

## 口腔癌におけるBrachyury発現と上皮間葉移行の関与 ： 予後因子としての応用の可能性

今城, 育美  
九州大学大学院歯学府

<https://doi.org/10.15017/21985>

---

出版情報：九州大学, 2011, 博士（歯学）, 課程博士  
バージョン：  
権利関係：

# 口腔癌における Brachyury 発現と 上皮間葉移行の関与

— 予後因子としての応用の可能性 —

九州大学大学院歯学府

口腔顎顔面病態学講座 口腔顎顔面外科学分野

今城 育美

指導教員

九州大学大学院歯学府

口腔顎顔面病態学講座 口腔顎顔面外科学分野

森 悦秀 教授

本研究の内容は下記の学術雑誌に投稿中である。

**T-box transcription factor Brachyury expression is correlated with epithelial-mesenchymal transition and lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma.**

Ikumi Imajyo, Tsuyoshi Sugiura, Yousuke Kobayashi, Kotaro Ishii, Naonari Akimoto, Naoya Yoshihama, Ieyoshi Kobayashi, and Yoshihide Mori.

Cancer. Submitted

## 略語表

AdCC: adenoid cystic carcinoma (腺様嚢胞癌)

BSA: bovine serum albumin (ウシ血清アルブミン)

CSC: cancer stem cell (癌幹細胞)

EMT: epithelial-mesenchymal transition (上皮間葉移行)

PBS: phosphate-buffered saline (リン酸緩衝食塩水)

SCC: squamous cell carcinoma (扁平上皮癌)

TBST: Tris-buffer saline 0.1% Tween-20 (0.1% tween20 含有トリス緩衝液)

# 目次

要旨	1
緒言	4
研究材料と方法	8
その 1. 腺様嚢胞癌における Brachyury 発現と上皮間葉移行の関与	13
結果	
図表	
その 2. 扁平上皮癌における Brachyury 発現と上皮間葉移行の関与	22
結果	
図表	
考察	39
総括	45
謝辞	46
引用文献	47

# 要旨

癌浸潤・転移は治療を困難にする最も重要な因子である。転移には細胞生物学的にダイナミックな細胞特性の変化と多段階の過程を経ることが知られており、近年、その過程における上皮間葉移行 (epithelial-mesenchymal transition: EMT) の関与が数多く報告されている。さらに T-box 転写因子のひとつである Brachyury が EMT を誘導することが報告された。しかし、臨床検体を用いて Brachyury 発現と EMT の関連を検討した報告は、これまでに口腔癌を含むすべての癌種において見られない。そこで本研究では、腺様嚢胞癌と扁平上皮癌の未治療生検組織を用いて、EMT および Brachyury 発現と臨床的背景因子との関連、Brachyury 発現と EMT の関連について検討した。

## 1. 腺様嚢胞癌における Brachyury 発現と EMT の関与

腺様嚢胞癌 (AdCC) 21 例の未治療生検組織における Brachyury、E-cadherin、Vimentin の発現様式を免疫組織化学的に検索した。それぞれのタンパク質の陽性率は Brachyury: 100% (21 / 21 例)、E-cadherin: 90.5% (19 / 21 例)、Vimentin: 90.5% (19 / 21 例) と症例の分布に偏りがあったため、Vimentin および Brachyury 発現と臨床的背景因子との関連、Brachyury 発現と EMT との

関連は検討できなかつた。また、E-cadherin 発現と臨床的背景因子との関連も認められなかつた。患者の10年生存率および無病生存率についてKaplan-Meier法にて検討を行ったところ、Vimentin 発現とは相関が認められなかつたが、E-cadherin 発現および EMT と生存率に相関が認められた ( $p < 0.001$ ,  $p = 0.001$ )。Brachyury 発現には陰性症例がなく相関の検討が出来なかつた。

## 2. 扁平上皮癌における Brachyury 発現と EMT の関与

扁平上皮癌 (SCC) 152 例の未治療生検組織における Brachyury、E-cadherin、Vimentin の発現様式を免疫組織化学的に検索した。それぞれのタンパク質の陽性率は Brachyury: 71.1% (108 / 152 例)、E-cadherin: 68.4% (104 / 152 例) Vimentin: 18.4% (28 / 152 例) であった。臨床的背景因子のうち E-cadherin 発現と関連を認めたものは、リンパ節転移、遠隔転移、腫瘍の分化度、腫瘍の浸潤様式 (いずれも  $p < 0.05$ ) であり、Vimentin 発現はリンパ節転移、遠隔転移、腫瘍の浸潤様式 (いずれも  $p < 0.05$ ) と関連が認められた。Brachyury 発現と関連を認めたものは、腫瘍の大きさ (T 分類)、リンパ節転移、腫瘍の分化度、腫瘍の浸潤様式 (いずれも  $p < 0.05$ ) であった。E-cadherin の発現低下と Vimentin の発現を EMT と定義し、Brachyury 発現と EMT の関連を検討したところ、Brachyury 発現様式と Vimentin の発現および EMT に関連が認めら

れた ( $p = 0.002$ ,  $p = 0.035$ )。検索した Brachyury、E-cadherin、Vimentin の分子のうちどれが最もリンパ節転移、遠隔転移と相関するかロジスティック回帰分析を用いて検索したところ、単変量解析において、リンパ節転移はすべての分子と相関し、特に Brachyury 発現 ( $p = 0.001$ , オッズ比 4.390) と最も強く相関していた。遠隔転移は Brachyury 発現との相関は認められず、E-cadherin 発現 ( $p = 0.001$ , オッズ比 0.113) と最も強く相関した。5 年生存率、無病生存率について Kaplan-Meier 法にて検討を行ったところ、Brachyury、E-cadherin、Vimentin の発現はすべて強い相関が認められた。

AdCC は症例数が少なく統計学的な解析が困難であったが、SCC と比較した Brachyury 陽性率の高さは AdCC の高転移性を示す可能性があると考えられる。以上より、口腔癌における Brachyury 発現と EMT の関与が示され、口腔癌特に SCC の予後因子として臨床応用が可能であると考えられた。



## 緒言

腺様嚢胞癌 (AdCC) は、神経や血管への著明な局所浸潤と、肺転移を代表とする血行性遠隔転移を特徴とする悪性度の高い唾液腺腫瘍であり、再発率は 16-85%、遠隔転移率は 25-55%とされている[ 1,2,3 ]。また、扁平上皮癌 (SCC) は口腔および頭頸部領域で最も頻度の高い癌であり、血行性およびリンパ行性に転移する。所属リンパ節への転移率は 30-40%とされており、転移症例の予後は不良である。癌の転移は治療を困難にする最も大きな要因であり、患者の予後は転移の有無によって大きく左右されるため、転移機構の制御および早期の転移予測は治療上の大きな課題である。

細胞同士が強固に接着している上皮系癌細胞が浸潤転移するには、細胞間接着を減弱させ、高い遊走能を獲得する必要がある。この機構に初期の胚分化や創傷治癒の際に起こる上皮間葉移行 (EMT) が関与し、癌の浸潤転移に重要な役割を担うことが報告されている[ 4,5 ]。EMT は、上皮系マーカーであり接着分子である E-cadherin の消失と間葉系マーカーである Vimentin の発現を特徴とする形質転換である。胃癌、大腸癌、乳癌、食道癌、肺癌、子宮癌などで EMT が予後不良因子であること[ 6-12 ]、また口腔領域では舌 SCC において、EMT とサテライト腫瘍の形成やリンパ節転移との関連が報告されている[ 13,14 ]。

EMT によって癌細胞の細胞間接着が減弱し、遊走能を獲得することから、EMT は癌の浸潤転移過程の初期に起こる、原発巣からの離脱と浸潤というステップに関与していると考えられる。

EMT は初期胚で正常に発現している Twist、Snail、Slug、Gooseoid、SIP1 などの遺伝子によって制御されており [ 15,10,16,17,18 ]、癌細胞はこれらの遺伝子にコードされている転写因子によって遊走能や浸潤能などの間葉系性質を獲得する。これまでに乳癌、前立腺癌、胃癌、悪性黒色腫において Twist の発現上昇が報告されている [ 19,20 ]。

Brachyury 遺伝子は T-box と呼ばれる DNA 結合領域を持つ転写制御因子をコードし、脊椎動物の脊索の分化や後方中胚葉の形成に重要な役割を担う遺伝子として知られている [ 21-23 ]。近年、この Brachyury 遺伝子が癌細胞株において EMT を促進し、癌細胞の浸潤能と転移能を増強する可能性が報告された [ 24 ]。ヒト癌細胞に Brachyury を遺伝子導入すると間葉系マーカーの発現増強と上皮系マーカーの発現低下に代表される EMT 形質が誘導される。胚分化に特徴的な Brachyury 発現および EMT が癌の浸潤転移にも関与していることから、癌の浸潤転移における EMT は極めて発生段階と類似したメカニズムでコントロールされていると推察される。

当分野では癌の浸潤転移機構の解明を目的とし、*in vitro* および *in vivo* モデ

ルを用いて癌の浸潤転移機構について解析を行ってきた。当分野の下田らは、腺様嚢胞癌細胞株（ACCS）から分離した高転移性細胞株が EMT 形質を有しており、さらに自己複製能を持つことからそれが癌幹細胞（CSC）であること、Brachyury をノックダウンすることで EMT および CSC 形質が消失することを示した。このことから Brachyury が EMT および CSC 形質を制御しており、EMT と CSC が直接的に関連していることが示唆された。しかしながら Brachyury は発生段階での分化マーカーとして胎児・胚組織などで発現が検討されているが、癌組織における発現については全く検討されていない。そこで、*in vitro* と同様に、臨床検体で癌における Brachyury 発現と EMT との関連が認められるかどうかを検索し、予後予測へ応用し得るかを検討するために、AdCC および SCC の切除組織における Brachyury、E-cadherin、Vimentin の発現を免疫組織化学的に検索し、それらと臨床的背景因子との関連、および Brachyury 発現と EMT の関連について検討した。

# 研究材料と方法

## 1. 対象

検索対象は、平成 5 年から平成 18 年に九州大学病院口腔外科を受診し、病理組織学的検査により AdCC と診断された新鮮症例 21 例と SCC と診断された新鮮症例 152 例である。患者の年齢分布は AdCC で 25 歳～83 歳、平均年齢 62.3 歳、SCC で 24 歳～85 歳、平均年齢 61.0 歳であった。性別はそれぞれ男性 8 例と女性 13 例、男性 97 例と女性 55 例であった。なお、すべての組織は放射線療法や化学療法を行っていない、診断もしくは治療のために採取した組織であった。これらの組織の利用に関しては九州大学医系地区部局臨床研究倫理審査委員会による審査および承認を得た。臨床的背景因子として、年齢、性別、部位、T 分類、リンパ節転移の有無、遠隔転移の有無、病理組織型、腫瘍の分化度、腫瘍の浸潤様式について検討した。口腔癌の解剖学的部位および TNM 分類は UICC (International Union Against Cancer) TNM classification 第 7 版 (2009 年) [25] の規定に従った。画像診断にてリンパ節転移が疑われた症例は頸部郭清術を施行し、最終的に病理組織学的所見にて転移の有無を診断した。遠隔転移の有無は画像診断にて診断した。また腫瘍の分化度は WHO 分類 (2003 年) [26] により、腫瘍の浸潤様式は Anneroth の分類 (1986 年) [27] に従って分

類した。

## 2. 抗体

免疫組織化学的染色には、抗 Brachyury 抗体と EMT 関連分子として上皮系マーカーである抗 E-cadherin 抗体、間葉系マーカーである抗 Vimentin 抗体を使用した。抗体の購入先および抗体希釈率を別表に示した（表 1）。

表 1. 免疫組織学的染色に用いた抗体

抗体		購入先	希釈
抗 Brachyury(H-210)抗体 sc-20109	ウサギ ポリクローナル抗体	Santa Cruz Biotechnology, Inc Santa Cruz, CA	1:100
抗 E-cadherin 抗体 610181	マウス モノクローナル抗体	BD Biosciences San Jone, USA	1:1000
抗 Vimentin(C-20)抗体 sc-7557	ヤギ ポリクローナル抗体	Santa Cruz Biotechnology, Inc Santa Cruz, CA	1:100
Alexa Fluor 488 抗ウサギ IgG ; A11034	ヤギ ポリクローナル抗体	invitrogen, Carlsbad, USA	1:2000
Alexa Fluor 350 抗マウス IgG ; A11029	ヤギ ポリクローナル抗体	invitrogen, Carlsbad, USA	1:2000
Alexa Fluor 594 抗ヤギ IgG ; A11058	ロバ ポリクローナル抗体	invitrogen, Carlsbad, USA	1:2000

### 3. 免疫組織化学的解析

#### 1) 酵素抗体法

組織をホルマリン固定、パラフィン包埋、薄切して 4  $\mu$  m 厚の切片を作製した。免疫組織化学的染色はヒストファイン SAB-PO キット (424012, 424022, 424032, Nichirei, Tokyo, Japan) を用いて、間接酵素抗体法で行った。脱パラフィン後、Target Retrieval Solution (S1700, Dako North America, Inc., Carpinteria, USA) 中で加熱処理し、3 %過酸化水素水で内因性ペルオキシダーゼ活性の除去した後、10 %正常血清で非特異反応の阻止を行った。そして一次抗体を加えて 4  $^{\circ}$ Cで一晩反応させた。Tris-buffer saline 0.1% Tween-20 (TBST) で洗浄後、二次抗体を室温で 60 分間反応させた後に TBST で洗浄し、酵素試薬を室温で 10 分反応させ、DAB 基質キット(Nichirei, Tokyo, Japan)で発色させた。E-cadherin と Vimentin の染色には 0.5%ヘマトキシリンで対比染色後、脱水、透徹、封入し検鏡した。

免疫組織化学的評価は、腫瘍浸潤先端部において拡大率 400 倍のランダムな 3 視野において行った。なお、予備的実験において腫瘍浸潤先端部 30 視野の全細胞による測定結果の平均と、ランダムに選んだ 3 視野それぞれでランダムに選んだ 10 細胞による測定結果の平均に統計学的有意差がないことを確認し、3 視野それぞれ 10 細胞ずつにおける測定は評価として必要十分であると判断した。

Brachyury と E-cadherin は Photoshop CS5 (Adobe systems Inc., San Jose, CA,

USA) の測定ツールを使用し、1 視野当たりランダム 10 細胞においてタンパク染色輝度 (pixel 数) とバックグラウンドの染色輝度 (pixel 数) を測定した。タンパク染色輝度 (pixel 数) とバックグラウンドの染色輝度 (pixel 数) との差を「染色強度」とした。さらに標本間の染色強度の差を標準化するため、同一プレパラート内の正常組織コントロールの「染色強度」との比を「発現強度」として評価に利用した。コントロールは Brachyury、E-cadherin でそれぞれリンパ球、正常上皮有棘細胞層の細胞膜に設定した。Vimentin は 1 視野当たりの陽性細胞数を用いて、それぞれのタンパクの発現強度を強陽性 (++)、陽性 (+)、陰性 (-) に分類した。詳細な分類方法は別表に示した (表 2)。癌細胞における E-cadherin の発現低下と Vimentin の発現を EMT と定義し、Brachyury の発現はその局在から、Type I: 陰性、Type II: 細胞質陽性、Type III: 核陽性、Type IV: 核細胞質陽性の 4 つの発現様式に分類して検討を行った。なお、臨床的背景因子のうち予後に関連するリンパ節転移、遠隔転移との統計学的な相関が最大となる値を分類のしきい値として用いた。この分類と、年齢、性別、部位の背景因子には統計学的な相関が認められなかったことから、本分類のしきい値の設定が妥当であると判断した。

表 2. タンパク発現強度分類方法

		-	+	++	単位
Brachyury 発現強度	核	<0.2	0.2-0.7	>0.7	
コントロール: リンパ球	細胞質	<0.1	0.1-0.25	>0.25	比
E-cadherin 発現強度		<0.37	0.37-0.54	>0.54	
コントロール: 正常上皮					
Vimentin		0	0-10	>10	個
一視野当たり陽性細胞数 (×400)					

$$\text{発現強度} = \frac{\text{タンパク染色輝度とバックグラウンド輝度の差の平均 (腫瘍組織染色強度)}}{\text{コントロール染色輝度とバックグラウンド輝度の差の平均 (正常組織染色強度)}}$$

## 2) 蛍光抗体法

組織をホルマリン固定、パラフィン包埋、薄切して 4μm 厚の切片を作製した。

脱パラフィン後、Target Retrieval Solution (S1700, Dako North America, Inc.,

Carpinteria, USA) 中で加熱処理を行い、3 %BSA-PBS にて非特異反応の阻止

を行った後、抗 Vimentin 抗体を加えて 4 °C で一晩反応させた。PBS で洗浄後、

Alexa Fluor 594 ロバ 抗ヤギ抗体を室温で 60 分間反応させ、PBS で洗浄、抗

Brachyury 抗体と抗 E-cadherin 抗体を混合して加え 4 °C で一晩反応させた。

PBS で洗浄後、Alexa Fluor 488 ヤギ 抗ウサギ抗体と Alexa Fluor 350 ヤギ 抗

マウス抗体を混合して室温で 60 分間反応させ、PBS で洗浄したのち、ProLong



Gold antifade Reagents (Invitrogen, California, USA) で封入し、蛍光顕微鏡 Z-axis-controlled microscope with a CCD camera (BZ-8000; Keyence, Osaka Japan)にて検鏡した。

#### 4. 統計学的検討

統計処理は statistical software package SPSS (Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA) を用いて行った。Brachyury、EMT 関連分子の発現と臨床的背景因子との関連の検討には Pearson の  $\chi^2$  検定、リンパ節転移および遠隔転移のリスク因子の検討はロジスティック回帰分析、生存率の算出は Kaplan-Meier 法で行い、生存率における有意差検定は Log rank test で行った。 $p < 0.05$  の場合を有意差ありと判定した。

その 1.

腺様嚢胞癌における  
Brachyury 発現と上皮間葉移行の関与

# 結果

## 1. EMT 関連分子の発現と臨床的背景因子との関連

AdCC 組織において、EMT 関連分子である E-cadherin および Vimentin の局在と発現強度を検討した。E-cadherin と Vimentin の発現強度を「研究材料と方法」に示す方法で、強陽性(++)、陽性(+)、陰性(-)に分類した。E-cadherin は上皮細胞の細胞膜に発現しており、腫瘍細胞全体で発現低下していた。Vimentin は間葉系細胞の細胞質に発現しており、腫瘍細胞全体で発現していた。E-cadherin、Vimentin の発現には AdCC の病理組織型 (Solid、Tubular、Cribriform) による差は認められなかった。全症例におけるタンパク発現強度の分布は E-cadherin: 陰性 9.5% (2 / 21)、陽性 47.6% (10 / 21)、強陽性 42.9% (9 / 21)、Vimentin: 陰性 9.5% (2 / 21)、陽性 0% (0 / 21)、強陽性 90.5% (19 / 21)、EMT: 陰性 95.2% (20 / 21)、陽性 4.8% (1 / 21) であった。

EMT と臨床的背景因子との関連性について Pearson の  $\chi^2$  検定を用いて検討した (表 3)。臨床的背景因子として年齢、性別、部位、T 分類、リンパ節転移の有無、遠隔転移の有無、病理組織型について検討した。AdCC は症例数が少なく Vimentin 発現に偏りが大きかったために、すべての項目で関連が認められなかった。

表 3. 腺様嚢胞癌患者における EMT と臨床的背景因子との関連

	症例数	E-cadherin <sup>a</sup>				Vimentin <sup>a</sup>				EMT <sup>a</sup>		
		-	+	++	<i>p</i> 値 <sup>b</sup>	-	+	++	<i>p</i> 値 <sup>b</sup>	-	+	<i>p</i> 値 <sup>b</sup>
年齢												
<65	11	2	5	4 <sup>c</sup>	NS	2	0	9 <sup>c</sup>	NS	10	1 <sup>c</sup>	NS
≥65	10	0	5	5		0	0	10		10	0	
性別												
男性	8	2	4	2	NS	1	0	7	NS	7	1	NS
女性	13	0	6	7		1	0	12		13	0	
T 分類												
T1	0	0	0	0	NS	0	0	0	NS	0	0	NS
T2	15	1	8	6		1	0	14		14	1	
T3	1	0	0	1		0	0	1		1	0	
T4	5	1	2	2		1	0	4		5	0	
部位												
口蓋	7	1	3	3	NS	1	0	6	0.011	6	1	NS
上顎歯肉	4	0	3	1		0	0	4		4	0	
下顎歯肉	1	1	0	0		1	0	0		1	0	
舌下腺	9	0	4	5		0	0	9		9	0	
リンパ節転移												
あり	6	1	2	3	NS	0	0	6	NS	5	1	NS
なし	15	1	8	6		2	0	13		15	0	
遠隔転移												
あり	6	2	2	2	NS	1	0	5	NS	5	1	NS
なし	15	0	8	7		1	0	14		15	0	
病理組織型												
cribriform	11	0	6	5	NS	1	0	10	NS	11	0	NS
tubular	3	0	2	1		0	0	3		3	0	
solid	7	2	2	3		1	0	6		6	1	

<sup>a</sup> 免疫組織化学的染色にて検索した。発現強度の評価方法は、「対象および方法」に示した。

<sup>b</sup>  $\chi^2$  検定を行った。有意差ありは、 $p < 0.05$  とした。NS；有意差なし

<sup>c</sup> 症例数を表す。

## 2. Brachyury の発現様式および発現強度と臨床的背景因子との関連

次に AdCC 組織における Brachyury の局在と染色性を検討した。Brachyury の発現強度を「研究材料と方法」に示す方法で、核、細胞質それぞれ強陽性(++)、陽性 (+)、陰性 (-) に分類し、発現様式を Type I -IV に分類した。Brachyury は結合組織、筋組織、リンパ球等の中胚葉系組織に発現し、癌組織一様に核および細胞質に発現していた。全症例における陽性率はそれぞれ、核: 100% (21 / 21)、細胞質: 95.2% (20 / 21) であった。さらに発現様式別に分類すると、Type I : 0% (0 / 21)、Type II : 0% (0 / 21)、Type III : 4.8% (1 / 21)、Type IV : 95.2% (20 / 21) であった。

Brachyury 発現と臨床的背景因子との関連性について Pearson の  $\chi^2$  検定を用いて検討した (表 4)。AdCC においては全症例が Brachyury 陽性であったため、陰性症例と比較が不可能であり、統計学的な検討が出来なかった。

表 4. 腺様嚢胞癌患者における Brachyury 発現<sup>a</sup>と臨床的背景因子との関連.

	症例数	核 <sup>a</sup>				細胞質 <sup>a</sup>				発現様式 <sup>a</sup>				
		-	+	++	<i>p</i> 値 <sup>b</sup>	-	+	++	<i>p</i> 値 <sup>b</sup>	I	II	III	IV	<i>p</i> 値 <sup>b</sup>
年齢														
<65	11	0	0	11 <sup>c</sup>	NS	0	4	7 <sup>c</sup>	NS	0	0	0	11 <sup>c</sup>	0.039
≥65	10	0	1	9		1	2	7		0	0	1	9	
性別														
男性	8	0	0	8	NS	0	3	5	NS	0	0	0	8	NS
女性	13	0	1	12		1	3	9		0	0	1	12	
T分類														
T1	0	0	0	0	NS	0	0	0	NS	0	0	0	0	NS
T2	15	0	1	14		0	4	11		0	0	0	15	
T3	1	0	0	1		0	0	1		0	0	0	1	
T4	5	0	0	5		1	2	2		0	0	1	4	
部位														
口蓋	7	0	0	7	NS	0	2	5	NS	0	0	0	7	NS
上顎歯肉	4	0	0	4		0	1	3		0	0	0	4	
下顎歯肉	1	0	0	1		0	1	0		0	0	0	1	
舌下腺	9	0	1	8		1	2	6		0	0	1	8	
リンパ節転移														
あり	6	0	1	5	NS	1	2	3	NS	0	0	1	5	NS
なし	15	0	0	15		0	4	11		0	0	0	15	
遠隔転移														
あり	6	0	0	6	NS	0	3	3	NS	0	0	0	6	NS
なし	15	0	1	14		1	3	11		0	0	1	14	
病理組織型														
cribriform	11	0	0	11	NS	1	3	7	NS	0	0	1	10	NS
tubular	3	0	0	3		0	1	2		0	0	0	3	
solid	7	0	1	6		0	2	5		0	0	0	7	

<sup>a</sup> 免疫組織化学的染色にて検索した。発現強度の評価方法は、「対象および方法」に示す。

<sup>b</sup>  $\chi^2$ 検定を行った。有意差ありは、 $p < 0.05$ とした。NS；有意差なし

<sup>c</sup> 症例数を表す。

### 3. Brachyury 発現と EMT の関連

Brachyury 発現様式と EMT 関連分子である E-cadherin、Vimentin 発現の関連性について Pearson の  $\chi^2$  検定を用いて検討した (表 5)。AdCC においては全症例が Brachyury 陽性で TypeIII (1 例)、TypeIV (20 例) と分布の偏りが著しく、統計学的な検討は不可能であった。

表 5. 腺様嚢胞癌患者における Brachyury 発現と EMT の関連

Brachyury 発現様式 <sup>a</sup>	E-cadherin <sup>a</sup>				Vimentin <sup>a</sup>				EMT <sup>a</sup>		
	-	+	++	<i>p</i> 値 <sup>b</sup>	-	+	++	<i>p</i> 値 <sup>b</sup>	なし	あり	<i>p</i> 値 <sup>b</sup>
I	0	0	0 <sup>c</sup>		0	0	0 <sup>c</sup>		0	0 <sup>c</sup>	
II	0	0	0	NS	0	0	0	NS	0	0	NS
III	0	0	1		0	0	1		1	0	
IV	2	10	8		2	0	18		19	1	

<sup>a</sup> 免疫組織化学的染色にて検索した。

発現強度の評価方法は、「対象および方法」に示した。

<sup>b</sup>  $\chi^2$  検定を行った。有意差ありは、 $p < 0.05$  とした。NS；有意差なし

<sup>c</sup> 症例数を表す。

#### 4. Brachyury、E-cadherin、Vimentin 発現および EMT と生存率との相関

Kaplan-Meier 法により Brachyury、E-cadherin、Vimentin の発現および EMT と 10 年生存率および 10 年無病生存率の相関を検討した。(図 1, 2)。

Brachyury は全症例が陽性で、生存率との相関を検討できなかった。Vimentin の発現と生存率に相関は認められなかったが、E-cadherin において (-) 群 (2 例: 10 年生存率 0%)、(+) 群 (10 例: 10 年生存率 60%) は (++) 群 (9 例: 10 年生存率 88.9%) と比較し有意に 10 年生存率が低かった (ともに  $p < 0.001$ )。

さらに E-cadherin 陰性かつ Vimentin 陽性を EMT 陽性として EMT と 10 年生存率、10 年無病生存率の相関を検討した。EMT 陰性 (-) 群 (20 例: 10 年生存率 75.0%、無病生存率 60.0%) に比較して EMT 陽性 (+) 群 (1 例: 10 年生存率 0%、無病生存率 0%) で顕著な生存率の低下を認めた (ともに  $p < 0.001$ )。



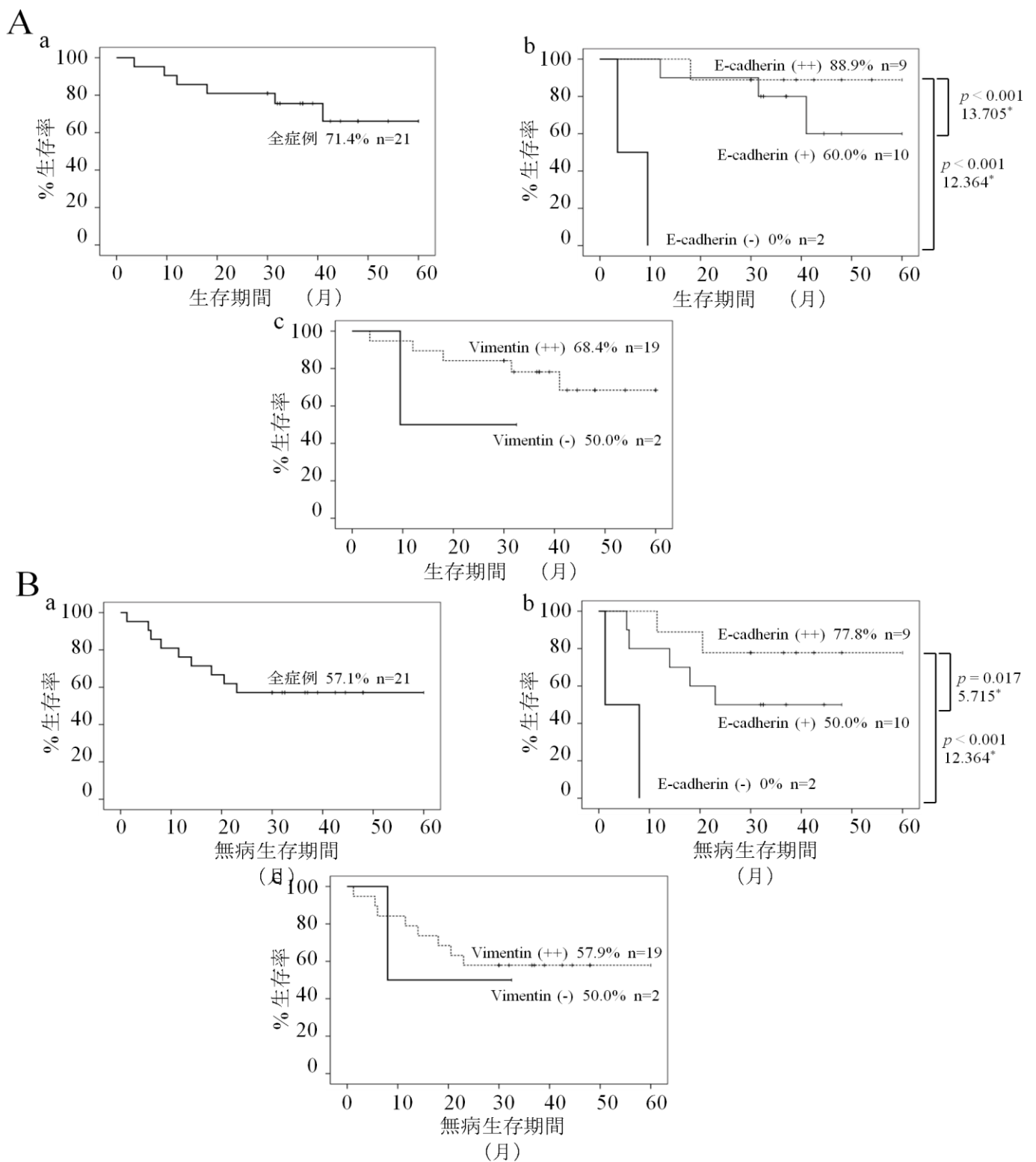


図1. AdCCにおけるE-cadherin、Vimentin発現と生存率との相関

Kaplan-Meier法にてE-cadherin、Vimentin発現と10年生存率の相関を調べた。

染色結果をもとに陰性群、弱陽性群、強陽性群に分類して検討したところ、

E-cadherinの発現と10年生存率、無病生存率に正の相関を認めた。

A: 生存率

B: 無病生存率

a: 全症例

b: E-cadherin

c: Vimentin

\*: Chi-square statistic

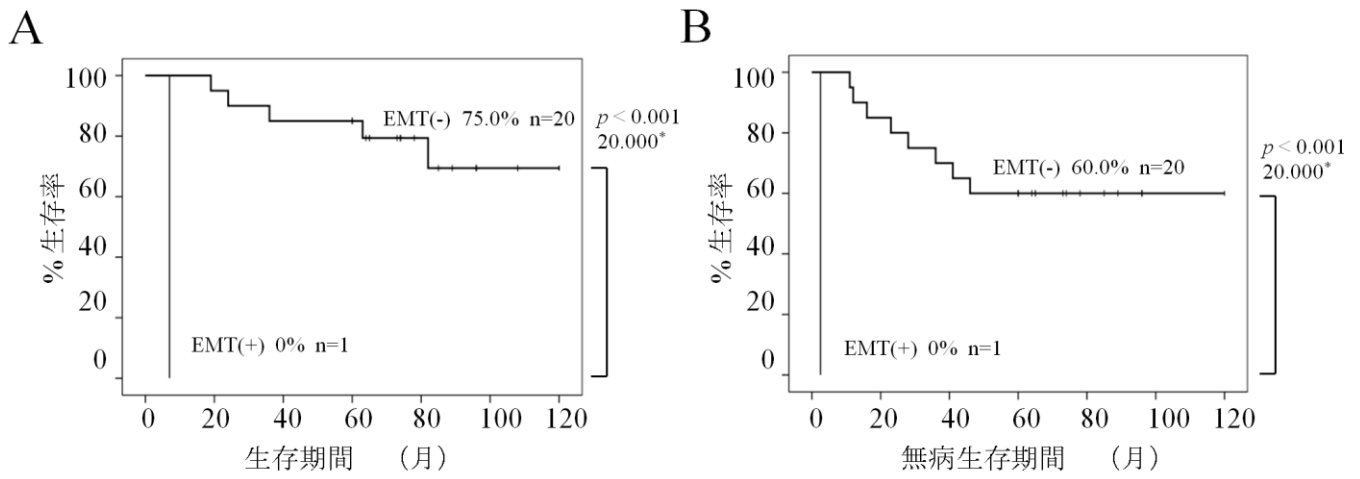


図2. AdCCにおけるEMTと生存率との相関

Kaplan-Meier法にてEMTの有無と10年生存率の相関を調べた。

染色結果をもとに陰性群、陽性群に分類して検討したところ、EMTの有無と10年生存率、無病生存率に負の相関を認めた。

A: 生存率      B: 無病生存率      \*: Chi-square statistic

その 2.

扁平上皮癌における

**Brachyury** 発現と上皮間葉移行の関与

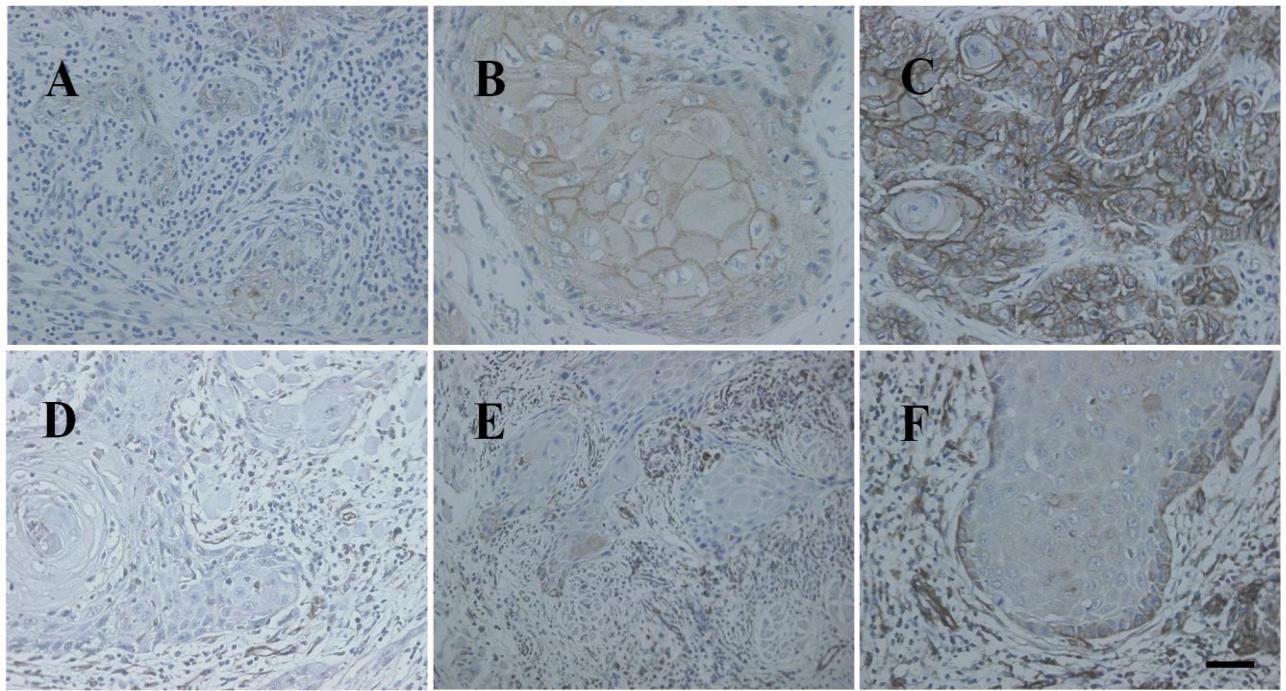
# 結果

## 1. EMT 関連分子の発現と臨床的背景因子との関連

SCC 組織において、EMT 関連分子である E-cadherin および Vimentin の局在と染色性を検討した。E-cadherin と Vimentin の発現強度は「研究材料と方法」に示す方法で、強陽性 (++)、陽性 (+)、陰性 (-) に分類した。E-cadherin は上皮細胞の細胞膜に発現しており、一部の症例で癌巣全体、特に癌巣の外層や腫瘍浸潤先端部において顕著な発現の減少を認めた。Vimentin は間葉系細胞の細胞質に発現しており、一部の症例で癌巣の外層や浸潤先端部において癌細胞の細胞質に発現を認めた。代表的な染色例を示す (図 3)。全症例におけるタンパク発現強度の分布は、E-cadherin: 陰性 31.6% (48/152)、陽性 36.8% (56/152)、強陽性 31.6% (48/152)、Vimentin: 陰性 81.6% (124/152)、陽性 11.2% (17/152)、強陽性 7.2% (11/152)、EMT: 陰性 92.1% (140 / 152)、陽性 7.9% (12 / 152) であった。

EMT と臨床的背景因子との関連性について Pearson の  $\chi^2$  検定を用いて検討した (表 6)。臨床的背景因子として年齢、性別、部位、T 分類、リンパ節転移の有無、遠隔転移の有無、腫瘍の分化度、腫瘍の浸潤様式について検討した。その結果、E-cadherin 発現とリンパ節転移の有無 ( $p = 0.049$ )、遠隔転移の有無

( $p = 0.001$ )、腫瘍の分化度 ( $p = 0.041$ )、Vimentin 発現とリンパ節転移の有無 ( $p = 0.009$ )、遠隔転移の有無 ( $p = 0.002$ )、腫瘍の浸潤様式 ( $p = 0.030$ ) に関連が認められた。また、EMT はリンパ節転移の有無 ( $p = 0.009$ )、遠隔転移の有無 ( $p = 0.001$ ) にも強い関連が認められた。



Bar = 50 $\mu$ m

図3. 扁平上皮癌における E-cadherin、Vimentin 発現 (免疫組織染色,  $\times 400$ )

A、B、C: E-cadherin , D、E、F: Vimentin

A、D: 陰性(-) , B、E: 弱陽性(+) , C、F: 強陽性(++)

E-cadherinは上皮系細胞の細胞膜に発現を認め、癌細胞の一部で発現低下していた。

Vimentinは間葉系細胞および一部の癌細胞の細胞質に発現を認めた。

表 6. 扁平上皮癌患者における EMT と臨床的背景因子との関連

	症例数	E-cadherin <sup>a</sup>				Vimentin <sup>a</sup>				EMT <sup>a</sup>		
		-	+	++	<i>p</i> 値 <sup>b</sup>	-	+	++	<i>p</i> 値 <sup>b</sup>	-	+	<i>p</i> 値 <sup>b</sup>
年齢												
<65	88	30	28	30 <sup>c</sup>	NS	76	8	4 <sup>c</sup>	NS	83	5 <sup>c</sup>	NS
≥65	64	18	28	18		48	9	7		57	7	
性別												
男性	97	29	33	35	NS	78	12	7	NS	90	7	NS
女性	55	19	23	13		46	5	4		50	5	
T 分類												
T1	37	13	13	11	NS	33	3	1	NS	36	1	NS
T2	62	17	25	20		50	8	4		58	4	
T3	29	12	9	8		25	3	1		25	4	
T4	24	6	9	9		16	3	5		21	3	
部位												
頬粘膜	14	7	5	2	NS	10	3	1	0.021	13	1	NS
上顎歯肉	7	2	4	1		3	1	3		5	2	
下顎歯肉	39	10	13	16		34	3	2		36	3	
舌	81	27	26	28		67	10	4		75	6	
口底	11	2	8	1		10	0	1		11	0	
リンパ節転移												
あり	56	24	15	17	0.049	39	9	8	0.009	47	9	0.009
なし	96	24	41	31		85	8	3		93	3	
遠隔転移												
あり	13	10	0	3	0.001	7	2	4	0.002	8	5	0.001
なし	139	38	56	45		117	15	7		132	7	
分化度 <sup>d</sup>												
高分化	132	37	50	45	0.041	107	15	10	NS	123	9	NS
中分化	19	11	6	2		16	2	1		16	3	
低分化	1	0	0	1		1	0	0		1	0	
腫瘍浸潤様式 <sup>e</sup>												
1	2	1	1	0	NS	2	0	0	0.030	2	0	NS
2	37	10	14	13		32	3	2		35	2	
3	82	23	31	28		69	5	8		77	5	
4	31	14	10	7		21	9	1		26	5	

<sup>a</sup> 免疫組織化学的染色にて検索した。発現強度の評価方法は、「対象および方法」に示した。

<sup>b</sup>  $\chi^2$  検定を行った。有意差ありは、 $p < 0.05$  とした。NS；有意差なし

<sup>c</sup> 症例数を表す。

<sup>d</sup> 分化度は、WHO 分類による。

<sup>e</sup> 腫瘍浸潤様式は、Anneroth の分類による。

## 2. Brachyury 発現様式および発現強度と臨床的背景因子との関連

次に SCC 組織における Brachyury の局在と染色性を検討した。Brachyury は発現局在に特徴的な所見を示し、「対象症例と方法」に示す方法で Type I -IV に分類した。その典型像を示す (図 4)。Brachyury は結合組織、筋組織、リンパ球等の中胚葉系組織に発現し、一部症例では癌細胞の核および細胞質に発現が認められた。ほとんどの症例で癌組織全体に一様な発現が認められたが、一部では浸潤先端部でより強い発現が認められた。さらに異型上皮の基底細胞にも一部発現が認められた。全症例における陽性率は 71.0% で、それぞれ核: 59.2% (90/152)、細胞質: 44.1% (67/152) であった。さらに Brachyury 発現様式別に分類すると、Type I : 28.9% (44/152)、Type II : 11.8% (18/152)、Type III : 27.0% (41/152)、Type IV : 32.2% (49/152) であった。

Brachyury 発現と臨床的背景因子との関連性について Pearson の  $\chi^2$  検定を用いて検討した (表 7)。Brachyury の細胞質における発現とリンパ節転移の有無 ( $p = 0.028$ )、腫瘍の浸潤様式 ( $p = 0.022$ )、Brachyury の核における発現と T 分類 ( $p = 0.001$ )、リンパ節転移の有無 ( $p = 0.003$ )、腫瘍の分化度 ( $p = 0.043$ )、腫瘍の浸潤様式 ( $p = 0.024$ ) に関連が認められ、細胞質における発現より核における発現の方が臨床的背景因子と強く関連していた。Brachyury 発現様式別の検討では Brachyury 発現様式は T 分類 ( $p = 0.001$ )、リンパ節転移の有無 ( $p$



= 0.004)、腫瘍の分化度 ( $p = 0.030$ )、腫瘍の浸潤様式 ( $p = 0.006$ ) にさらに強い関連が認められた。

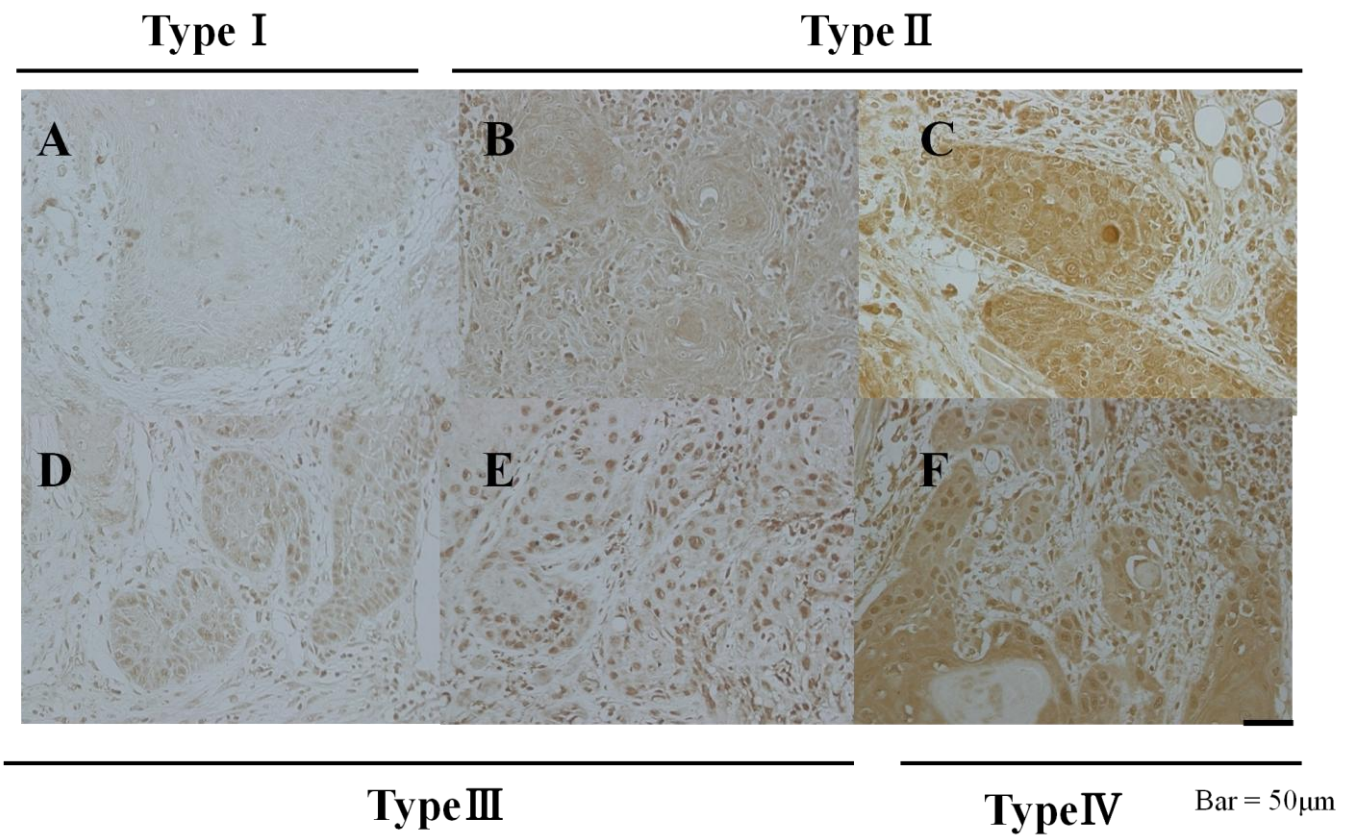


図4. Brachyury発現様式分類（免疫組織染色、×400）

- A: 陰性 (-)
- B: 細胞質 弱陽性(+)
- C: 細胞質 強陽性(++)
- D: 核 弱陽性(+)
- E: 核 強陽性 (++)
- F: 核細胞質 陽性(++)

Brachyuryは中胚葉由来細胞および一部の癌細胞の核と細胞質に発現が認められた。

表 7. 扁平上皮癌患者における Brachyury 発現<sup>a</sup>と臨床的背景因子との関連

	症例数	核 <sup>a</sup>				<i>p</i> 値 <sup>b</sup>	細胞質 <sup>a</sup>				<i>p</i> 値 <sup>b</sup>	発現様式 <sup>a</sup>				<i>p</i> 値 <sup>b</sup>	
		-	+	++			-	+	++			I	II	III	IV		
年齢																	
<65	88	34	23	31 <sup>c</sup>	NS	55	16	17 <sup>c</sup>	NS	29	5	26	28 <sup>c</sup>	0.039			
≥65	64	28	20	16		30	15	19		15	13	15	21				
性別																	
男性	97	36	25	36	NS	47	22	28	0.041	22	14	25	36	NS			
女性	55	26	18	11		38	9	8		22	4	16	13				
T分類																	
T1	37	27	2	8	<	24	4	9	NS	21	6	3	7	0.001			
T2	62	25	23	14		35	11	16		16	9	19	18				
T3	29	5	11	13		15	6	8		4	1	11	13				
T4	24	5	7	12		11	10	3		3	2	8	11				
部位																	
頬粘膜	14	6	5	3	NS	9	1	4	NS	4	2	5	3	NS			
上顎歯肉	7	4	2	1		2	3	2		2	2	0	3				
下顎歯肉	39	11	13	15		20	11	8		6	5	14	14				
舌	81	36	22	23		47	13	21		28	8	19	26				
口底	11	5	1	5		7	3	1		4	1	3	3				
リンパ節転移																	
あり	56	13	22	21	0.003	26	10	20	0.028	7	6	19	24	0.004			
なし	96	49	21	26		59	21	16		37	12	22	25				
遠隔転移																	
あり	13	4	3	6	NS	5	2	6	NS	2	2	3	6	NS			
なし	139	58	40	41		80	29	30		42	16	38	43				
分化度 <sup>d</sup>																	
高分化	132	58	37	37	0.043	74	27	31	NS	43	16	31	42	0.030			
中分化	19	3	6	10		10	5	4		0	2	10	7				
低分化	1	1	0	0		1	0	0		1	0	0	0				
腫瘍浸潤様式 <sup>e</sup>																	
1	2	1	0	1	0.024	2	0	0	0.022	1	0	1	0	0.006			
2	37	21	8	8		20	9	8		14	7	6	10				
3	82	35	25	22		54	13	15		28	7	26	21				
4	31	5	10	16		9	9	13		1	4	8	18				

<sup>a</sup> 免疫組織化学的染色にて検索した。発現強度の評価方法は、「対象および方法」に示した。

<sup>b</sup>  $\chi^2$ 検定を行った。有意差ありは、 $p < 0.05$ とした。NS；有意差なし

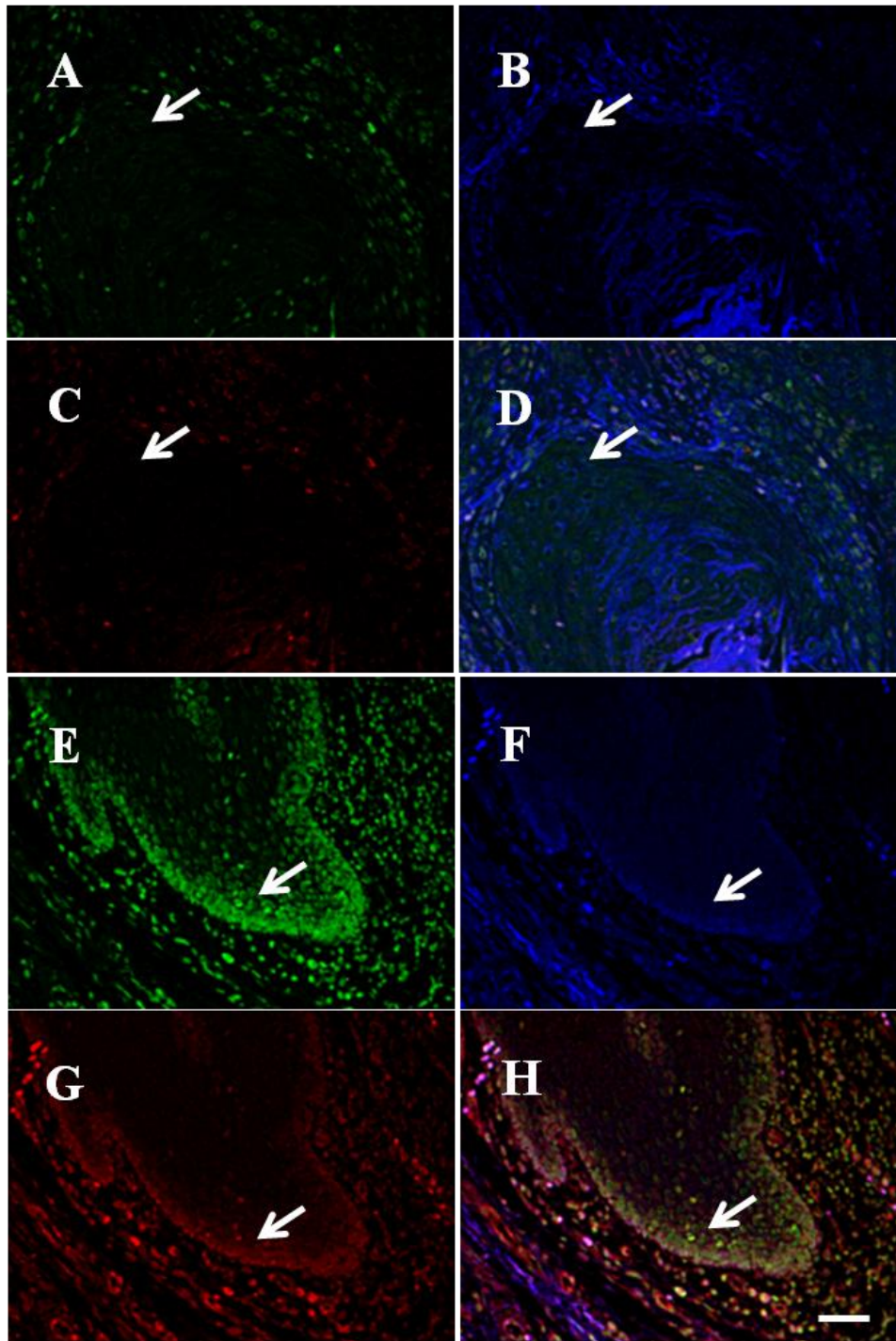
<sup>c</sup> 症例数を表す。

<sup>d</sup> 分化度は、WHO分類による。

<sup>e</sup> 腫瘍浸潤様式は、Annerothの分類による。

### 3. Brachyury と EMT 関連分子の局在

Brachyury、E-cadherin、Vimentin の関連を詳細に検討するため、蛍光三重染色による検討を行った (図 5)。A-D に示す EMT 陰性 SCC では、Brachyury 陰性細胞には強い E-cadherin 発現が認められ、Vimentin の発現は認められなかった (図 5A-D 矢頭)。一方、E-H に示す EMT 陽性 SCC では、特に浸潤先端部において EMT が認められ、Brachyury 陽性細胞には E-cadherin の発現低下と Vimentin の発現が同部位に認められた (図 5E-H 矢頭)。



Bar = 50 $\mu$ m

図5. 扁平上皮癌におけるBrachyury、E-cadherin、Vimentinの局在(蛍光三重染色、 $\times 400$ )

Brachyury: 緑 E-cadherin: 青 Vimentin: 赤

A-D: EMT陰性、Brachyury陰性扁平上皮癌

E-H: EMT陽性、Brachyury陽性扁平上皮癌

A、E: Brachyury B、F: E-cadherin C、G: Vimentin E、H: 重ね合わせ像

#### 4. Brachyury 発現と EMT の関連

Brachyury 発現様式と EMT 関連分子である E-cadherin と Vimentin 発現の関連性について Pearson の  $\chi^2$  検定を用いて検討した (表 8)。その結果 Brachyury 発現様式と Vimentin 発現は関連が認められ ( $p = 0.002$ )、特に Type IV と Vimentin 発現が強く関連していた。また、Brachyury 発現様式と EMT にも強い関連が認められた ( $p = 0.035$ )。一方、Brachyury 発現様式と E-cadherin 発現には関連が認められなかった。

表 8. 扁平上皮癌患者における Brachyury 発現と EMT の関連

Brachyury 発現様式 <sup>a</sup>	E-cadherin <sup>a</sup>				Vimentin <sup>a</sup>				EMT <sup>a</sup>		
	-	+	++	$p$ 値 <sup>b</sup>	-	+	++	$p$ 値 <sup>b</sup>	なし	あり	$p$ 値 <sup>b</sup>
I	14	16	14 <sup>c</sup>		42	1	1 <sup>c</sup>		43	1 <sup>c</sup>	
II	4	8	6	NS	11	4	3	0.002	16	2	0.035
III	15	18	8		38	2	1		40	1	
IV	15	14	20		33	10	6		41	8	

<sup>a</sup> 免疫組織化学的染色にて検索した。

発現強度の評価方法は、「対象および方法」に示した。

<sup>b</sup>  $\chi^2$  検定を行った。有意差ありは、 $p < 0.05$  とした。NS；有意差なし

<sup>c</sup> 症例数を表す。

## 5. Brachyury、E-cadherin、Vimentin 発現および EMT と転移の相関

検索した分子のうち、どれが最もリンパ節転移や遠隔転移と相関するかロジスティック回帰分析を用いて検索した (表 9)。単変量解析において、リンパ節転移は EMT、Brachyury および Vimentin 発現と正の相関、E-cadherin 発現と負の相関が認められた (オッズ比 5.936, 4.390, 3.368, 0.444)。遠隔転移と EMT、Vimentin 発現に正の相関、E-cadherin 発現に負の相関が認められたが (オッズ比 11.768, 4.558, 0.113)、遠隔転移と Brachyury 発現には相関を認めなかった。多変量解析において、リンパ節転移は Brachyury 発現 (オッズ比 3.952) と正の相関、遠隔転移は E-cadherin 発現 (オッズ比 0.141) と負の相関を認めた。リンパ節転移においては Brachyury 発現 (オッズ比 4,390, 3.952) が最も影響が強く、遠隔転移においては E-cadherin 発現 (オッズ比 0.113, 0.141) が最も影響が強かった。

表 9. ロジスティック回帰分析による

Brachyury, E-cadherin, Vimentin および EMT と転移の関連

			単変量解析			多変量解析		
			オッズ比	<i>p</i> 値	95% CI	オッズ比	<i>p</i> 値	95% CI
リンパ節転移	Brachyury	陰性 vs. 陽性	4.390	0.001	1.799 – 10.714	3.952	0.040	1.563 – 9.988
	E-cadherin	陰性 vs. 陽性	0.444	0.024	0.220 – 0.897	0.478	0.089	0.204 – 1.120
	Vimentin	陰性 vs. 陽性	3.368	0.005	1.443 – 7.864	2.020	0.215	0.665 – 6.131
	EMT	陰性 vs. 陽性	5.936	0.010	1.534 – 22.965	1.533	0.653	0.238 – 9.890
遠隔転移	Brachyury	陰性 vs. 陽性	2.381	0.272	0.506 – 11.215	1.836	0.475	0.347 – 9.713
	E-cadherin	陰性 vs. 陽性	0.113	0.001	0.029 – 0.432	0.141	0.023	0.026 – 0.766
	Vimentin	陰性 vs. 陽性	4.558	0.012	1.398 – 14.860	2.506	0.468	0.210 – 29.969
	EMT	陰性 vs. 陽性	11.786	<0.001	3.051 – 45.527	1.533	0.771	0.086 – 27.307



## 6. Brachyury、E-cadherin、Vimentin 発現および EMT と生存率の相関

検索した分子のうちどれが患者の予後と相関するかを検討するため、Kaplan-Meier 法により Brachyury、E-cadherin、Vimentin 発現および EMT と 5 年生存率、5 年無病生存率との相関を検討した (図 6, 7)。

5 年生存率において、Brachyury 陽性群 (80.6%) は Brachyury 陰性群 (100%) より有意に生存率が低かった ( $p = 0.002$ )。E-cadherin 陰性 (-) 群 (75.0%) は E-cadherin 陽性 (+) 群 (91.1%) および強陽性 (++) 群 (91.7%) に比較して有意に生存率が低かった ( $p = 0.032$ ,  $p = 0.027$ )。Vimentin 強陽性 (++) 群 (54.5%) は Vimentin 陰性 (-) 群 (90.3%) に比較して有意に生存率が低かった ( $p < 0.001$ ) (図 6)。さらに EMT、Brachyury 発現および EMT と 5 年生存率、5 年無病生存率の相関を検討した (図 7)。EMT 陰性 (-) 群 (5 年生存率 90.0%、無病生存率 72.1%) に比較して EMT 陽性 (+) 群 (5 年生存率 41.7%、無病生存率 25.0%) で顕著な生存率の低下を認めた (ともに  $p < 0.001$ )。また、Brachyury 陽性 (+) かつ EMT 陽性 (+) 群 (5 年生存率 36.2%、無病生存率 27.3%) は、Brachyury 陰性 (-) かつ EMT 陰性 (-) 群 (5 年生存率 100%、無病生存率 88.4%) に比較して生存率が有意に低かった (ともに  $p < 0.001$ )。

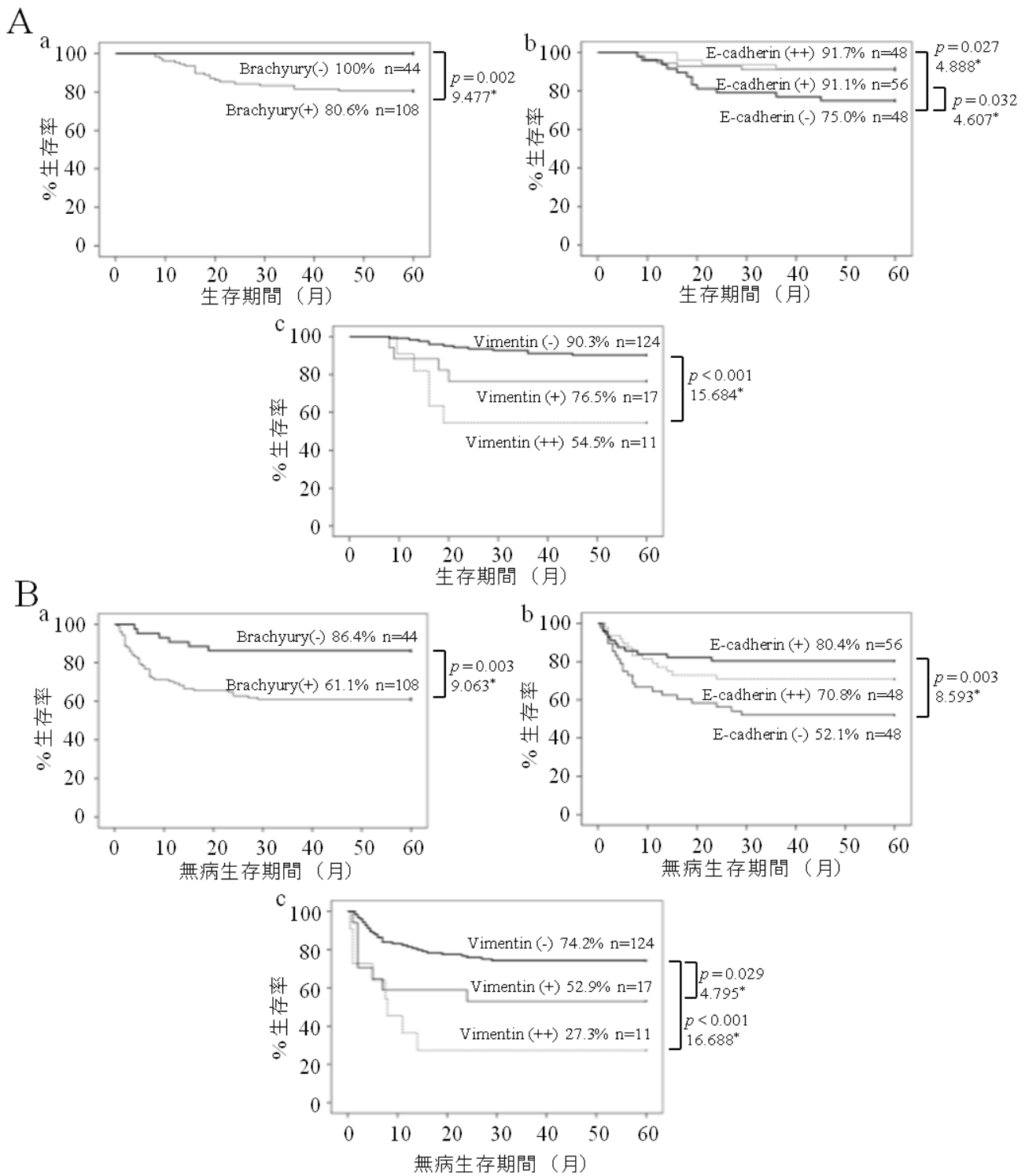


図6. SCCにおけるBrachyury、E-cadherin、Vimentin発現と生存率との相関

Kaplan-Meier法にてBrachyury、E-cadherin、Vimentin発現と5年生存率の相関を調べた。

染色結果をもとに陰性群、弱陽性群、強陽性群に分類して検討したところ、すべてのタンパク質発現と5年生存率、無病生存率に相関を認めた。

A: 生存率 B: 無病生存率

a: Brachyury b: E-cadherin c: Vimentin \*: Chi-square statistic

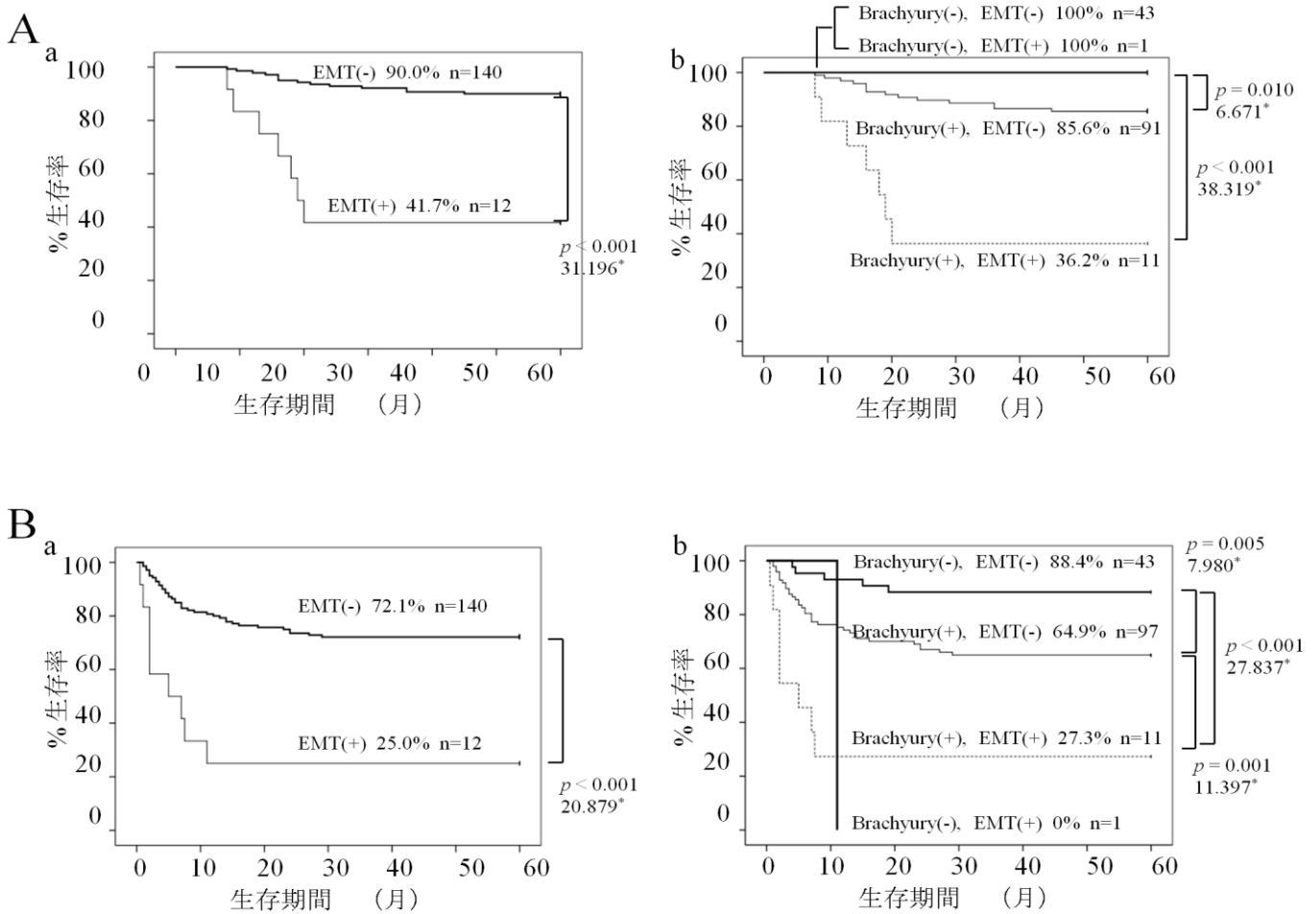


図7. SCCにおけるBrachyury発現、EMTと生存率との相関

Kaplan-Meier法にてBrachyury発現、EMTの有無と5年生存率の相関を調べた。

染色結果をもとに陰性群、陽性群に分類して検討したところ、EMTの有無、Brachyury発現およびEMTの有無と10年生存率、無病生存率に負の相関を認めた。

A: 生存率

B: 無病生存率

a: EMTの有無

b: Brachyuryの発現およびEMTの有無

\*: Chi-square statistic

## 考察

癌の浸潤転移は治療を困難にし、予後を決定する重要な悪性形質である。そのため癌の浸潤転移機構を明らかにし、これを制御する治療法の開発が重要である。また、癌の再発や転移を早期から予測しその対策にあたることも治療成績向上のために重要である。

癌の臨床的予後因子はさまざまな癌種で報告されており、特に近年では上皮間葉移行（EMT）と癌の浸潤転移の関与を示す報告が増加している[ 28,29 ]。EMT はさまざまな因子が複雑に関連して引き起こされる現象であり、単一のタンパクや遺伝子変化ではない[ 30,31 ]。この観点より癌組織における EMT 現象の有無から、これまでの単一因子による予後予測よりもさらに正確な予後予測が可能ではないかと考えた。本研究において E-cadherin の発現低下と Vimentin の発現を EMT と定義し、EMT の有無と臨床的背景因子との相関を検討したところ、SCC におけるリンパ節転移の有無および遠隔転移の有無に強い関連が認められた（表 6）。興味深いことに遠隔転移において E-cadherin 発現より Vimentin 発現の方が強く関連していた。E-cadherin の消失によって細胞間接着が減弱し、原発巣から癌細胞の離脱が可能となる。そのため E-cadherin の発現低下は EMT の特質であると考えられている[ 32 ]。腫瘍の浸潤様式、サテライ

ト腫瘍細胞形成、サテライト腫瘍細胞の大きさと E-cadherin 発現はよく相関し、この考えを裏付けるものである[ 13 ]。一方、癌細胞における Vimentin 発現と腫瘍増殖能、浸潤能、予後との関連や[ 33,6 ]、口腔領域では SCC における Vimentin 発現とサテライト腫瘍細胞距離との関連が報告されている[ 13 ]。Vimentin 発現によりチロシンキナーゼ発現が亢進し、細胞の遊走が引き起こされるとの報告もあり[ 34 ]、これらが Vimentin 発現と遠隔転移の有無との関連の説明となり得る。

癌組織において EMT が誘導されるメカニズムは未だ解明されていない。Brachyury 遺伝子は T-box とよばれる DNA 結合ドメインを持つ転写制御因子をコードし、脊椎動物の脊索の分化や後方中胚葉の形成に重要な役割を担うものとして知られているが、近年 Brachyury 遺伝子が癌細胞株において上皮から間葉への移行を促進し、癌細胞の浸潤能と転移能を増強する可能性が報告された[ 24 ]。癌細胞に Brachyury を遺伝子導入すると、間葉系マーカーの発現増強と上皮系マーカーの発現低下に代表される EMT 形質が誘導され、さらに増殖能と浸潤能が増強する。本研究でも Brachyury 陽性細胞において E-cadherin 発現減少と Vimentin 発現が同時に観察され、この報告と一致した(図 5)。過去の報告と本研究結果から、Brachyury は EMT を制御し臨床的予後と相関があると仮説を立て、Brachyury 発現と臨床的背景因子との相関の検索を行った。

その結果、SCCにおいて Brachyury 発現と T 分類、リンパ節転移、遠隔転移、腫瘍の分化度、腫瘍の浸潤様式と関連が認められた (表 7)。また Brachyury 発現強度のみでなく、その局在も臨床的背景因子と強く関連していることが明らかになった。Brachyury は転写因子のひとつであるが、転写因子は細胞質内で翻訳され核に移行することで細胞シグナルとして作用する。このため、Brachyury の核への局在移行が悪性形質に強く関連したと考えられる。これは Brachyury 発現様式と Vimentin 発現や EMT が強く関連していることにも一致する (表 8)。Brachyury 発現様式 Type I (陰性) 症例と Type II (細胞質陽性) 症例の比較を行ったところ、腫瘍の浸潤様式の検討のみ統計学的な有意差が認められた。その理由として、転写されたタンパクのうち微量が核内移行し作用していたこと、核内の Brachyury が作用し代謝された後で検出できなかったことが考えられた。また、SCCにおける EMT と Brachyury 発現はリンパ節転移の有無と強く関連していた (表 6, 7)。このことより、Brachyury は EMT の制御因子であり、さらに EMT は癌の悪性形質の中心的な要因であるといえる。実際、図 5 に示す様に腫瘍浸潤先端部の Brachyury 陽性細胞では E-cadherin の発現低下と Vimentin の発現が認められており、この結果は Brachyury が EMT を制御することを示唆する。しかし、統計学的な検討では Brachyury 発現と Vimentin 発現の関連は認められたが、図 5 の結果や他の報告から予測していた、

Brachyury 発現と E-cadherin 発現の関連は認められなかった。その理由として、今回の検討は連続切片を用いた免疫組織化学的染色を行い、各タンパクの発現をランダムに選択した細胞で評価しており、同一細胞で発現を評価していないこと、また、Vimentin の評価は発現強度ではなく陽性細胞数を用いて評価しており、評価基準も異なる。同一の細胞に対するこれらのタンパクの発現を検討すれば因果関係がより明らかになった可能性があると考ええる。

EMT とは別に、癌組織の中には癌幹細胞 (CSC) と呼ばれる自己複製能をもつ幹細胞様細胞が存在していることが証明された。CSC は癌細胞の中に少数含まれる自己複製能をもつ細胞集団のことであり、“tumor-initiating cells” とも呼ばれる [ 35 ]。EMT により播種された癌細胞から転移巣を形成するには、その癌細胞が幹細胞と同様の自己複製能を持つ必要があるが、EMT により播種された癌細胞は EMT と同時に自己複製能を獲得するとも考えられる [ 36 ]。この考えを支持するように、近年 EMT と CSC の関連を示す報告が急増している [ 24,37,38,39,40 ]。また、舌 SCC において、SOX (SRY-related high mobility group box) ファミリーの一つである SOX2 発現が予後不良因子であることが報告された [ 41 ]。SOX2 は胚における幹細胞の多分化能維持に関与していると言われており、さらに CSC 形質の維持にも関与していると考えられている [ 42 ]。Brachyury は SOX2 と同様に胚分化に必須の遺伝子であり、初期胚や癌組織に

において EMT を誘導する [ 43 ]。これら Brachyury と SOX2 の機能の類似性より、Brachyury も CSC 形質の維持に関与していると考えられ、実際に直腸癌において Brachyury が CSC 形質を制御すると報告もされている [ 44 ]。これによると Brachyury が間葉様癌細胞において Nanog 遺伝子を制御し、癌細胞は一時的に浸潤転移を促進するシグナルに反応できるようになると言われている。当分野において、低分子ヘアピン型 RNA を用いて CSC 細胞株の Brachyury をノックダウンしたところ、EMT 形質、造腫瘍性およびスフェア形成能に代表される CSC 形質が完全に消失した。癌幹細胞は in vitro において放射線および化学療法に抵抗性があることが証明されているため [ 39, 45 ]、Brachyury が幹細胞形質を直接制御しているならば Brachyury 発現から放射線および化学療法の効果を予測し得る。さらに CSC をターゲットとした分子標的治療や遺伝子治療にも Brachyury を利用できる可能性がある。本研究では Brachyury と EMT の関連についての検索を行ったが、Brachyury 発現のみで EMT が認められない群にも生存率低下に影響が認められることから、EMT 以外の癌幹細胞特性も何らかの関与をしていると考えられ、Brachyury と CSC の分子相互作用をさらに詳細に検索する必要がある。

本研究では、AdCC および SCC の生検組織を用いた検討を行ったが、AdCC においては症例数が少なく統計学的な解析が困難であった。今後、AdCC の症



例数を増やして詳しく検討する必要がある。また、SCCと比較したAdCCにおけるBrachyury陽性率（100%）およびVimentin陽性率（90.5%）の顕著な高さは、AdCCが元来持つ浸潤転移能の高さを示す可能性があると考え、それ以外の癌種についても比較検討することが、EMTおよびBrachyuryと臨床的背景因子との相関のさらなる理解につながると考える。

# 総括

本研究は口腔癌組織における Brachyury 発現と EMT の関連性について臨床材料を用いて明らかにし、予後予測へ応用し得るかを検討したものである。

(1) Brachyury 発現様式と EMT に関連を認めた。さらに蛍光三重染色において Brachyury 発現と EMT が同部位に観察され、*in vitro* で示した Brachyury と EMT との関連が生体において確認された。

(2) SCC において Brachyury、E-cadherin、Vimentin 発現と臨床的背景因子に強い相関を認めた。特に Brachyury 発現はリンパ節転移、E-cadherin 発現は遠隔転移に強く影響していることが確認された。

(3) Brachyury、E-cadherin、Vimentin の発現は生存率と強く相関した。特に EMT 陽性で生存率が顕著に低下することが確認された。

(4) AdCC 組織は SCC 組織と比較して Brachyury および Vimentin 陽性率が顕著に高かった。これは AdCC が元来持つ浸潤転移能の高さを示す可能性が考えられた。

以上より、口腔癌組織における Brachyury と EMT の関連が示され、Brachyury および EMT は予後因子として臨床応用可能であることが示唆された。

# 謝辞

稿を終えるにあたり、御校閲を頂きました 森 悦秀 教授に謝意を表します。また、本研究の課題を与え、実験方法や研究に対する姿勢など、直接指導頂きました 杉浦 剛 講師に深謝致します。また、本研究を遂行するにあたり、実験手技等の御指導、御助言頂きました 小林 家吉 准教授に深く感謝致します。そして、様々な御助言や励ましのお言葉を頂いた、九州大学大学院歯学研究院 口腔顎顔面病態学講座 口腔顎顔面外科学分野の教官各位、研究室の皆様、研究生活を支えてくださった全ての皆様方に、心から深く感謝致します。

## 引用文献

1. Ampil FL, Misra RP. Factors influencing survival of patients with adenoid cystic carcinoma of the salivary glands. *J Oral Maxillofac Surg.* 1987 Dec;45(12):1005-10.
2. Rapidis AD, Givalos N, Gakiopoulou H, Faratzis G, Stavrianos SD, Vilos GA, Douzinas EE, Patsouris E. Adenoid cystic carcinoma of the head and neck. clinicopathological analysis of 23 patients and review of the literature. *Oral Oncol.* 2005 Mar;41(3):328-35.
3. Leon B, John WE, Peter R, David S, et al: Pathology & Genetics Head and Neck Tumours. 2005, 9:221-222.
4. Acloque H, Adams MS, Fishwick K, Bronner-Fraser M, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. *J Clin Invest.* 2009;119:1438–1449.
5. Kalluri R. EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. *J Clin Invest.* 2009;119:1417–1419.
6. Otsuki S, Inokuchi M, Enjoji M, et al. Vimentin expression is associated with decreased survival in gastric cancer. *Oncol Rep.* 2011;25:1235–1242.
7. Kevans D, Wang LM, Sheahan K, et al. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) protein expression in a cohort of stage II colorectal cancer patients with characterized tumor budding and mismatch repair protein status. *Int J Surg Pathol.* In press.
8. Soini Y, Tuhkanen H, Sironen R, et al. Transcription factors zeb1, twist and snail in breast carcinoma. *BMC Cancer.* 2011;11:73.

9. van Nes JG, de Kruijf EM, Putter H, et al. Co-expression of SNAIL and TWIST determines prognosis in estrogen receptor-positive early breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*. In press.
10. Sasaki K, Natsugoe S, Ishigami S, et al. Significance of Twist expression and its association with E-cadherin in esophageal squamous cell carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res*. 2009;28:158.
11. Nakashima H, Hashimoto N, Aoyama D, et al. Involvement of the transcription factor twist in phenotype alteration through epithelial-mesenchymal transition in lung cancer cells. *Mol Carcinog*. In press.
12. Yoshida S, Furukawa N, Haruta S, et al. Expression profiles of genes involved in poor prognosis of epithelial ovarian carcinoma: a review. *Int J Gynecol Cancer*. 2009;19:992–997.
13. Yang TL, Wu CT, Ko JY, Wang CP, Lou PJ, Chang YL. Significance of tumor satellite variables in reflecting the epithelial-mesenchymal transition of tongue cancer. *Oral Oncol*. 2011;47:720–724.
14. Wang C, Liu X, Huang H, et al. Deregulation of Snai2 is associated with metastasis and poor prognosis in tongue squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*. In press.
15. Sakamoto K, Imanishi Y, Tomita T, et al. Overexpression of SIP1 and downregulation of E-cadherin predict delayed neck metastasis in stage I/II oral tongue squamous cell carcinoma after partial glossectomy. *Ann Surg Oncol*. In press.
16. Dang H, Ding W, Emerson D, Rountree CB. Snail1 induces

- epithelial-to-mesenchymal transition and tumor initiating stem cell characteristics. *BMC Cancer*. 2011;11:396.
17. Kojc N, Zidar N, Gale N, et al. Transcription factors Snail, Slug, Twist, and SIP1 in spindle cell carcinoma of the head and neck. *Virchows Arch*. 2009;454:549–555.
  18. Taube JH, Herschkowitz JI, Komurov K, et al. Core epithelial-to-mesenchymal transition interactome gene-expression signature is associated with claudin-low and metaplastic breast cancer subtypes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;107:15449–15454.
  19. Yang MH, Hsu DS, Wang HW, et al. Bmi1 is essential in Twist1-induced epithelial-mesenchymal transition. *Nat Cell Biol*. 2011;12:982–992.
  20. Karreth F, Tuveson DA. Twist induces an epithelial-mesenchymal transition to facilitate tumor metastasis. *Cancer Biol Ther*. 2004;3:1058–1059.
  21. Kispert A, Herrmann BG, Leptin M, Reuter R. Homologs of the mouse Brachyury gene are involved in the specification of posterior terminal structures in *Drosophila*, *Tribolium*, and *Locusta*. *Genes Dev*. 1994;8:2137–2150.
  22. Behr R, Heneweer C, Viebahn C, Denker HW, Thie M. Epithelial-mesenchymal transition in colonies of rhesus monkey embryonic stem cells: a model for processes involved in gastrulation. *Stem Cells*. 2005;23:805–816.
  23. Vidricaire G, Jardine K, McBurney MW. Expression of the Brachyury gene during mesoderm development in differentiating embryonal

- carcinoma cell cultures. *Development*. 1994;120:115–122.
24. Fernando RI, Litzinger M, Trono P, Hamilton DH, Schlom J, Palena C. The T-box transcription factor Brachyury promotes epithelial-mesenchymal transition in human tumor cells. *J Clin Invest*. 2010;120:533–544.
  25. UICC. *TNM Classification of Malignant Tumours*. (7<sup>th</sup> ed.). New York: Wiley-Liss, 2009.
  26. b. Kramer, I.R.H., Pindborg, J.J., et al.: The World Health Organization histological typing of odontogenic tumours. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 29B:169-171, 1993.
  27. Anneroth G, Batsakis J, Luna M. Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinomas. *Scand J Dent Res*. 1987;95:229–249.
  28. Katoh M. Epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer (Review). *Int J Oncol*. 2005;27:1677–1683.
  29. Voulgari A, Pintzas A. Epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis: mechanisms, markers and strategies to overcome drug resistance in the clinic. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1796:75–90.
  30. Yilmaz M, Christofori G. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev*. 2009;28:15–33.
  31. Schmalhofer O, Brabletz S, Brabletz T. E-cadherin, beta-catenin, and ZEB1 in malignant progression of cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2009;28:151–166.
  32. Giehl K, Menke A. Microenvironmental regulation of

- E-cadherin-mediated adherens junctions. *Front Biosci.* 2008;13:3975–3985.
33. Satelli A, Li S. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cell Mol Life Sci.* 2011;68:3033–3046.
34. Vuoriluoto K, Haugen H, Kiviluoto S, et al. Vimentin regulates EMT induction by Slug and oncogenic H-Ras and migration by governing Axl expression in breast cancer. *Oncogene.* 2011;30:1436–1448.
35. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature.* 2001;414:105–111.
36. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. *Curr Opin Cell Biol.* 2003;15:740–746.
37. Mani SA, Guo W, Liao MJ, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell.* 2008;133:704–715.
38. Berry NB, Bapat SA. Ovarian cancer plasticity and epigenomics in the acquisition of a stem-like phenotype. *J Ovarian Res.* 2008;1:8.
39. Ahmed N, Abubaker K, Findlay J, Quinn M. Epithelial mesenchymal transition and cancer stem cell-like phenotypes facilitate chemoresistance in recurrent ovarian cancer. *Curr Cancer Drug Targets.* 2010;10:268–278.
40. Blick T, Hugo H, Widodo E, et al. Epithelial mesenchymal transition traits in human breast cancer cell lines parallel the CD44(hi)/CD24 (lo/-) stem cell phenotype in human breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2010;15:235–252.
41. Du L, Yang Y, Xiao X, et al. Sox2 nuclear expression is closely associated



- with poor prognosis in patients with histologically node-negative oral tongue squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2011;47:709–713.
42. Episkopou V. SOX2 functions in adult neural stem cells. *Trends Neurosci.* 2005;28:219–221.
43. Fernando RI, Castillo MD, Litzinger M, Hamilton DH, Palena C. IL-8 signaling plays a critical role in the epithelial-mesenchymal transition of human carcinoma cells. *Cancer Res.* 2011;71:5296–5306.
44. Sarkar D, Shields B, Davies ML, Muller J, J AW. BRACHYURY confers cancer stem cell characteristics on colorectal cancer cells. *Int J Cancer.* In press.
45. Alison MR, Lim SM, Nicholson LJ. Cancer stem cells: problems for therapy? *J Pathol.* 2011;223:147–161.