

口腔扁平上皮癌におけるcytokeratin 19の発現と機能に関する研究 : Δ Np63との関わりについて

田中, 翔一

<https://doi.org/10.15017/4060091>

出版情報 : Kyushu University, 2019, 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 cytokeratin 19 の
発現と機能に関する研究
～ Δ Np63 との関わりについて～

A study on the expression and function of cytokeratin 19
in oral squamous cell carcinoma
～the association with Δ Np63～

2020年3月

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

田中 翔一

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

本研究の一部は以下の学術雑誌に掲載された。

Cytokeratin 19 as a biomarker of highly invasive oral squamous cell carcinoma with metastatic potential

Shoichi Tanaka, Shintaro Kawano, Taichi Hattori, Ryota Matsubara, Taiki Sakamoto, Yuma Hashiguchi, Naoki Kaneko, Yurie Mikami, Masahiko Morioka, Yasuyuki Maruse, Ryoji Kitamura, Eiki Hamada, Megumi Hiwatashi, Kazunari Oobu, Tamotsu Kiyoshima, and Seiji Nakamura

Accepted to Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology

略 語 一 覧

- cDNA:** complementary deoxyribonucleic acid (相補的デオキシリボ核酸)
- CK:** cytokeratin (サイトケラチン)
- CI:** confidence interval (信頼区間)
- CYFRA:** CK19 fragment
- DAB:** 3,3'-diaminobenzidine (3,3'-ジアミノベンジジン)
- DEPC:** diethyl pyrocarbonate (ジエチルピロカーボネート)
- DMEM:** Dulbecco's modified Eagle's medium
- DNA:** deoxyribonucleic acid (デオキシリボ核酸)
- dNTP:** deoxyribonucleotide triphosphate (デオキシリボヌクレオチド三リン酸)
- DOI:** depth of invasion (腫瘍深達度)
- EMT:** epithelial-mesenchymal transition (上皮-間葉転換)
- FBS:** fetal bovine serum (ウシ胎児血清)
- GAPDH:** glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
- H₂O₂:** hydrogen peroxide (過酸化水素水)
- HE:** hematoxylin and eosin (ヘマトキシリン-エオジン)
- HRP:** horseradish peroxidase (西洋わさびペルオキシダーゼ)
- Ig:** immunoglobulin (免疫グロブリン)
- LI:** labeling index (標識指数)
- MMP:** matrix metalloproteinase (マトリックスメタロプロテアーゼ)

mRNA: messenger ribonucleic acid (伝令リボ核酸)

N.S.: not significant (有意差なし)

NSCLC: non-small cell lung cancer (非小細胞肺癌)

OR: odds ratio (オッズ比)

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

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

PCR: polymerase chain reaction (ポリメラーゼ連鎖反応)

PFA: paraformaldehyde (パラホルムアルデヒド)

P/S: penicillin/streptomycin (ペニシリン/ストレプトマイシン)

RAC : RAS-related C3 botulinus toxin substrate

RNA: ribonucleic acid (リボ核酸)

ROC: receiver operating characteristic curve (受信者動作特性曲線)

Ror: receptor tyrosine kinase-like orphan receptor

RT-PCR: reverse transcription polymerase chain reaction (逆転写ポリメラーゼ連鎖反応)

siRNA: small interfering RNA

TAD: transactivation domain (転写活性領域)

UICC: Union for International Cancer Control

ZEB: zinc-finger E-box binding homeobox

目 次

| | |
|---|----|
| 要旨 | 7 |
| 緒言 | 10 |
| 研究 1. OSCC生検組織におけるCK19の発現と病理組織学的所見との関連 | |
| 対象および方法 | 15 |
| 結果 | 20 |
| 1-1. OSCC原発巣におけるCK19の発現様式 | |
| 1-2. OSCC原発巣におけるCK19の発現と臨床病理組織学的所見との関連 | |
| 1-3. OSCC頸部リンパ節転移巣におけるCK19の発現 | |
| 1-4. OSCC原発巣におけるCK19の発現と予後との関連 | |
| 研究 2. OSCCにおけるCK19および Δ Np63の発現と機能に関する検討 | |
| 材料および方法 | 30 |
| 結果 | 37 |
| 2-1. OSCC 生検組織における CK19 と Δ Np63 の発現 | |
| 2-2. OSCC 細胞株における CK19 と Δ Np63 の発現 | |
| 2-3. OSCC 細胞における CK19 タンパクの発現 | |
| 2-4. OSCC 細胞における Δ Np63 ノックダウンが CK19 の発現に与える影響 | |
| 2-5. CK19 ノックダウンが OSCC 細胞の遊走・浸潤能に与える影響 | |
| 考察 | 46 |
| 謝辞 | 52 |

要 旨

口腔扁平上皮癌 (oral squamous cell carcinoma: OSCC) は、口腔粘膜由来の悪性腫瘍であり、口腔がんの約 90%を占める。OSCC 患者では、しばしば頸部リンパ節転移が認められ、転移症例の生存率は非転移症例と比較して有意に低下することから、転移をいかに制御するかが極めて重要である。そこでわれわれは、転移の最初のプロセスである癌の浸潤に焦点をあてて研究を行ってきた。その結果、癌抑制遺伝子 p53 のホモログである Δ Np63 の発現減弱により上皮-間葉転換が誘導され、OSCC の浸潤能が促進することを示した。しかしながら、 Δ Np63 がいかにして OSCC の浸潤能を制御しているのかは不明であった。本研究では、様々な癌腫で浸潤との関連が報告されている cytokeratin (CK) 19 に着目し、OSCC での発現や癌の浸潤における Δ Np63 と CK19 との関わりについて検討を行なった。

1. OSCC 生検組織における CK19 の発現と病理組織学的所見との関連

OSCC 患者 100 名 (男性: 60 名、女性: 40 名) の生検組織を用いて、CK19 の発現を免疫組織化学的に検索した。CK19 の発現は OSCC 浸潤先端部で強かったが、その陽性率 (labeling index: LI) は症例によって大きく異なっていた。そこで、受信者動作特性曲線より算出したカットオフ値 (5%と 77%) に基づいて、A 群 (LI <5%)、B 群 (5% \leq LI <77%)、C 群 (LI \geq 77%) の 3 群に分類し、病理組織学的所見との関連について検討した。その結果、C 群では組

織学的悪性度の高い症例が多く、頸部リンパ節転移の発生頻度が有意に高かった。次に、頸部リンパ節転移巣における CK19 の発現を検索したところ、原発巣と転移巣における CK19 の発現様式は類似しており、また C 群では多発転移や節外浸潤を認めた症例が多かった。さらに、疾患特異的 5 年累積生存率は A 群が 93.1%、B 群が 97.1%、C 群が 88.5%であり、統計学的有意差は認められなかったものの、C 群で最も低かった。

2. OSCC における CK19 および Δ Np63 の発現と機能に関する検討

まず、OSCC 生検組織において Δ Np63 と CK19 の局在を検索したところ、CK19 は腫瘍中心部よりも浸潤先端部で強く発現していたが、 Δ Np63 の発現は浸潤先端部で減弱していた。次に、5 種類の OSCC 細胞株（低転移株：HSC-2、HSC-3、SQUU-A、SAS、高転移株：SQUU-B）およびヒト正常角化上皮細胞（HaCaT）を用いて、CK19 および Δ Np63 の発現を RT-PCR 法により検索した。その結果、高転移株である SQUU-B 細胞では CK19 の発現が高く、 Δ Np63 の発現は低かったが、低転移株である HSC-2 細胞では逆に CK19 の発現が低く、 Δ Np63 の発現が高かった。また、同一患者より樹立した SQUU-A 細胞と SQUU-B 細胞における CK19 の発現をフローサイトメトリーにて検索したところ、SQUU-A 細胞と比べて SQUU-B 細胞では CK19 の発現が高かった。さらに、SQUU-A 細胞で Δ Np63 をノックダウンすると、CK19 の発現が有意に増強された。一方、SQUU-B 細胞に CK19 siRNA を導入したところ、遊走能および浸潤能が著明に抑制された。

以上の結果から、 $\Delta Np63$ の発現減弱により CK19 の発現が増強することで、OSCC の運動能が亢進し、その結果癌の進展に寄与することが示唆された。

緒 言

口腔がんは、全世界で年間 350,000 人以上が罹患する悪性腫瘍であり、その発生頻度は全悪性腫瘍の約 3%とされている。口腔がんの中で最も発生頻度が高いのは、口腔粘膜に由来する口腔扁平上皮癌 (oral squamous cell carcinoma: OSCC) であり、口腔がんの約 90%を占める (1-3)。OSCC は比較的高頻度に頸部リンパ節転移をきたし、転移症例は非転移症例と比較して有意に生存率が低いことが知られている (4-9)。また、OSCC 局所進展例の 8.9%で遠隔転移を生じ、そのほとんどが死亡の転帰を辿る (10)。これらのことから、転移をいかに制御するかが OSCC 患者の生存率の向上に極めて重要であると考えられる。

一般に、転移は原発巣で増殖した癌細胞が上皮基底膜を破壊したのちに、血管やリンパ管などが存在する粘膜下組織へ浸潤する過程から始まる。その後、癌細胞は宿主の免疫監視機構から逃避しながら脈管内へと浸潤し、標的臓器に定着後、増殖を開始することにより転移が成立する (11-17)。OSCC においても同様の機序で転移が生じると考えられるが、血行性転移よりもリンパ行性に転移を来しやすいため、多くの症例で頸部リンパ節転移を認める。従来より、頸部リンパ節転移は OSCC の浸潤様式と密接に関連することが知られており、癌胞巣をつくらず瀰漫性に浸潤している症例では、頸部リンパ節転移の発生頻度が有意に高いことが報告されている。また近年の研究により、原発巣の腫瘍深達度 (depth of invasion: DOI) が大きいほど頸部リンパ節転移が高頻度に生じることが明らかとなり、最新の Cancer Staging Manual (第 8 版) では、DOI が口

口腔癌の TNM 分類の新たな診断項目として組み込まれている。これらの知見は、転移の最初のプロセスである癌の浸潤が転移の成立に大きく影響を及ぼすことを示している。

これまでにわれわれは、OSCC の浸潤メカニズムを解明するために、癌抑制遺伝子 p53 のホモログである転写因子 p63 に着目して研究を行ってきた。p63 はプロモーター領域の違いにより、N 末端側に転写活性領域 (transactivation domain: TAD) を有する TAp63 と TAD が欠損した Δ Np63 の 2 つのアイソフォームに分けられる (18-21)。TAp63 は、p53 と構造的にも機能的にも類似した転写因子であり、標的遺伝子の転写活性を促進させることで、細胞の老化や DNA 損傷に伴うアポトーシスの亢進および細胞増殖の抑制に関与するとされている。一方で、 Δ Np63 は p53 および TAp63 の転写領域に結合し、ドミナントネガティブに作用して標的遺伝子の発現を抑制することにより細胞増殖の亢進やアポトーシスを抑制する (22, 23)。また、 Δ Np63 には C 末端側で選択的スプライシングによる異なる 3 つのバリエーション (Δ Np63 α 、 Δ Np63 β および Δ Np63 γ) が存在し、それぞれ異なる機能を有する (18-21)。近年の研究により、 Δ Np63 は口腔粘膜上皮の基底層や傍基底層に発現を認め、上皮幹細胞の増殖や分化に関与していることが明らかになっている (24)。さらに、肺癌や頭頸部扁平上皮癌においてもこれらのバリエーションが発現していることが報告されており、正常口腔粘膜上皮と同様に OSCC においても増殖、分化および浸潤に関与している可能性がある (25-26)。しかしながら、OSCC における Δ Np63 の詳細な機能については不明であったため、われわれは p63 の 2 つのアイソフォームのうち、特に Δ Np63 に焦点を絞って研究を進めてきた。

先行研究において、OSCC 生検組織を用い $\Delta Np63$ の発現を免疫組織化学的に検索したところ、ほとんど全ての OSCC 細胞で $\Delta Np63$ の発現が認められた。興味深いことに、その一部の症例において、高浸潤能を有する癌細胞が多く存在する浸潤先端部で $\Delta Np63$ の発現強度が減弱していた。これらの症例では頸部リンパ節転移や遠隔転移の発生頻度が有意に高かったことから、 $\Delta Np63$ の発現減弱が癌細胞の浸潤能に影響を及ぼすことにより、転移が生じやすくなっているものと推察された。そのため、OSCC 細胞株を用いさらに機能解析を行なったところ、 $\Delta Np63$ をノックダウンした OSCC 細胞は上皮系マーカーの E-cadherin の発現減弱と間葉系マーカーの N-cadherin や vimentin の発現増強などの間葉系細胞様の形質を示し、浸潤能が著明に亢進していた。このことから、 $\Delta Np63$ の発現減弱により上皮-間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition: EMT) が誘導され、癌細胞が悪性形質を獲得するものと考えられた。しかしながら、 $\Delta Np63$ がどのようにして OSCC の浸潤能を制御しているのかについては不明であった。

そこで本研究では、 $\Delta Np63$ を介した OSCC の浸潤メカニズムを解明するため、近年さまざまな癌腫において浸潤との関連が報告されている cytokeratin (CK) 19 に着目した。CK19 は、分子量約 40 kD の酸性 (type 1) に属する低分子ケラチンで、正常上皮細胞の細胞骨格を構成する中間径フィラメントの主要成分である (27-29)。正常組織のみならず、癌においても CK19 の発現が認められ、特に非小細胞肺癌 (non-small cell lung cancer: NSCLC) 患者では、腫瘍細胞の壊死に伴って生じる CK19 の分解産物 (CK19 fragment: CYFRA) の血中濃度が上昇することから、CYFRA は NSCLC の有用な腫瘍マーカーとし

て臨床応用されている (30-32)。また、食道癌、大腸癌、乳癌、頭頸部癌などにおいても CK19 の発現が報告されているが、その役割については癌腫によって異なっている。例えば乳癌では、CK19 のサイレンシングにより癌細胞の増殖能、浸潤能、および転移能が促進されることから、CK19 はがん抑制遺伝子として機能していると考えられている (33)。その一方で、大腸癌や肝細胞癌では、CK19 をノックダウンすると癌細胞の浸潤能や転移能が抑制され、CK19 陽性症例は陰性症例と比較すると予後不良であったことから、CK19 の発現が癌の悪性形質獲得に寄与していることが示唆されている (34, 35)。また、OSCC においても CK19 の発現を報告した研究がいくつか見受けられるが、他の癌腫と同様に、発現様式や機能に関して統一した見解は得られていないのが現状である (36-39)。さらに、これまでに $\Delta Np63$ と CK19 との関連について報告した論文はなく、両者の関係性についてはいまだ明らかとなっていない。

そこで本研究では、 $\Delta Np63$ を介した OSCC の浸潤機構における CK19 の役割を解明するために、まず OSCC 生検組織を用いて、CK19 を免疫組織化学的に検索し、臨床病理組織学的所見との関連を検討した。さらに、OSCC 細胞を用いて $\Delta Np63$ や CK19 の発現を検索するとともに、これらの発現変動が癌の遊走能および浸潤能に与える影響について解析を行なった。

研究 1. OSCC 生検組織における CK19 の発現と病理組織学的所見との関連

対象および方法

1. 対象患者

OSCC 原発巣における CK19 の免疫組織化学的染色では、2011 年 1 月から 2016 年 12 月に九州大学病院顎口腔外科を受診し、病理組織学的に OSCC と診断され、手術による根治的治療を行なった 100 名（男性 60 名、女性 40 名、平均年齢 65.5 ± 12.0 (30~91 歳)) を対象とした (表 1)。

OSCC 頸部リンパ節転移巣における CK19 の免疫組織化学的染色では、上記患者のうち頸部リンパ節転移を認め、かつ組織の保存状態が良好な症例を対象とした。また、術前にかん薬物療法や放射線療法を施行した症例は、転移リンパ節への治療の影響を考慮し、本研究対象から除外した。

表 1. OSCC 患者の内訳

| | 症例数 | (%) |
|------------------------|-----|--------|
| 性別 | | |
| 男性 | 60 | (60.0) |
| 女性 | 40 | (40.0) |
| 原発部位 | | |
| 舌 | 50 | (50.0) |
| 歯肉 | 33 | (33.0) |
| 頬粘膜 | 10 | (10.0) |
| 口底 | 7 | (7.0) |
| 臨床病期 (stage 分類) | | |
| I / II | 70 | (70.0) |
| III/IV | 30 | (30.0) |
| 組織学的悪性度 | | |
| 分化度 (WHO 分類) | | |
| grade 1 | 66 | (66.0) |
| grades 2/3 | 34 | (34.0) |
| 浸潤様式 (YK 分類) | | |
| grades 1/2/3 | 82 | (82.0) |
| grades 4C/4D | 18 | (18.0) |
| 術前治療 | | |
| 有 | 31 | (31.0) |
| 無 | 69 | (69.0) |

2. OSCC のステージングと生検組織の病理組織学的悪性度分類

本研究では、国際対がん連合 (Union for International Cancer Control: UICC) の「TNM 分類 第 8 版」をもとに stage 分類を行なった (40)。

OSCC の組織学的悪性度分類として、grade 分類 (WHO 分類) と山本・小浜の分類 (YK 分類) を用いた (41, 42)。grade 分類により、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) に分けた。また、YK 分類により、腫瘍宿主境界部における浸潤様式に応じて grade 1、grade 2、grade 3、grade 4C および grade 4D に分類した。

YK 分類の基準は以下に示す。

grade 1: 腫瘍と宿主との境界が明瞭である。

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. 免疫組織化学的染色法

OSCC 患者より採取した生検組織は、直ちに 4%パラホルムアルデヒド (paraformaldehyde: PFA) に 24~48 時間浸漬固定し、パラフィン包埋を行った。回転式マイクロトーム RM2145 (Leica Microsystems, Tokyo, Japan) にて 4 μm の切片を作製し、HE 染色および免疫組織化学的染色に用いた。作製したパラフィン切片をキシレンに 20 分間浸し、脱パラフィン処理を行い、さらに 100%、95%、90%、85%、75%エタノールの順にそれぞれ 5 分間浸漬させ水と

処理を行った。切片をリン酸緩衝生理食塩水（phosphate buffered saline: PBS）にて洗浄したのち、Target Retrieval Solution（pH 9.0; Dako, Glostrup, Denmark）に浸漬し、121°C、2 気圧の条件下で 5 分間抗原賦活化処理を行った。その後、30 分間温室にて放冷したのち、切片を PBS にて洗浄し、内因性ペルオキシダーゼ除去のため、3%過酸化水素水を室温で 30 分間反応させた。再度、PBS で洗浄したのち、抗体の非特異的吸着を防ぐために Blocking One（Nacalai Tesque, Kyoto, Japan）で 30 分間反応させた。一次抗体（表 2）は 4°C で 24 時間反応させた。PBS にて洗浄後、horseradish peroxidase（HRP）で標識された二次抗体に抗ウサギまたは抗マウス immunoglobulin G（IgG）ポリクローナル抗体（ヒストファイン MAX-PO; Nichirei Bioscience, Tokyo, Japan）を用い、室温にて 1 時間反応させた。PBS にて洗浄後、ジアミノベンジジン（3, 3-diaminobenzidine: DAB）にて可視化し、ヘマトキシリン（Mayer's hemalum solution; Merck Millipore, Burlington, Massachusetts）を用いて対比染色を行なった。その後、切片を 75%、85%、90%、95%、100%エタノールの順に各 5 分間脱水処理し、キシレンに 10 分間浸漬させ透徹処理を行い、Malinol Mounting Medium（Muto pure Chemicals, Tokyo, Japan）を用いて封入した。観察には、顕微鏡（IXplore Pro; Olympus, Tokyo, Japan）を使用した。

また、切片より 0.5 mm² の範囲を無作為に 3 か所選択し、DAB にて染色された CK19 陽性腫瘍細胞数を同範囲に含まれる全腫瘍細胞数で除して百分率で表したものを CK19 陽性細胞率（labeling index: LI）として算出した。さらに、受信者動作特性曲線（receiver operating characteristic curve: ROC）にて算出

したカットオフ値 (5%, 77%) に基づき、A 群 (LI < 5%)、B 群 (5% ≤ LI < 77%)、C 群 (LI ≥ 77%) の 3 群に分類し、病理組織学的所見との関連について統計学的解析を行なった。さらに、CK19 の発現様式と予後との関連性について検討するために、Kaplan-Meier 法を用いて生存曲線を作成し、5 年累積生存率を算出した。

表 2. 免疫組織化学的染色に使用した一次抗体

| 抗体 (clone 名、製造会社、所在地) | 希釈倍率 |
|--|--------|
| 抗ヒト CK19 ウサギモノクローナル抗体 (EP1580Y, Abcam, Cambridge, UK) | 1: 400 |
| 抗ヒト ΔNp63 マウスモノクローナル抗体 (A4A, Dako, Glostrup, Denmark) | 1: 100 |

4. 統計学的解析

OSCC 生検組織における CK19 の発現と病理組織学的所見との関連性を検討するために、カイ二乗検定を用いて統計処理を行なった。さらに、頸部リンパ節転移に影響を及ぼす臨床病理学的因子を検索するため、ロジスティック回帰解析を行なった。生存曲線は Kaplan-Meier 法を用いて解析を行い、統計処理には log-rank 検定を用いた。なお、統計ソフトとして JMP software version 13 (SAS Institute, Cary, North Carolina) を使用し、 $p < 0.05$ の場合を統計学的に有意差ありとした。

結 果

1-1. OSCC 原発巣における CK19 の発現様式

OSCC 原発巣での CK19 の発現を検索するために免疫組織化学的染色を行なった。腫瘍隣接口腔粘膜上皮では、CK19 は基底細胞の細胞質にのみ限局して発現していた。一方、OSCC における CK19 の陽性率は症例によって異なっており、全く発現していないものからほとんど全ての癌細胞で発現しているものまで多様であった (図 1)。そこで、頸部リンパ節転移に関する CK19-LI のカットオフ値 (5%、77%) に基づいて、対象症例を A 群: $LI < 5\%$ 、B 群: $5\% \leq LI < 77\%$ 、C 群: $LI \geq 77\%$ の 3 群に分類した。その結果、A 群は 38 例 (38.0%)、B 群 36 例 (36.0%)、C 群 26 例 (26.0%) であった。

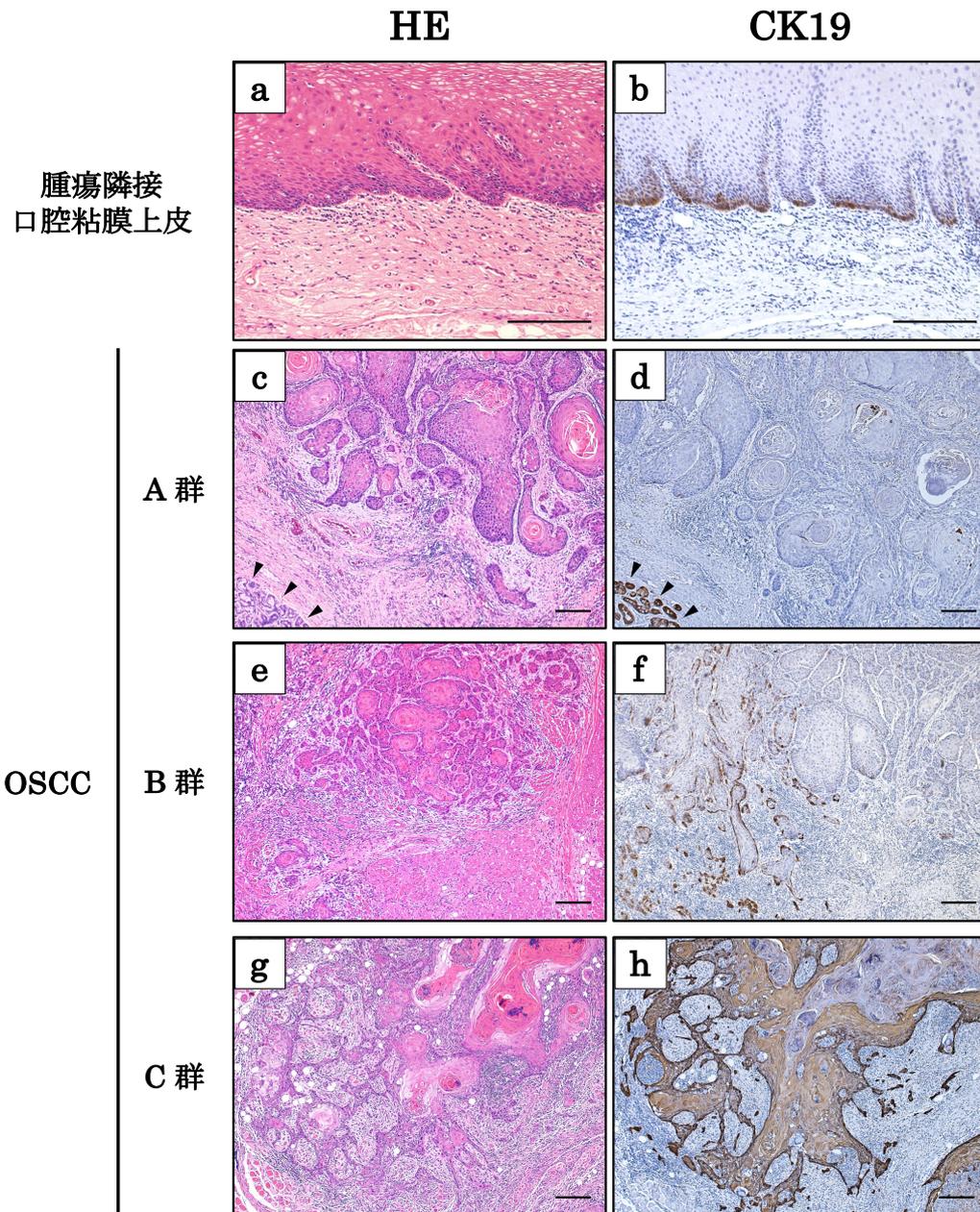


図 1. 腫瘍隣接口腔粘膜上皮と OSCC における CK19 の発現 (HE 染色および免疫組織化学的染色)

(a, c, e, g) HE 染色。(b, d, f, h) CK19 免疫組織化学的染色。(a, b) 腫瘍隣接口腔粘膜上皮。(c-h) OSCC 生検組織。(b) 隣接口腔粘膜では基底層のみに CK19 の発現を認める。

(d) A 群では腫瘍組織に CK19 の発現をほとんど認めない。矢頭は CK19 陽性の唾液腺上皮を示す。(f) B 群では、CK19 の陽性腫瘍細胞を認め、特に浸潤先端部の腫瘍細胞で強く発現している。(h) C 群ではほとんど全ての腫瘍細胞で CK19 の発現を認める。

scale bars: 200 μ m.

1-2. OSCC 原発巣における CK19 の発現と臨床病理組織学的所見との関連

1-1 の研究結果より、OSCC における CK19 の発現が症例間で異っていたことから、これらの発現様式と臨床像との関連性について検討した。その結果、C 群は、A 群や B 群と比較して、浸潤様式が 4C、4D ならびに分化度が低い症例、すなわち組織学的悪性度の高い症例が多く、頸部リンパ節転移の発生頻度が有意に高かった ($p<0.001$) (表 3)。さらに、CK19 の発現様式や癌細胞の分化度、浸潤様式などの頸部リンパ節転移の要因となり得る臨床病理学的因子が、相互に影響を及ぼし合っていないかを検討するために、ロジスティック回帰分析による多変量解析を行なった。その結果、CK19 の発現様式にのみ統計学的有意差を認め、CK19 高発現群である C 群は A 群と比較してオッズ比が 5.05 であり、頸部リンパ節転移の発生リスクが有意に高かった (表 4)。

表 3. OSCC 生検標本における CK19 の発現と臨床病理組織学的所見との関連

| | 症例数 (%) | CK19 発現 | | | p-value |
|---------------------|------------|---------|-----|-----|---------|
| | | A 群 | B 群 | C 群 | |
| 性別 | | | | | |
| 男性 | 60 (60.0) | 20 | 24 | 16 | N.S. |
| 女性 | 40 (40.0) | 18 | 12 | 10 | |
| 原発部位 | | | | | |
| 舌 | 50 (50.0) | 14 | 18 | 18 | N.S. |
| 歯肉 | 33 (33.0) | 18 | 11 | 4 | |
| 頬粘膜 | 10 (10.0) | 4 | 3 | 3 | |
| 口底 | 7 (7.0) | 2 | 4 | 1 | |
| T 分類 | | | | | |
| T1/2 | 81 (81.0) | 31 | 27 | 23 | N.S. |
| T3/4 | 19 (19.0) | 7 | 9 | 3 | |
| 臨床病期分類 | | | | | |
| stages I / II | 70 (70.0) | 28 | 25 | 17 | N.S. |
| stages III/IV | 30 (30.0) | 10 | 11 | 9 | |
| 浸潤様式 (YK 分類) | | | | | |
| grades 1/2/3 | 82 (82.0) | 35 | 31 | 16 | p<0.01 |
| grades 4C/4D | 18 (18.0) | 3 | 5 | 10 | |
| 分化度 (WHO 分類) | | | | | |
| grade 1 | 66 (66.0) | 27 | 27 | 12 | p<0.05 |
| grades 2/3 | 34 (34.0) | 11 | 9 | 14 | |
| 頸部リンパ節転移 | | | | | |
| 有 | 25 (25.0) | 5 | 6 | 14 | p<0.001 |
| 無 | 75 (75.0) | 33 | 30 | 12 | |
| 局所再発 | | | | | |
| 有 | 11 (11.0) | 5 | 2 | 4 | N.S. |
| 無 | 89 (89.0) | 33 | 34 | 22 | |
| 遠隔転移 | | | | | |
| 有 | 3 (3.0) | 0 | 1 | 2 | N.S. |
| 無 | 97 (97.0) | 38 | 35 | 24 | |
| 術前治療 | | | | | |
| 有 | 31 (31.0) | 12 | 9 | 10 | N.S. |
| 無 | 69 (69.0) | 26 | 27 | 16 | |

カイ二乗検定; N.S.: not significant

表 4. OSCC の頸部リンパ節転移に影響を与える臨床病理学的因子の解析

| | 頸部リンパ節 転移 | | 単変量解析 | | 多変量解析 | |
|---------------------|--------------|----|-------------------|-----------------|-------------------|-----------------|
| | 有 | 無 | OR (95% CI) | <i>p</i> -value | OR (95% CI) | <i>p</i> -value |
| 性別 | | | | | | |
| 男性 | 14 | 46 | reference | - | reference | - |
| 女性 | 11 | 29 | 1.25 (0.49-3.11) | 0.6384 | 1.46 (0.50-4.29) | 0.4886 |
| 原発部位 | | | | | | |
| 舌 | 16 | 34 | reference | - | reference | - |
| 歯肉 | 4 | 29 | 0.29 (0.08-0.90) | 0.0320 | 0.46 (0.12-1.73) | 0.2522 |
| 口底 | 1 | 6 | 0.35 (0.02-2.32) | 0.3079 | 0.52 (0.05-5.32) | 0.5824 |
| 頬粘膜 | 4 | 6 | 1.42 (0.32-5.68) | 0.6282 | 1.75 (0.35-8.91) | 0.4981 |
| T 分類 | | | | | | |
| T1/2 | 22 | 59 | reference | - | reference | - |
| T3/4 | 3 | 16 | 0.50 (0.13-1.90) | 0.3029 | 0.57 (0.12-2.73) | 0.4818 |
| 浸潤様式 (YK 分類) | | | | | | |
| grades 1/2/3 | 16 | 66 | reference | - | reference | - |
| grades 4C/4D | 9 | 9 | 4.13 (1.41-12.07) | 0.0068 | 2.08 (0.54-7.99) | 0.2850 |
| 分化度 (WHO 分類) | | | | | | |
| grade 1 | 13 | 53 | reference | - | reference | - |
| grades 2/3 | 12 | 22 | 2.22 (0.88-5.63) | 0.0880 | 1.45 (0.45-4.61) | 0.5335 |
| 局所再発 | | | | | | |
| 有 | 4 | 7 | reference | - | reference | - |
| 無 | 21 | 68 | 0.54 (0.15-2.23) | 0.3735 | 0.74 (0.13-4.20) | 0.7335 |
| CK19 発現 | | | | | | |
| A 群 | 5 | 33 | reference | - | reference | - |
| B 群 | 6 | 30 | 1.32 (0.36-4.77) | 0.6715 | 1.39 (0.36-5.39) | 0.6304 |
| C 群 | 14 | 12 | 7.70 (2.28-25.98) | 0.0005 | 5.05 (1.32-19.36) | 0.0180 |

OR: odds ratio (オッズ比)

95% CI: 95% confidence interval (95%信頼区間)

1-3. OSCC 頸部リンパ節転移巣における CK19 の発現

これまでの研究結果により、OSCC 原発巣での CK19 の発現と頸部リンパ節転移の発生頻度との間に有意な関連性が示された。そのため、原発巣の CK19 陽性腫瘍細胞が頸部リンパ節へ転移しているのではないかと考え、頸部リンパ節転移巣における CK19 の発現を免疫組織化学的に検索し、原発巣での CK19 の発現様式との関連について検討を行なった。その結果、A 群では頸部リンパ節転移巣で CK19 の発現は認められなかった。また、B 群および C 群では転移巣の腫瘍細胞に CK19 の発現を認め、特に C 群では、被膜外に進展した多くの腫瘍細胞にも CK19 の発現を認めた (図 2)。

次に、原発巣と転移巣における CK19 の発現様式を比較検討したところ、A 群では転移巣においても CK19 の発現が認められず、B 群および C 群では CK19 の発現を認めた (表 5)。これらのことから、必ずしも原発巣の CK19 陽性細胞が転移しているわけではなく、転移リンパ節における CK19 の発現は原発巣の発現様式を強く反映していると考えられた。さらに、統計学的有意差は認めなかったものの、CK19 の発現が高い B 群と C 群では A 群よりも頸部リンパ節の多発転移や節外浸潤の発生頻度が高かった (表 6)。

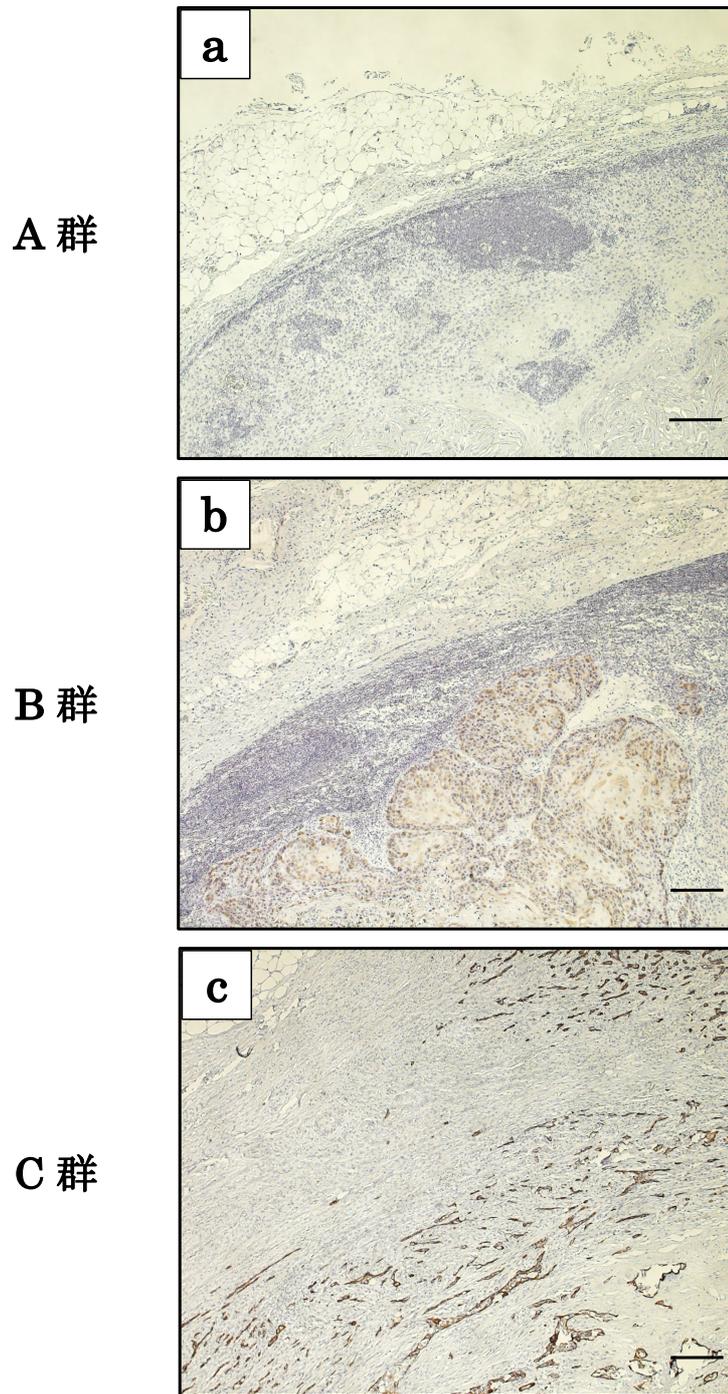


図 2. OSCC 頸部リンパ節転移巣における CK19 の発現様式

(a) A 群では、転移巣の腫瘍細胞に CK19 の発現は認められない。(b) B 群では転移巣の腫瘍細胞に CK19 の発現を認める。(c) C 群では被膜外に浸潤した腫瘍細胞にも CK19 の発現を認める。scale bars: 200 μ m。

表 5. OSCC 原発巣と頸部リンパ節転移巣における CK19 の発現の関連

| 転移巣における CK19 の発現 | 原発巣における CK19 の発現 | | | p-value |
|---------------------|------------------|-----|-----|---------|
| | A 群 | B 群 | C 群 | |
| 有 | 0 | 3 | 3 | p<0.05 |
| 無 | 2 | 0 | 0 | |

カイ二乗検定; N.S.: not significant

表 6. OSCC 原発巣における CK19 の発現と転移リンパ節の評価

| | CK19 発現 | | | p-value |
|------------|---------|-----|-----|---------|
| | A 群 | B 群 | C 群 | |
| 頸部リンパ節転移様相 | | | | |
| pN1 | 2 | 1 | 2 | N.S. |
| pN2/pN3 | 0 | 3 | 5 | |
| 節外浸潤 | | | | |
| 有 | 0 | 1 | 4 | N.S. |
| 無 | 2 | 3 | 3 | |

カイ二乗検定; N.S.: not significant

1-4. OSCC 原発巣における CK19 の発現と予後との関連

次に、原発巣における CK19 の発現と予後との関連を検討するために Kaplan-Meier 法を用いて解析した。その結果、5 年累積全生存率および疾患特異的 5 年累積生存率のいずれにおいても各群間で有意差は認められなかったものの、後者では A 群が 93.1%、B 群が 97.1%、C 群が 88.5%であり、C 群において生存率が最も低かった (図 3)。

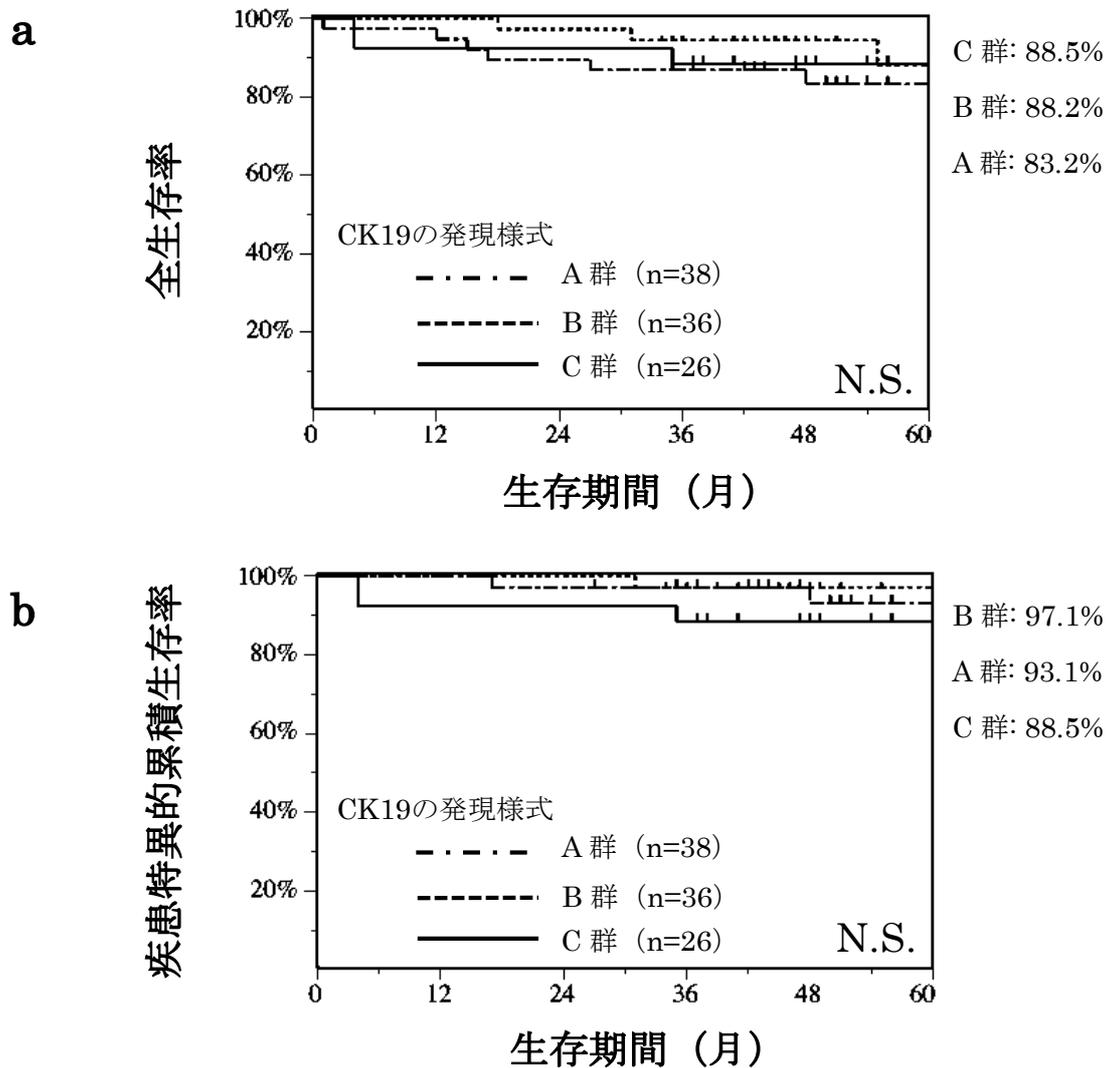


図 3. 全生存率および疾患特異的 5 年累積生存率

(a) 5 年累積全生存率。(b) 疾患特異的 5 年累積生存率。全生存率および疾患特異的生存率のいずれにおいても各群間に統計学的有意差は認められないが、疾患特異的生存率では CK19 を高発現している C 群で最も生存率が低い。

なお、統計処理には log-rank 検定を用いている。N.S.: not significant。

研究 2. OSCC における CK19 および Δ Np63 の発現と
機能に関する検討

材料および方法

1. 細胞培養

本研究では OSCC 細胞株である HSC-2 (高分化型口底癌由来)、HSC-3 (低分化型舌癌由来)、SQUU-A (高分化型舌癌由来; 低転移株)、SQUU-B (高分化型舌癌由来; 高転移株)、SAS (低分化型舌癌由来) ならびに HaCaT (ヒト正常角化上皮由来) を用いた (43)。培地には、Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) /F12 (Life Technologies, Carlsbad, California) に 10%ウシ胎児血清 (fetal bovine serum: FBS; Life Technologies)、100 units/mL のペニシリン /ストレプトマイシン (penicillin/streptomycin: P/S; Nacalai Tesque) を添加したものをを用いて、37°C、5%CO₂ 存在下で細胞培養を行なった。

2. RNA (ribonucleic acid) の抽出および相補的 DNA (complementary deoxyribonucleic acid: cDNA) の合成

RNA の抽出では、まず培養皿上の細胞に TRIzol® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts) を加え、セルスクレーパーにて細胞を破碎した。その後、これらに 0.2 mL の chloroform (Nacalai Tesque) を加えて攪拌し、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、70%エタノールと混和した。RNeasy® Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用い、混和した溶液をスピンカラムに入れ、20°C、10,000 rpm で 30 秒間遠心分離した。その後、Buffer RW1 (20%エタノール、グアニジン塩含

有) を 0.7 mL 添加し、20°C、10,000 rpm で 15 秒間遠心分離をかけ、廃液を除去した。同じ作業を再度行った後、カラムに残留した塩を除去するため Buffer RPE (80%エタノール、塩化ナトリウム含有) を添加し、20°C、10,000 rpm で 15 秒間遠心分離を行い、廃液を除去した。スピнкаラムを新しい 1.5 mL コレクションチューブに置き換え、RNase free water を 30 μ L スピнкаラムメンブレンに添加し、20°C、10,000 rpm で 1 分間遠心分離を行い、RNA を抽出した。その後、吸光度計 NANO DROP 1000 (Thermo Fisher Scientific) にて total RNA の濃度を測定した。

cDNA の合成には、diethylpyrocarbonate (DEPC) 処理水に約 2.0 μ g の total RNA、35 units/ μ L RNase inhibitor (Nacalai Tesque) を 1.0 μ L、100 mM Tris-HCl (pH 8.8)、500 mM KCl および 0.8% Nonidet P40 を含む 10 \times Taq DNA polymerase buffer (Bio Basic, Markham, Canada) を 2.0 μ L、25 mM MgCl₂ (Bio Basic) を 4.0 μ L、2.0 mM deoxyribonucleotide triphosphate (dNTP) mix (Toyobo, Osaka, Japan) を 2.0 μ L、50 μ M random hexamers (Invitrogen, Carlsbad, California) を 1.0 μ L、50 units/ μ L M-MuLV Reverse Transcriptase (Applied Biosystems, Foster city, California) を 1.0 μ L 加えて、合計 20.0 μ L 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 にて 5 分間冷却し、これを messenger RNA (mRNA) の発現解析に用いた。

3. reverse transcription (RT) –polymerase chain reaction (PCR) および real time PCR による mRNA の発現解析

RT-PCR は滅菌水に template DNA を 50 ng、DreamTaq buffer を 1.0 μ L、DreamTaq polymerase (Thermo scientific) を 0.05 μ L、2.0 mM dNTPmix を 1.0 μ L、20 μ M センスおよびアンチセンスプライマーをそれぞれ 0.5 μ L 加えて全反応量を 9.55 μ L とした。反応条件は、熱変性は 94°C で 1 サイクル目が 3 分間、2 サイクル目以降は 30 秒間で行い、アニーリングは 30 秒間、伸長反応は 72°C で 15 秒間とした。

real-time PCR は Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies, Santa Clara, California) を用いて行った。滅菌水に Master Mix を 10 μ L、template DNA を 9 ng、20 μ M センスおよびアンチセンスプライマーをそれぞれ 0.5 μ L 加え、全反応量を 20 μ L とした。反応条件は、熱変性は 94°C で 1 サイクル目が 10 分間、2 サイクル目以降は 30 秒間で行い、アニーリングは 30 秒間、伸長反応は 72°C で 15 秒間とし、全 40 サイクルの増幅を行った。また、mRNA の発現量を定量化するためにハウスキーピング遺伝子である glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を用いて補正し、 $\Delta\Delta$ Ct 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%アガロースゲル (Nacalai Tesque) 上で電気泳動を行い、エチジウムブロマイド溶液 (Amresco, Solon, Ohio) を用いて染色し、紫外線により可視化した。今回解析を行った各遺伝子のプライマー配列、PCR 産物の断片サイズおよびアニーリング温度 (表 7) を示す。上記操作を独立して 3 回を行い、統計処理を行った。

表 7. 使用した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 温度 (°C) |
|-------|---------------------|---------|-----------------------|-------------------|
| CK19 | 174 | forward | TTTGAGACGGAACAGGCTCT | 60 |
| | | reverse | CCCTCAGCGTACTGATTTCC | |
| ΔNp63 | 117 | forward | CAGACTCAATTTAGTGAG | 60 |
| | | reverse | AGCTCATGGTTGGGGCAC | |
| GAPDH | 104 | forward | ATCAGCAATGCCTCCTGCAC | 60 |
| | | reverse | ATGGCATGGACTGTGGTCAT | |

4. フローサイトメトリーによる解析

細胞凍結保存液 (CELLBANKER™ 1 plus; Zenoaq, Fukushima, Japan) にて保存していた SQUU-A 細胞および SQUU-B 細胞を 2.0×10^5 個抽出し、フィルターで異物除去後セルストレーナーに注入した。eBioscience™ Flow Cytometry Staining Buffer (Thermo Fisher Scientific) を 2 mL 添加してブロッキングを行い、4°C、1,200 rpm で 5 分間遠心分離を行い、廃液を除去した。その後、細胞の固定および細胞膜浸透化を目的に BD Cytofix/Cytoperm™ buffer を 250 μL 添加し、4°C にて 20 分放置した。BD perm/wash buffer 1 mL にて 2 回洗浄し、4°C、1,500 rpm で 5 分間遠心分離を行い、廃液を除去した。その後、一次抗体は抗ヒト CK19 ウサギモノクローナル抗体を使用し 30 倍に希釈したものを添加後、遮光して 4°C で 30 分放置した。BD perm/wash buffer 1 mL にて 2 回洗浄後、4°C、1,500 rpm で 5 分間遠心分離を行い、廃液を除去した。二次抗体 (Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit IgG; Thermo Fisher Scientific) を 2000 倍に希釈したものを添加して、室温で 15 分放置した。その後、BD

perm/wash buffer 1 mL にて 2 回洗浄し、4°C、1,500 rpm で 5 分間遠心分離を行い、廃液を除去した。BD perm/wash buffer 200 μ L 添加した後、BD FACSVerse™ Flow Cytometer (Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey) にて解析した。

5. Δ Np63 および CK19 の small interfering RNA (siRNA) の導入

SQUU-A 細胞に Δ Np63 siRNA を、SQUU-B 細胞に CK19 siRNA を導入し、機能解析を行った。なお、siRNA の導入には DhamaFECT 1 Transfection Reagent (Dharmacon, Lafayette, Colorado) を使用した。まず、6 穴プレートに 2.5×10^4 /well の細胞を播種し、37°C、5%CO₂ 存在下で 70%コンフルエントになるまで培養を行なった。その後、FBS 含有の DMEM/F-12 に培地を交換し、10 nM の Δ Np63 siRNA、CK19 siRNA をそれぞれ導入した。37°C、5%CO₂ 存在下で培養した後、導入 24 時間後に mRNA の発現解析を行なった。なお、使用した siRNA は、 Δ Np63 siRNA; 5'-GGACAGCAGCATTGATCAATT-3' (Sigma Aldrich, St Louis, Missouri)、CK19 siRNA; ON-TARGETplus Human KRT19 (3880) siRNA-SMARTpool (Dharmacon) であり、陰性対象として ON-TARGETplus Non-targeting siRNA (Dharmacon) を導入した。

6. wound healing assay

CK19 の発現変動が OSCC 細胞の遊走能に与える影響を検討するため、CK19 siRNA 導入細胞を用いて wound healing assay を行なった。まず、24 穴プレートに 2.5×10^4 /well の SQUU-B 細胞を播種し、37°C、5%CO₂ 存在下にコンフル

エントになるまで培養した。SQUU-B 細胞には前述と同様の方法で CK19 siRNA を導入し、24 時間後に 200 μ L 用滅菌ピペットチップの先端で間隙を形成した。また、細胞増殖による影響を回避するため、10 μ g/mL の mitomycin C を間隙形成後より 2 時間作用させた。その後培地を交換し、間隙形成 12 時間後の遊走状態を顕微鏡 (IXplore Pro; Olympus, Tokyo, Japan; 対物レンズ $\times 4$) にて観察した。また、間隙形成直後の創傷面積の平均値と 12 時間後のものとの差を、間隙形成直後の創傷面積の平均値で除して百分率で表したものを創傷縮小率 (%) として解析した。

7. Matrigel™ invasion assay

CK19 の発現変動が OSCC 細胞の浸潤能に与える影響を検討するため、Falcon Cell Culture Insert (BD Biosciences, Franklin, New Jersey)、Biocoat™ Matrigel™ invasion chamber (BD Biosciences) および 24 穴プレートを用いて、Matrigel™ invasion assay を行った。まず、SQUU-B 細胞を用いて、前述と同様の方法で CK19 siRNA を導入した。その後、底面に細胞の移動可能な 8 μ m のポアが空いたインサート内へ、無血清培地で懸濁した 7.5×10^4 /well の siRNA 導入済みの SQUU-B 細胞を播種し、プレート内へは血清添加培地を入れることで細胞の遊走を促した。これを 37°C、5%CO₂ の条件下に 22 時間培養後、インサート下面を 100%メタノールで固定し、HE 染色を行った後に、0.5 mm² の範囲を無作為に 3 か所選択して染色された細胞数の平均値を算出した。また、別のインサートには浸潤細胞のみインサート下面に移動するように、Matrigel™ をコーティングし、同様の方法で浸潤細胞数の平均値を算出した。

さらに、平均浸潤細胞数を平均遊走細胞数で除して百分率で表したものを浸潤細胞率 (%) として解析した。

8. 統計学的解析

real-time PCR にて計測した遺伝子の相対発現量、wound healing assay における創傷縮小率および invasion assay における浸潤細胞率の統計処理には Mann-Whitney U 検定を用いた。なお、統計ソフトとして JMP software version 13 を使用し、 $p < 0.05$ の場合を統計学的に有意差ありとした。

結 果

2-1. OSCC 生検組織における CK19 と Δ Np63 の発現

研究 1 の結果より、CK19 高発現症例では、浸潤様式が grade 4C/4D などの高度浸潤癌の症例が多く、節外浸潤の発生頻度が高いことが示された。そこで、OSCC の浸潤に深く関与している Δ Np63 の OSCC 生検組織における局在を検索し、CK19 の発現様式と比較検討した。その結果、A 群では、CK19 の発現が認められなかったのに対し、 Δ Np63 はほとんど全ての腫瘍細胞で発現を認めた。一方 C 群では、逆にほとんど全ての腫瘍細胞で CK19 の発現を認め、特に浸潤先端部では発現が増強していた。しかしながら、 Δ Np63 の発現は全体的に減弱しており、浸潤先端部では陽性細胞を検出できなかった (図 4)。

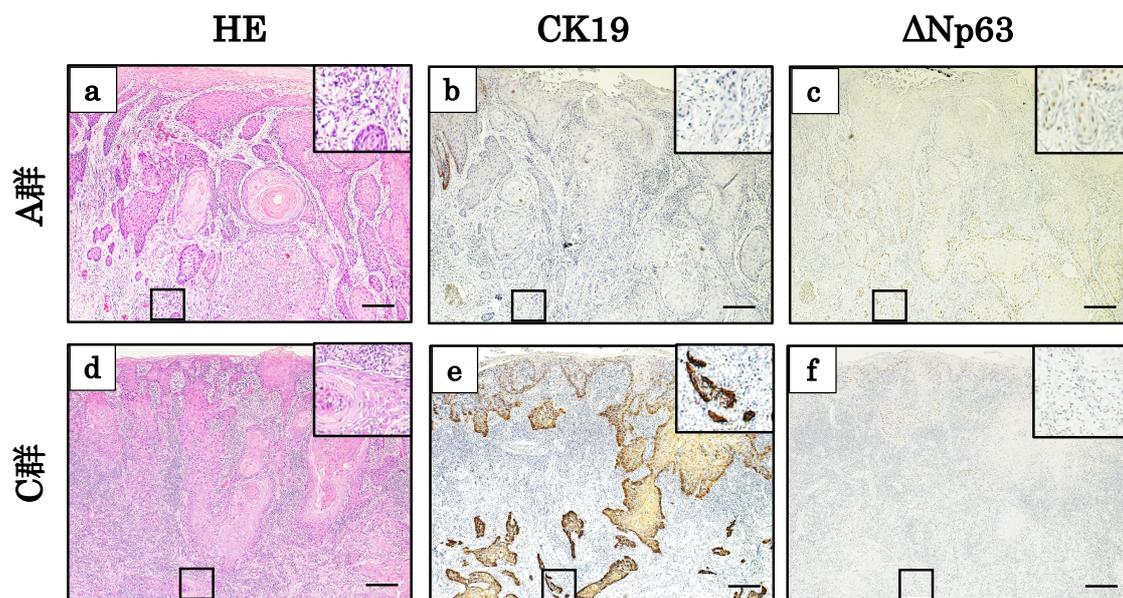


図 4. A 群および C 群における CK19 と Δ Np63 の発現

(a, d) HE 染色。(b, e) CK19 免疫組織化学的染色。(c, f) Δ Np63 免疫組織化学的染色。(a-c) A 群の原発巣の腫瘍組織。(d-f) C 群の原発巣の腫瘍組織。内枠は浸潤先端部とその拡大像を示す。(b, c) A 群では CK19 の発現は認められないが、 Δ Np63 は強く発現している。(e, f) C 群では、ほとんど全ての腫瘍細胞で CK19 の発現を認めるが、 Δ Np63 は発現が減弱または消失している。scale bars: 100 μ m。

2-2. OSCC 細胞株における CK19 と Δ Np63 の発現

2-1 の結果より、OSCC 浸潤先端部において CK19 と Δ Np63 の発現様式が相反していたことから、次に OSCC 細胞においてもそれらの発現に同様の傾向があるか検討した。その結果、 Δ Np63 の発現が最も高い HSC-2 細胞では CK19 の発現が最も低く、逆に高転移株である SQUU-B 細胞では Δ Np63 の発現はほとんど認められなかったが、CK19 の発現は最も高かった。これらのことから、OSCC 生検組織の浸潤先端部の発現様式と同様に、OSCC 細胞株においても CK19 と Δ Np63 の発現が逆相関しており、特に高い転移能を有する高度浸潤性細胞株 (SQUU-B 細胞) において、CK19 が高発現していた (図 5)。

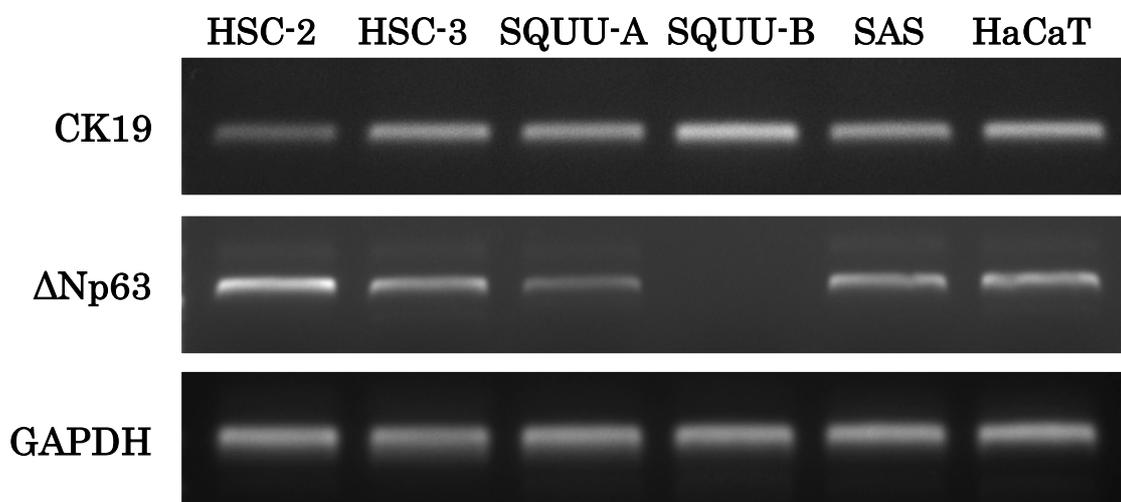


図 5. OSCC 細胞株ならびにヒト正常角化上皮細胞における CK19 および Δ Np63 の発現 (RT-PCR 法)

CK19 の発現はすべての細胞株で認められるが、高浸潤性 OSCC 細胞株である SQUU-B 細胞において最も高い発現を認める。 Δ Np63 の発現は、SQUU-B 細胞ではほとんど認められず、CK19 の発現が低い HSC-2 細胞では最も高発現しており、CK19 の発現と逆相関している。

2-3. OSCC 細胞における CK19 タンパクの発現

2-2 の研究結果より、CK19 遺伝子の発現は SQUU-B 細胞で最も高かった。そこで、タンパク質レベルでも同様の傾向であるかを検索するために、同一患者より樹立された低転移株 SQUU-A 細胞と高転移株 SQUU-B 細胞を用いて、CK19 タンパクの発現量を flow cytometry にて比較検討した。その結果、SQUU-A 細胞に比べ SQUU-B 細胞の方が CK19 を強く発現している細胞が多く、CK19 の平均発現強度の比較においても SQUU-B 細胞の方が有意に高かった (図 6)。

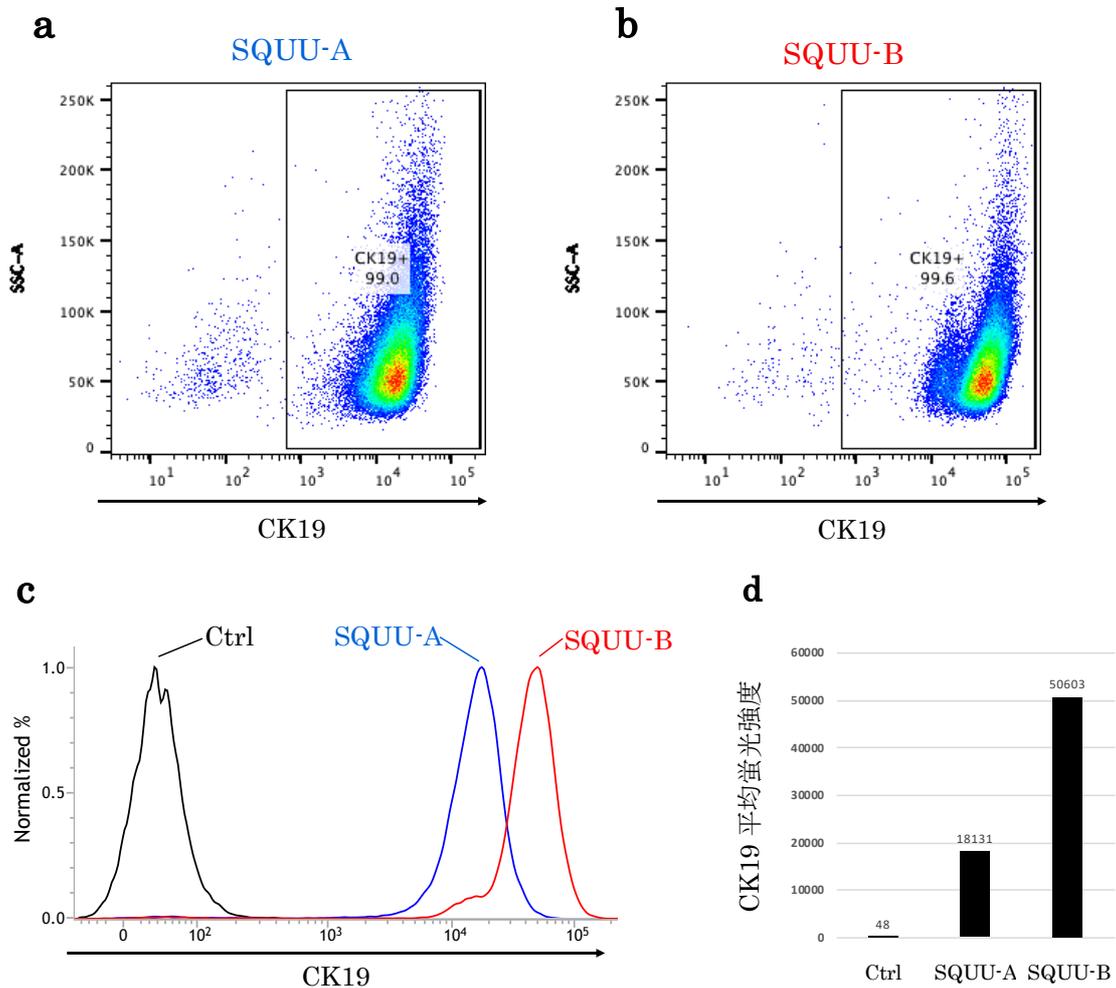


図 6. SQUU-A 細胞と SQUU-B 細胞における CK19 のヒストグラムおよび平均蛍光強度 (flow cytometry)

(a-c) SQUU-A 細胞および SQUU-B 細胞の CK19 の陽性細胞率とヒストグラム。ヒストグラム内の枠は陽性細胞とみなした細胞集団を示している。(d) SQUU-A 細胞および SQUU-B 細胞における CK19 の平均蛍光強度。(a-c) CK19 陽性細胞率は SQUU-A 細胞で 99.0%、SQUU-B 細胞で 99.6%である。SQUU-B 細胞は SQUU-A 細胞と比較して CK19 の発現強度が高い細胞を多く認める。(d) SQUU-B 細胞は SQUU-A 細胞と比べて CK19 の平均蛍光強度が高い。

2-4. OSCC 細胞における Δ Np63 ノックダウンが CK19 の発現に与える影響

これまでの研究で、CK19 と Δ Np63 の発現が逆相関していたため、転写因子である Δ Np63 が CK19 の発現を制御しているか検討した。SQUU-A 細胞に Δ Np63 siRNA を導入し、real-time PCR 法にて CK19 の発現を検索したところ、 Δ Np63 の発現抑制により CK19 の発現が有意に亢進していた (図 7)。

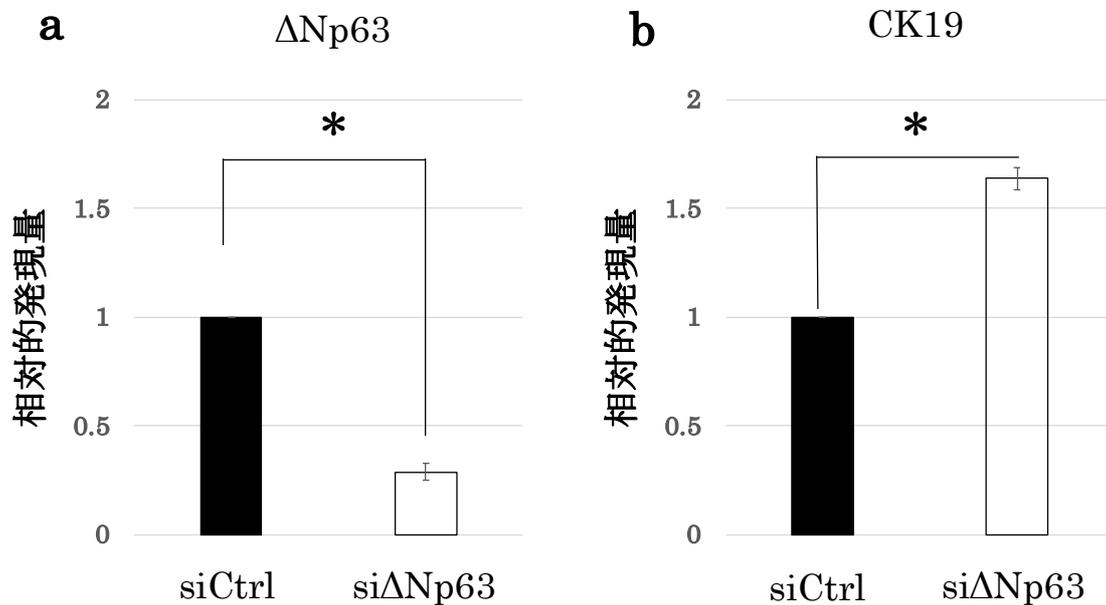


図 7. OSCC 細胞における Δ Np63 ノックダウンが CK19 の発現に与える影響

Δ Np63 ノックダウンによる CK19 の発現変動を real-time PCR 法を用いて検索している。(a) SQUU-A 細胞への Δ Np63 siRNA 導入により Δ Np63 の発現が有意に減弱している。(b) また、SQUU-A 細胞で Δ Np63 をノックダウンすると CK19 の発現が有意に増強されている。グラフは独立して行なった 3 回のデータの平均値および標準偏差を示す。なお、統計処理には Mann-Whitney U 検定を用いている (* $p < 0.05$)。

siCtrl: scrambled siRNA 導入 SQUU-A 細胞。

si Δ Np63: Δ Np63 siRNA 導入 SQUU-A 細胞。

2-5. CK19 ノックダウンが OSCC 細胞の遊走・浸潤能に与える影響

2-4 にて、 Δ Np63 の発現減弱により CK19 の発現が増強されたため、次に CK19 の発現変動が OSCC 細胞の運動能に与える影響について検討した。CK19 の発現が最も高かった SQUU-B 細胞に CK19 siRNA を導入し wound healing assay にて解析したところ、CK19 の発現抑制により細胞遊走能が有意に抑制された (図 8)。また invasion assay では、CK19 の発現抑制により SQUU-B 細胞の浸潤能が有意に抑制された (図 9)。

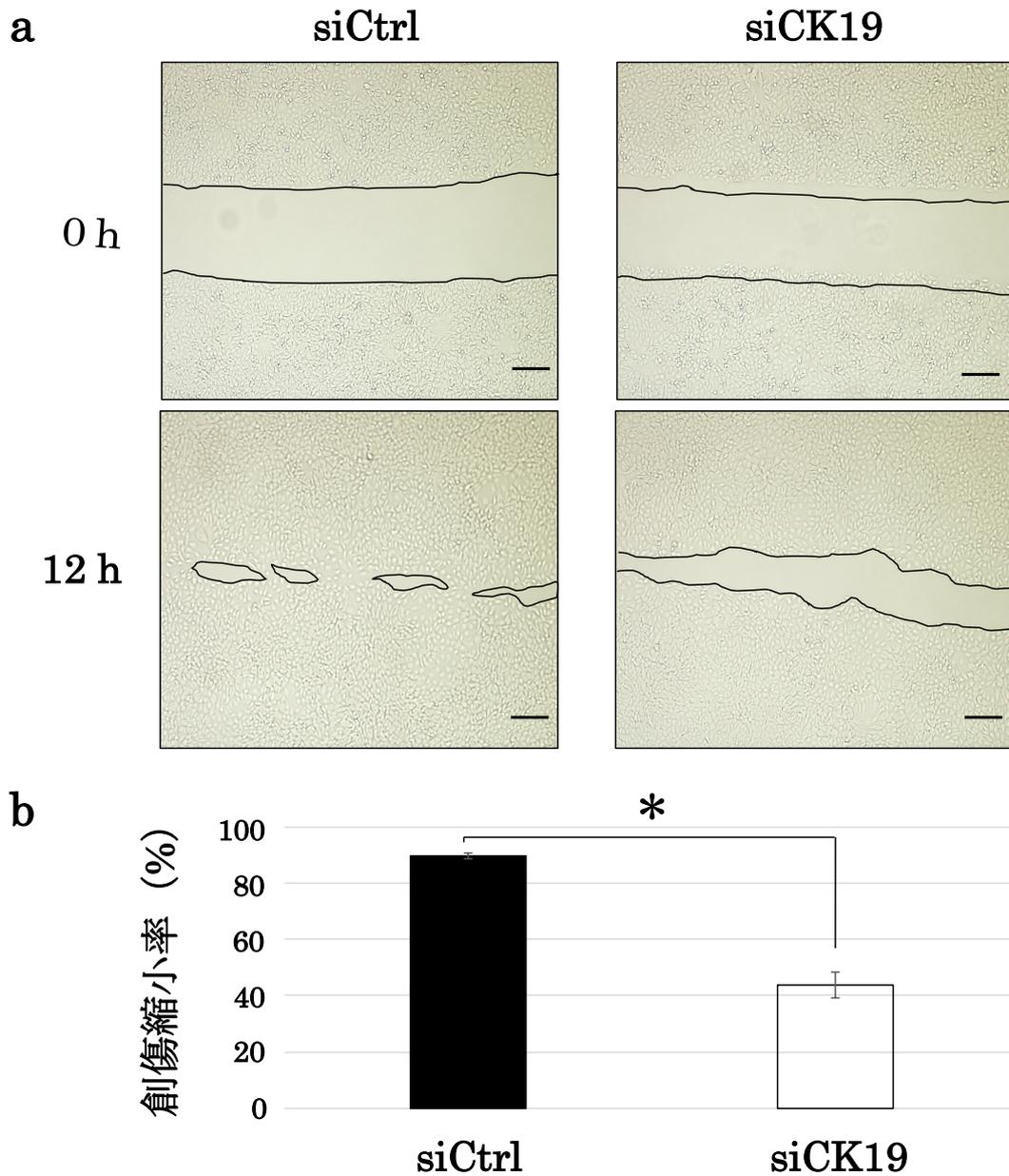


図 8. CK19 ノックダウンが OSCC 細胞の遊走能に与える影響

(a) 顕微鏡像。(b) 創傷縮小率。CK19 siRNA 導入群の遊走能は対照群と比較して有意に低下している。グラフは独立して行なった 3 回のデータの平均値および標準偏差を示す。なお、統計処理には Mann-Whitney U 検定を用いている ($*p < 0.05$)。scale bars: 200 μm 。

siCtrl: scrambled siRNA 導入 SQUU-B 細胞。

siCK19: CK19 siRNA 導入 SQUU-B 細胞。

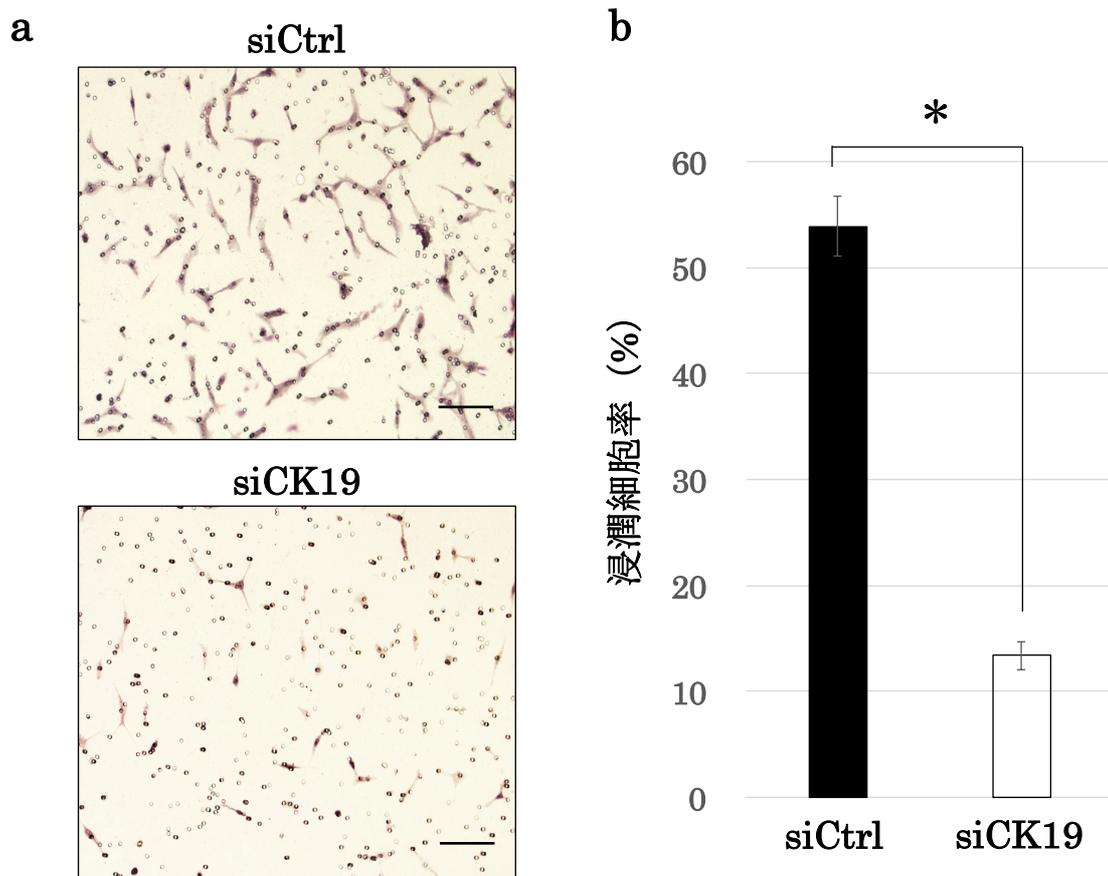


図 9. CK19 ノックダウンが OSCC 細胞の浸潤能に与える影響

(a) 浸潤細胞の顕微鏡像 (HE 染色)。(b) 浸潤細胞率。CK19 siRNA 導入群の浸潤能は対照群と比較して有意に低下している。グラフは独立して行なった 3 回のデータの平均値および標準偏差を示す。なお、統計処理には Mann-Whitney U 検定を用いている (* $p < 0.05$)。scale bars: 100 μm 。

siCtrl: scrambled siRNA 導入 SQUU-B 細胞。

siCK19: CK19 siRNA 導入 SQUU-B 細胞。

考 察

本研究では、 Δ Np63 を介した OSCC の浸潤メカニズムを解明するために、癌の浸潤との関与が示唆されている CK19 に着目し、OSCC における CK19 の発現と機能について検討した。

まず最初に、OSCC 原発巣および頸部リンパ節転移巣における CK19 の発現を免疫組織化学的手法により検索した。原発巣における CK19 高発現群では、分化度が低く、浸潤様式が 4C/4D である症例が多かった。Prasad らは、OSCC において CK19 の発現を免疫組織化学的に検索したところ、高分化型 OSCC に比べ低分化型において CK19 陽性細胞が多かったことを報告している (37)。また、Zhong らは、OSCC 患者 33 名の原発巣の腫瘍組織を用いて CK19 遺伝子とタンパクの発現を real-time PCR 法と免疫組織化学的染色法にて検索したところ、Prasad らの報告と同様に腫瘍細胞の分化度が低いものほど CK19 の発現が高かったと述べている (39)。これらの報告のように、OSCC における CK19 の発現は分化度と関連しているとの報告が多く、われわれの研究においても同様の結果であった (38, 44)。一方、Ernst らは、舌癌 129 例を対象に CK19 の発現を免疫組織化学的に検索し、病理組織学的所見との関連を検討したところ、CK19 の発現と OSCC の分化度との間には有意な相関関係は認められなかったと報告している (36)。このように、Ernst らの研究結果が他の報告と異なった要因として、CK19 陽性細胞の評価法や陽性細胞率の算出方法が同一ではないこと、用いた一次抗体の種類が異なることなどが考えられる。また、Ernst らの研

究では、われわれと異なり、対象を舌癌症例のみ限定していることも要因の一つと考えられる。本来 CK19 は、正常口腔粘膜上皮において上皮幹細胞が存在する基底層に限局して発現しており、粘膜上皮幹細胞のマーカーとしてよく知られている。肝臓においても CK19 は肝幹細胞のマーカーとして認知されていることから、未分化な上皮細胞で強く発現するものと推察される。故に、本研究のように分化度が低い OSCC で高発現していたとしても、特に矛盾はないものと考えられる。

また本研究では、原発巣において CK19 の発現が高い症例は、頸部リンパ節転移の発生頻度が有意に高いことを示した。従来より、OSCC の頸部リンパ節転移は腫瘍細胞の分化度や浸潤先端部の浸潤様式と強く相関することが知られている。すなわち、低分化な腫瘍や癌胞巣をほとんど形成することなく、びまん性に浸潤する腫瘍は高頻度にリンパ節転移を認める。前述のように、本研究で原発巣における CK19 の発現様式が、分化度や浸潤様式と相関していることを明らかにした。そこで、ロジスティック回帰分析による多変量解析を行い、OSCC の頸部リンパ節転移に最も影響を及ぼす因子を検索したところ、浸潤様式や分化度とは独立して CK19 の発現様式が頸部リンパ節転移の唯一の予測因子となり得ることが明らかとなった。Ernst らは、OSCC の CK19 陽性群では陰性群と比較して、有意差は認められなかったものの、頸部リンパ節転移の発生頻度が高かったと述べている (36)。われわれもまた、同一患者より樹立した OSCC 低転移株 (SQUU-A) と高転移株 (SQUU-B) における CK19 の発現量を western blotting にて比較検討したところ、SQUU-B 細胞において CK19 の発現量が多いことを報告した (45)。これらの知見は、CK19 が頸部リンパ節転移の有用な

予測因子となり得ること支持する研究結果であると考えられる。

さらに本研究では、頸部リンパ節転移巣における CK19 の発現についても免疫組織化学的法により検索し、原発巣における CK19 の発現様式と比較検討した。その結果、原発巣と転移巣における CK19 の発現様式は、きわめて類似しており、転移巣における CK19 の発現は、原発巣の CK19 の発現様式を反映していることが明らかとなった。Noorlag らは、早期舌癌症例でセンチネルリンパ節生検を行う際に、潜在的頸部リンパ節転移のバイオマーカーとしての CK19 の有用性を検討している。彼らは、研究論文の中で CK19 を転移リンパ節のバイオマーカーとして臨床応用するには、感度、特異度ともに不十分であったと述べており (46)、この要因として考えられるのが、転移巣において CK19 の発現を認めない症例の存在である。本研究においても、一部の症例では転移巣において CK19 の発現が認められなかったが、これらの患者は原発巣においても CK19 の発現を認めなかった。そのため、OSCC 患者でセンチネルリンパ節生検を行う際は、あらかじめ生検により原発巣での CK19 の発現を確認し、その発現が認められない場合は、転移巣でも CK19 が発現していない可能性があることを念頭に入れて検査を行わなければならないと考えられた。

CK19 の発現と OSCC 患者の予後との関連では、CK19 陽性症例は陰性症例と比較して生存率が低いとする報告が多い (36, 39)。本研究においても統計学的有意差を認めないものの、これらと同様の結果であった。前述のように、CK19 を高発現している OSCC 患者では、最も重要な予後因子である頸部リンパ節転移が高頻度に認められたことが生存率低下の要因の 1 つと考えられる。これらのことから、CK19 は頸部リンパ節転移の予測因子としてだけでなく、OSCC 患

者の予後を予測するバイオマーカーとしても有用である可能性が示めされた。

さらにわれわれは、OSCCにおけるCK19の機能についても検討を行なった。その際、先行研究にてOSCCの浸潤との関連が示された Δ Np63との関連についても検討を行った。その結果、高浸潤能を有する癌細胞が多く存在する浸潤先端部でCK19が強く発現している一方、 Δ Np63の発現はほとんど認められず、両者の発現は逆相関していることが明らかとなった。さらに、OSCC細胞で Δ Np63をノックダウンすると、CK19の発現が有意に増強し、CK19をノックダウンするとOSCC細胞の遊走能や浸潤能が著明に抑制された。このことから、 Δ Np63の発現減弱によりCK19の発現が増強することで癌の浸潤能が促進されることが示唆された。しなしながら、 Δ Np63の発現減弱がどのようなメカニズムでCK19の発現を制御しているかは本研究では明らかにできなかった。

Δ Np63がCK19の発現を制御する分子機構にEMTが関与している可能性がある。EMTは、1980年代にHayにより提唱された概念であり、上皮細胞において間葉系細胞様の形態と形質が誘導される現象である。EMTは器官形成期において必須のプロセスである一方で、癌細胞が浸潤する際にもEMTが誘導されることが明らかとなっている。癌細胞はEMT形質を獲得すると、細胞間接着が減弱することにより原発巣から離脱し、さらに細胞骨格の再構築により運動能が亢進されることで、周囲組織への浸潤ならびに標的臓器への転移を容易に行っていると考えられる(47-54)。この概念が提唱されて以降、癌のEMTに関連する因子が徐々に解明されており、特にsnail、slug、zinc-finger E-box binding homeobox (ZEB) 1、ZEB 2およびtwistなどの転写因子が、上皮系マーカーのE-cadherinの発現を抑制して、EMTを誘導することが報告されている(55-

57)。Higashikawa らは、OSCC において snail を過剰発現させると Δ Np63 α の発現が抑制され、癌が EMT 形質を獲得することを示している (58)。われわれもまた、 Δ Np63 の発現減弱により、上皮系マーカーの発現減弱および間葉系マーカーや EMT 関連遺伝子の発現増強から、EMT が誘導され、癌の浸潤能が促進されることを示した。

われわれは先行研究において、 Δ Np63 の発現減弱を介して EMT が誘導される分子機構の 1 つとして、Wnt5a とそのレセプターである receptor tyrosine kinase-like orphan receptor (Ror) 2 シグナル経路が関与している可能性を報告した。Wnt5a は、脂質修飾をうけた分泌型糖タンパク質である Wnt ファミリーの 1 つであり、Wnt の受容体としては、Frizzled (Fzd) 受容体、low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP) 5、LRP6、Ror1、Ror2 および related to tyrosin kinase (Ryk) などが存在する (59-62)。特に Wnt5a は Ror2 と結合して、細胞極性および細胞運動において重要な役割を果たしており (63, 64) Wnt5a や Ror2 は肺扁平上皮癌、皮膚扁平上皮癌、骨肉腫、平滑筋肉腫において高発現している (65-68)。われわれは OSCC 細胞において Wnt5a または Ror2 をノックダウンすると、OSCC の浸潤能が抑制されることを示した。また、その際に CK19 の発現が減弱していたことから、CK19 は Wnt5a-Ror2 シグナルの制御を受けていることが示唆された。さらに Wnt5a-Ror2 シグナルにより細胞外基質分解酵素である matrix metalloproteinase (MMP) 2 の分泌が促進され、癌の浸潤能が亢進することを明らかにした (69)。以上のことから、 Δ Np63 の発現減弱により Wnt5a-Ror2 シグナルを介して EMT が誘導され、CK19 の発現が増強されるとともに MMP-2 の分泌が促進され、その結果癌の浸潤能が

亢進することが考えられた。

近年の研究により、CK19 は単なる細胞骨格としての機能のみならず、 β -catenin や RAS-related C3 botulinus toxin substrate (RAC) 1 と複合体を形成することで転写因子として機能していることが明らかとなってきた (70)。そのため、今後は OSCC における CK19 の転写因子としての役割についても検討するとともに、Wnt シグナル伝達経路を介した OSCC の運動能と CK19 との関連についてさらに研究を進める必要がある。将来的に OSCC の浸潤メカニズムが明らかにされた暁には、癌の浸潤や転移を規定する因子やシグナル伝達系を同定し、新たながん治療薬の創成の一助となるものと考えられる。

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を賜りました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 教授に深甚なる謝意を表します。また、直接御指導、御校閲を頂きました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 川野真太郎 講師に深謝致します。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研究院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致します。

参 考 文 献

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics. *CA cancer J Clin.* 2018; 68: 394–424.
2. Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol.* 2009; 45: 309–316.
3. Gupta B, Johnson NW, Kumar N. Global epidemiology of head and neck cancers. *Oncology.* 2016; 91: 13–23.
4. Capote-Moreno A, Naval L, Munoz-Guerra MF, Sastre J, Rodriguez-Campo FJ. Prognostic factors influencing contralateral neck lymph node metastases in oral and oropharyngeal carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg.* 2010; 68: 268–275.
5. Sano D, Myers JN. Metastasis of squamous cell carcinoma of the oral tongue. *Cancer Metastasis Rev.* 2007; 26: 645–662.
6. Kowalski LP, Bagietto R, Lara JR, Santos RL, Silva JF, Jr., Magrin J. Prognostic significance of the distribution of neck node metastasis from oral carcinoma. *Head Neck.* 2000; 22: 207–214.
7. Goerres GW, Schmid DT, Gratz KW, von Schulthess GK, Eyrich GK. Impact of whole body positron emission tomography on initial staging and therapy in patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Oral Oncol.* 2003; 39: 547–551.
8. Teknos TN, Rosenthal EL, Lee D, Taylor R, Marn CS. Positron emission tomography in the evaluation of stage III and IV head and neck cancer. *Head Neck.* 2001; 23: 1056–1060.
9. Araki Y, Okada Y, Izumi M, and Katagiri M. An Analysis of Distant Metastases in Oral Squamous Cell Carcinoma. *J Hard Tissue Biol.* 2010; 19: 27–32.
10. Kawano S, Zheng Y, Oobu K, Matsubara R, Goto Y, Chikui T, *et al.* Clinicopathological evaluation of pre-operative chemoradiotherapy with

- S-1 as a treatment for locally advanced oral squamous cell carcinoma. *Oncol Lett.* 2016; 3369–3376.
11. Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer.* 2003; 3: 453–458.
 12. Woodhouse EC, Chuaqui RF, Liotta LA. General mechanisms of metastasis. *Cancer.* 1997; 80: 1529–1537.
 13. Liotta LA, Rao CN, Barsky SH. Tumor invasion and the extracellular matrix. Laboratory investigation; *J Tech Met Pathol.* 1983; 49: 636–649.
 14. Hanahan D and Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000; 100: 57–70.
 15. Stacker SA, Achen MG, Jussila L, Baldwin ME, Alitalo K. Lymphangiogenesis and cancer metastasis. *Nat Rev Cancer.* 2002; 2: 573–583.
 16. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell.* 1996; 86: 353–364.
 17. Sahai E. Illuminating the metastatic process. *Nat Rev Cancer.* 2007; 7: 737–749.
 18. Yang A, Kaghad M, Wang Y, Gillett E, Fleming MD, Dotsch V, *et al.* p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol Cell.* 1998; 2: 305–316.
 19. Ikawa S, Nakagawara A, Ikawa Y. p53 family genes: structural comparison, expression and mutation. *Cell Death Differ.* 1999; 6: 1154–1161.
 20. Augustin M, Bamberger C, Paul D, Schmale H. Cloning and chromosomal mapping of the human p53-related KET gene to chromosome 3q27 and its murine homolog Ket to mouse chromosome 16. *Mammalian Genome: Official Journal of the International Mammalian Genome Society.* 1998; 9: 899–902.
 21. Trink B, Okami K, Wu L, Sriuranpong V, Jen J, Sidransky D. A new human p53 homologue. *Nat Med.* 1998; 4: 747–748.

22. Jost CA, Marin MC, Kaelin WG, Jr. p73 is a simian [correction of human] p53-related protein that can induce apoptosis. *Nature*. 1997; 389: 191–194.
23. Hagiwara K, McMenamin MG, Miura K, Harris CC. Mutational analysis of the p63/p73L/p51/p40/CUSP/KET gene in human cancer cell lines using intronic primers. *Cancer Res*. 1999; 59: 4165–4169.
24. Higashikawa K, Yoneda S, Tobiume K, Saitoh M, Taki M, Mitani Y, *et al*. DeltaNp63alpha-dependent expression of Id-3 distinctively suppresses the invasiveness of human squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*. 2009; 12: 2837–44.
25. DeCastro AJ, Cherukuri P, Balboni A, DiRenzo J. ΔNP63α transcriptionally activates chemokine receptor 4 (CXCR4) expression to regulate breast cancer stem cell activity and chemotaxis. *Mol Cancer Ther*. 2015; 14: 225–35.
26. Citro S, Bellini A, Miccolo C, Ghiani L, Carey TE, Chiocca S. Synergistic antitumour activity of HDAC inhibitor SAHA and EGFR inhibitor gefitinib in head and neck cancer: a key role for ΔNp63α. *Br J Cancer*. 2019; 120: 658–667.
27. Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B and Krepler R. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell*. 1982; 31: 11–24.
28. Moll R, Krepler R, and Franke WW. Complex cytokeratin polypeptide patterns observed in certain human carcinomas. *Differentiation* 1983; 23: 256–269.
29. Wu YJ and Rheinwald JG. A new small (40 kd) keratin filament protein made by some cultured human squamous cell carcinomas. *Cell*. 1981; 25: 627–635.
30. Sugama Y, Kitamura S, Kawai T, Ohkubo A, Hasegawa S, Kuriyama T, *et al*. Clinical usefulness of CYFRA assay in diagnosing lung cancer: measurement of serum cytokeratin fragment. *Jpn J Cancer Res*. 1994; 85: 1178–1184.

31. Wieskopf B, Demangeat C, Purohit A, Strenger R, Gries P, Kreisman H, *et al.* Cyfa21-1 as a biologic marker of non-small cell lung cancer. *Chest.* 1995; 108: 163–169.
32. Takahashi H, Kurishima K and Ishikawa H. Optimal cutoff points of CYFRA21-1 for survival prediction in non-small cell lung cancer patients based on running statistical analysis. *Anticancer Res.* 2010; 30: 3833–3837.
33. Ju JH, Yang W, Lee KM, Oh S, Nam K, Shim S, *et al.* Regulation of cell proliferation and migration by keratin19-induced nuclear import of early growth response-1 in breast cancer cells. *Clin Cancer Res.* 2013; 19: 4335–4346.
34. Saha SK, Yin Y, Chae HS and Cho SG. Opposing Regulation of Cancer Properties via KRT19-Mediated Differential Modulation of Wnt/ β -Catenin/Notch Signaling in Breast and Colon Cancers. *Cancers (Basel).* 2019; 15: 11.
35. Govaere O, Komuta M, Berkers J, Spee B, Janssen C, de Luca F, *et al.* Keratin 19: a key role player in the invasion of human hepatocellular carcinomas. *Gut.* 2014; 63: 674–685.
36. Ernst J, Ikenberg K, Apel B, Schumann DM, Huber G, Studer G, *et al.* Expression of CK19 is an independent predictor of negative outcome for patients with squamous cell carcinoma of the tongue. *Oncotarget.* 2016; 7: 76151–76158.
37. Ram Prasad VV, Nirmal NR, Kotian MS. Immunohistochemical evaluation of expression of cytokeratin 19 in different histological grades of leukoplakia and oral squamous cell carcinoma. *Indian J Dent Res.* 2005; 16: 6–11.
38. Zhong LP, Zhao SF, Chen GF, Ping FY, Xu ZF, Hu JA. Increased levels of CK19 mRNA in oral squamous cell carcinoma tissue detected by relative quantification with real-time polymerase chain reaction. *Arch Oral Biol.* 2006; 51: 1112–1119.
39. Zhong LP, Chen WT, Zhang CP, Zhang ZY. Increased CK19 expression correlated with pathologic differentiation grade and prognosis in oral

- squamous cell carcinoma patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Endod.* 2007; 104: 377–384.
40. Amin MB, Edge SB, Greene FL, et al. *AJCC cancer staging manual* (8th ed.), Springer, New York; 2017.
 41. Gale N, Pilch BZ, D S. Epithelial precursor lesions. *World Health Organization Classification of Tumors.* 2005: 177–179.
 42. Yamamoto E, Kohama G, Sunakawa H, Iwai M, Hiratsuka H. Mode of invasion, bleomycin sensitivity, and clinical course in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer.* 1983; 51: 2175–2180.
 43. 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. *Am J Pathol.* 2000; 156: 1317–1326.
 44. Bombeccari GP, Gianni AB, Spadari F. Immunoexpression of cytokeratin-19 in the oral lichen planus and related oral squamous cell carcinoma. *Ann Stomatol (Roma).* 2018; 8: 104–109.
 45. Morifuji M, Taniguchi S, Sakai H, Nakabeppu Y, and Ohishi M. Differential expression of cytokeratin after orthotopic implantation of newly established human tongue cancer cell lines defined metastatic ability. *Am J Pathol.* 2000; 156: 1317-26.
 46. Noorlag R, van Es RJJ, de Bree, Willems SM. Cytokeratin 19 expression in early oral squamous cell carcinoma and their metastasis: Inadequate biomarker for one-step nucleic acid amplification implementation in sentinel lymph node biopsy procedure. *Head Neck.* 2017; 39: 1864–1868.
 47. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer.* 2002; 2: 442–454.
 48. Potenta S, Zeisberg E, Kalluri R. The role of endothelial-to-mesenchymal transition in cancer progression. *Br J Cancer.* 2008; 99: 1375–1379.
 49. Hugo H, Ackland ML, Blick T, Lawrence MG, Clements JA, Williams ED, *et al.* Epithelial--mesenchymal and mesenchymal--epithelial transitions in carcinoma progression. *J Cellular Physiol.* 2007; 213: 374–383.

50. Greenburg G, Hay ED. Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. *J Cell Biol.* 1982; 95: 333–339.
51. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 2009; 119: 1420–1428.
52. Zeisberg M, Neilson EG. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest.* 2009; 119: 1429–1437.
53. Christiansen JJ, Rajasekaran AK. Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. *Cancer Res.* 2006; 66: 8319–8326.
54. Yang J, Weinberg RA. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell.* 2008; 14: 818–829.
55. Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer.* 2007; 7: 415–428.
56. Wu SY, Yang YP, McClay DR. Twist is an essential regulator of the skeletogenic gene regulatory network in the sea urchin embryo. *Dev Biol.* 2008; 319: 406–415.
57. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell.* 2009; 139: 871–890.
58. Higashikawa K, Yoneda S, Tobiume K, Taki M, Shigeishi H, Kamata N. Snail-induced down-regulation of DeltaNp63alpha acquires invasive phenotype of human squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 2007; 67: 9207–9213.
59. Anastas JN, Moon RT. Wnt signalling pathways as therapeutic targets in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2013; 13: 11–26.
60. Kikuchi A, Yamamoto H and Sato A. Selective activation mechanisms of Wnt signaling pathways. *Trends Cell Biol.* 2009; 19: 119–129.
61. Angers S and Moon RT. Proximal events in Wnt signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009; 10: 468–77.

62. Li C, Chen H, Hu L, Xing Y, Sasaki T, Villosis MF, *et al.* Ror2 modulates the canonical Wnt signaling in lung epithelial cells through cooperation with Fzd2. *BMC Mol Biol.* 2008; 23: 9: 11.
63. Nishita M, Enomoto M, Yamagata K, Minami Y. Cell/tissue-tropic functions of Wnt5a signaling in normal and cancer cells. *Trends Cell Biol.* 2010; 20: 346–54.
64. Kikuchi A, Yamamoto H, Sato A, and Matsumoto S. Wnt5a: its signaling, functions and implication in diseases. *Acta Physiol.* 2012; 204: 17–33.
65. Lu C, Wang X, Zhu H, Feng J, Ni S, and Huang J. Overexpression of ROR2 and Wnt5a cooperatively correlates with unfavorable prognosis in patients with non-small cell lung cancer. *Oncotarget.* 2015; 6: 24912–21.
66. Pourreyron C, Reilly L, Proby C, Panteleyev A, Fleming C, McLean K, S, *et al.* Wnt5a is Strongly Expressed at the Leading Edge in Non-Melanoma Skin Cancer, Forming Active Gradients, while Canonical Wnt Signalling is repressed. *Plos Ons.* 2012; 7: e31827.
67. Edris B, Espinosa I, Muhlenberg T, Mikels A, Lee CH, Steigen SE, *et al.* ROR2 is a novel prognostic biomarker and a potential therapeutic target in leiomyosarcoma and gastrointestinal stromal tumour. *J Pathol.* 2012; 227: 223–33.
68. Lu BJ, Wang YQ, Wei XJ, Rong LQ, Wei D, Yan CM, *et al.* Expression of WNT-5a and ROR2 correlates with disease severity in osteosarcoma. *Mol Med Rep.* 2012; 5: 1033–6.
69. Sakamoto T, Kawano S, Matsubara R, Goto Y, Jinno T, Maruse Y, *et al.* Critical roles of Wnt5a-Ror2 signaling in aggressiveness of tongue squamous cell carcinoma and production of matrix metalloproteinase-2 via Δ Np63 β -mediated epithelial-mesenchymal transition. *Oral Oncol.* 2017; 69: 15–25.
70. Saha SK, Choi HY, Kim BW, Dayem AA, Yang GM, Kim KS, *et al.* KRT19 directly interacts with β -catenin/RAC1 complex to regulate NUMB-dependent NOTCH signaling pathway and breast cancer properties. *Oncogene.* 2017; 19: 332–349.