyelocytic leukemia: strategy toward further increase of cure rate. *Leukemia.* 2003; **17 (8)**: 1454-1463.

40. Taddei A, Roche D, Bickmore WA, Almouzni G. The effects of histone deacetylase inhibitors on heterochromatin: implications for anticancer therapy? *EMBO.* 2005; **6 (6)**: 520-524.

41. Janes SM, Sally Lowell, Caroline Hutter. Epidermal stem cells. *Journal of Pathology.* 2002; **197**: 479-491.

42. Potten CS, Chadwick C, Ijiri K, Tsubouchi S, Hanson WR. The rescruitability and cell-cycle state of intestinal stem cells. *Int. J. Cell Cloning.* 1984; **2 (2)**: 126-140.

43. Fuchs E, Segre JA. Stem cells: a new lease on life. *Cell.* 2000; **100 (1):** 143-155.

44. Lehrer MS. Sun TT, Lavker RM. Strategies of epithelial repair: modulation of stem cell and transit amplifying cell proliferation. *J. Cell Sci.* 1998; **111**: 2867-2875.

45. Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X, Tong WG, Ross J, Haug J, Johnson T, Feng JQ, Stephen Harris, Leanne M. Wiedemann, Yuji Mishina, Linheng Li. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature.* 2003; **425**: 836-841.

46. Arai F, Hirao A, Ohmura M, Sato H, Matsuoka S, Takubo K, Ito K, Koh GY, Suda T. Tie2/Angiopoietin-1 Signaling Regulates Hematopoietic Stem Cell Quiescence in the Bone Marrow Niche. *Cell.* 2004; **118**: 149-161.

47. Soland TM, Brusevold IJ, Koppang HS, Schenck K, Bryne M. Nerve growth factor receptor ($p75^{NTR}$) and pattern of invasion predict poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. *Histropathology*. 2008; **53**: 62-72.

48. Momose F, Araida T, Negishi A, Ichijo H, Shioda S, Sasaki. Variant sublines with different

metastatic potentials selected in nude mice from human oral squamous cell carcinoma. *J. Oral. Pathol. Med.* 1989; **18 (7)**: 391-395.

49. Morifuji M, Taniguchi S, Sakai H, Nakabeppu Y, Ohishi M. Differential Expression of Cytokeratin after Orthotopic Implantation of Newly Established Human Tongue Cancer Cell Lines of Defined Metastatic Ability. *American Journal of Pathology*. 2000; **156 (4)**: 1317-1326.

50. C. Lagadec, S. Meignan, E. Adriaenssens, B. Foveau, R. Romon, R-A. Toillon, B. Oxombre, H. Hondermarck, X. Le. Bourhis. TrkA overexpression enhances growth metastasis of breast cancer cells. *Oncogene.* 2009; **28:** 1960-1970.

51. Gregory M. Ross, Igor L. Shamovsky, Gail Lawrance, Mark Solc, Suzanne M. Dostaler, Donald F. Weaver, Richard J. Riopelle. Reciprocal modulation of TrkA and $p75^{NTR}$ affinity states is mediated by direct receptor interactions. *European Journal of Neuroscience.* 1998; **10**: 890-898.

52. Kohn J, Aloyz RS, Toma JG, Haak-Fredscho M, Miller FD. Functionally Antagonistic interactions between the TrkA and p75 Neurotrophin Receptors Regulate Sympathetic Neuron Growth and Target Innervation. *The Journal of Neuroscience* 1999; **19 (13)**: 5393-5408.

53. Micera A, Lambiase A, Stampachiaccheiere B, Bonini S, Bonini S, Levi-Schaffer F. Nerve growth factor and tissue repair remodeling $trkA^{NGFR}$ and $p75^{NTR}$, two receptors one fate. *Cytokine & Growth Factor Reviews.* 2007; **18**: 245-256.

54. Perro L, Paladino S, Mazzone M, Nitsch L, Gulisano M. Function interaction between $p75^{NTR}$ and TrkA: the endocytic trafficking of $p75^{NTR}$ is driven by TrkA and regulates TrkA-mediated signaling. *Biochem. J.* 2005; **385**: 233-241.

55. Kahle P, Barker PA, Shooter EM, Hertel C. p75 nerve growth factor receptor modulates p140trkA kinase activity, but not ligand internalization, in PC12 cells. *J. Neurosci. Res.* 1994; **38 (5)**: 599-606.

56. Huang EJ, Reichardt LF. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu. Rev.*

Biochem. 2003; **72**: 609-692.

57. Bibel M, Barde YA. Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes Dev.* 2000; **14 (23)**: 2919-2937.

58. Naderi A, Hughes-Davies L. Nerve growth factor/ nuclear factor-κB pathway as atherapeutic target in breast cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2009; **135**: 211-216.

59. Adriaenssens E, Vanhecke E, Sule P, Mougel A, Page A, Romon R, Nurcombe V, Le Bourhis X, Hondermarck H. Nerve Growth Factor Is a Potential Therapeutic Target in Breast Cancer. *Cancer Res.* 2008; **68 (2)**: 346-351.