



Ror2 expression in squamous cell carcinoma and epithelial dysplasia of the oral cavity

小林, 正樹

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2008-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲4469

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004469>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏 名	小林 正樹
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学 位 記 番 号	博い第 4469 号
学位授与の 要 件	学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の 日 付	平成 20 年 9 月 25 日

【 学位論文題目 】

Ror2 expression in squamous cell carcinoma and epithelial dysplasia of the oral cavity（口腔扁平上皮癌および上皮異形成における Ror2 の発現）

審 査 委 員

主 査	教 授	丹生 健一
	教 授	田原 真也
	教 授	横崎 宏

【目的】近年、Ror ファミリー受容体型チロシンキナーゼの一員である Ror2 が、細胞極性や細胞運動と関連する PCP 経路を制御する Wnt5a の受容体として機能することが明らかとなり、さらにヒトの胃癌や肺癌、黒色腫においては Wnt5a の発現の亢進を認めるとの報告もみられる。また Ror2 によって引き起こされる 糸状仮足 (filopodia) の形成は、癌の浸潤や転移に不可欠と考えられる。そこで今回われわれは、Ror2 と癌との関わりについて着目し、口腔扁平上皮癌および上皮異形成における Ror2 の発現の有無とその部位を調べ、Ror2 と口腔癌との関わりについての検討することを目的として研究を行った。

【材料及び方法】正常口腔粘膜 (3 例) および口腔扁平上皮癌 (Stage I 1 例、Stage II 3 例、Stage IV 1 例で術後病理診断で筋層浸潤のあるもの) の手術標本を用いてウエスタンブロット法と免疫組織染色法にて Ror2 の発現とその局在を比較検討した。次に早期舌扁平上皮癌 (Stage I - II で術後病理組織診断で筋層浸潤のないもの 11 例)、および上皮異形成 (17 例) を対象とし Ror2、p53、Ki67、PCNA の免疫染色を行い、その発現部位、発現頻度について比較検討した。

【結果】ウエスタンブロット法による解析において、Ror2 は正常口腔粘膜に比べ癌組織でその発現が強く認められた。また免疫組織染色法において、Ror2 は主に細胞膜と細胞質内に局在していた。また p53、Ki67、PCNA との発現部位の比較では、上皮内癌または上皮異形成の場合は、p53、Ki67、PCNA は主に基底細胞層に発現を認めたが、Ror2 は主に有棘細胞層で発現を認めた。一方、浸潤癌においては p53、Ki67、PCNA は腫瘍浸潤先端部で多く発現を認めたが、Ror2 に関しては腫瘍胞巣の中心部や腫瘍辺縁部などさまざまな場所で発現が確認された。発現量は癌化 (軽度上皮異形成→高度上皮異形成→浸潤癌) に伴い Ror2、p53、Ki67、PCNA とともに増加傾向にあり、特に Ror2 と PCNA との間に統計学的相関関係が認められた。

【考察】Wnt はシステインに富む分子量約 4 万の分泌性糖蛋白質であり、生物種を超えて保存され、哺乳類においては約 20 種類の Wnt 遺伝子が同定されている。そのシグナル伝達系は canonical (古典的) 経路と non-canonical (非古典的) 経路の 2 つに大きく区分されている。哺乳動物細胞において、Wnt5a によって Fz4 のエンドサイトーシスが促進されることが Chen W らによって報告された。それらによると Wnt 刺激が無い場合は Fz4 は細胞膜に存在するが Wnt5a 刺激によって Fz4 は Dvl-2 とアダプタータンパク質の β -アスレチン 2 依存性にエンドサイトーシスが誘導され Fz4 が細胞質内に移行する。この際 Dvl2 は Fz4 と β -アスレチン 2 の複合体形成を促進し Fz4 のエンドサイトーシスを促進すると考えられている。これらが細胞内シグナル伝達の引き金になるのではないかと考えられている。Ror2 においてもシグナル伝達に Ror 2 自身または細胞内ドメインがゴルジ体や小胞体ミトコンドリアといった細胞内組織やあるいは核に取り込まれてシグナル伝達を行っている可能性が示唆された。

さて Ror2 は Wnt5a の受容体として、Wnt/JNK 経路を起動させたり、転写活性を制御する β -カテニン/TCF 経路を抑制するといった働きをすることが最近明らかにされた。一方

Macleod RJ らは、大腸がん細胞において野生タイプの Ror2 の過剰発現は Wnt5a による β -カテニン/TCF 経路の抑制を促進させるが、細胞内ドメインが削除された変異型 Ror2 は過剰発現した Ror2 や Wnt5a に対して抑制的に働くことを報告している。つまり正常組織での Wnt5a/Ror2 の発現は β -カテニン/TCF 経路を抑制し細胞の増殖を制御していると考えられるが、癌などでは細胞増殖能が亢進していると考えられるため、さまざまな人の癌での Wnt5a の増加の報告や今回の癌においての Ror2 の過剰発現の結果とは矛盾する。従って癌で発現が亢進している Wnt5a や Ror2 は、正常な機能を果たせない変異体である可能性も否定できないと思われた。

一方 Schambony A、らは Wnt5a/Ror2 をノックアウトするとゼノプス胚の収束伸張 (CE) が抑制されることを示し、逆に Hikasa H らは Ror2 を過剰発現させてもゼノプス胚の CE を抑制することを報告した。Ror2 がマウス胚繊維芽細胞において糸状仮足構造形成に必要であることが報告されており、これらのことから Wnt5a または Ror2 をノックアウトした場合は糸状仮足の形成がされず CE が抑制され、逆に Wnt5a または Ror2 の過剰発現は糸状仮足形成を促進するが、仮足の方角性がランダムに形成されるため極性を失い CE が抑制されると考えられている。従って今回 Ror2 が発現している癌胞巣部分では細胞の運動性が亢進し、かつ極性が失われているとも考えられる。Ror2 が細胞の運動性亢進に関与している理由として他に Nishita らがアニマルキャップ (未分化細胞塊) を用いて JNK の機能が CE に必須であることを示し、Jackson らはそれまで転写制御が主な機能と考えられてきた JNK の役割が細胞の移動性にも重要であることを示している。彼らは培養細胞を用いた実験からインテグリンを介した接着性や移動性に重要と考えられる接着斑のコンポーネントである Paxillin の 178 番目のセリン残基が JNK によるリン酸化を受け、細胞の移動性を大きく変化させることを示した。Ror2 が JNK の活性を誘発することから Ror2 と細胞の運動性の亢進との間には深い関係があると考えられた。

PCNA は細胞周期依存性非ヒストン核内蛋白質で細胞周期の G1 後期から S 期にかけて核内に存在するものであり、DNA 合成に重要な役割を果たす DNA polymerase δ の補助蛋白である。また Ki67 は増殖細胞中に存在する抗原ですべての細胞周期の細胞核に発現する蛋白である。p53 は DNA 障害時に DNA が適切に修復されるよう細胞増殖を制御し、DNA 障害が顕著な時はアポトーシスを誘導することで、癌細胞増殖を抑制している。何らかの原因で p53 遺伝子が損傷を受けると、細胞にアポトーシスが誘導されにくくなり、p53 の癌細胞増殖抑制が阻害される。その結果、腫瘍細胞での発現を認めるようになるとされている。これらのマーカーは細胞増殖の指標となりうるもので、上皮性異形成症では比較的軽度の異型細胞から発現を認め、異型度が高くなるほど発現量の増加をみとめ、その発現部位は基底細胞層が中心で異型性が高度になればなるほど有棘細胞層へ広がりを見せるとされている。一方 Ror2 は有棘細胞層での発現が中心であり、細胞増殖が旺盛な部位での発現は比較的少なかった。また浸潤癌においても p53、Ki67、PCNA の発現領域と Ror2 の発現領域がクロスオーバーする部位もみられたが、明瞭に区別される部分も多く見られ

た。以上より Ror2 は細胞自体の極性が失われ、運動能が亢進している部分を染め出しており、細胞増殖が旺盛な部位では発現が少ないと考えられた。また今回の結果で Ror2 は PCNA と正の相関関係が認められ、p53、Ki67 とは弱い正の相関関係が認められたが、この点については組織の悪性度が上昇することによる付随的なものと考えられた。

【まとめ】今回の実験において Ror2 が正常歯肉に比べ口腔扁平上皮癌において発現量の増加を認め、粘膜が軽度異型→高度異型→浸潤癌と変化するに伴い Ror2 の発現量は増加していく傾向が明らかとなった。その発現は基底細胞層にはあまり見られず、むしろ有棘細胞層付近に発現が多くみられる傾向にあり、また浸潤癌においても、p53 および細胞増殖因子と Ror2 とは異なる局在傾向を示した。これは Ror2 が細胞増殖ではなく、細胞極性や細胞運動能と深く関連しているためと思われた。今後は Wnt5a/Ror2 の発現やその分布が癌巣の浸潤能や転移などどのように関連するのかについて研究を行っていきたい。

神戸大学大学院医学系研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨			
受 付 番 号	甲 第 1 9 6 0 号	氏 名	小 林 正 樹
論 文 題 目	Ror2 expression in squamous cell carcinoma and epithelial dysplasia of the oral cavity 口腔扁平上皮癌および上皮異形成における Ror2 の発現		
審 査 委 員	主 査 丹 生 健 一 副 査 田 原 真 也 副 査 横 崎 宏		
審 査 終 了 日	平成 2 0 年 1 1 月 2 1 日		

【緒言】 近年、Ror ファミリー受容体型チロシンキナーゼの一員である Ror2 が、細胞極性や細胞運動と関連する PCP 経路を制御する Wnt5a の受容体として機能することが明らかとなり、さらにヒトの胃癌や肺癌、黒色腫においては Wnt5a の発現の亢進を認めるとの報告もみられる。また Ror2 によって引き起こされる糸状仮足 (filopodia) の形成は、癌の浸潤や転移に不可欠と考えられる。そこで申請者らは、Ror2 と癌との関わりについて着目し、口腔扁平上皮癌および上皮異形成における Ror2 の発現の有無とその部位を調べ、Ror2 と口腔癌との関わりについての検討することを目的として本研究が行われた。

【材料及び方法】 正常口腔粘膜 (3 例) および口腔扁平上皮癌 (Stage I 1 例、Stage II 3 例、Stage IV 1 例で術後病理診断で筋層浸潤のあるもの) の手術標本を用いてウエスタンブロット法と免疫組織染色法にて Ror2 の発現とその局在の比較検討が行われた。次に早期舌扁平上皮癌 (Stage I - II で術後病理組織診断で筋層浸潤のないもの 11 例)、および上皮異形成 (17 例) を対象とし Ror2、p53、Ki67、PCNA の免疫染色が行われ、その発現部位、発現頻度についての比較検討が行われた。

【結果】 ウエスタンブロット法による解析において、Ror2 は正常口腔粘膜に比べ癌組織でその発現が強く認められた。また免疫組織染色法において、Ror2 は主に細胞膜と細胞質内に局在していた。また p53、Ki67、PCNA との発現部位の比較では、上皮内癌または上皮異形成の場合は、p53、Ki67、PCNA は主に基底細胞層に発現を認めたが、Ror2 は主に有棘細胞層で発現を認めた。一方、浸潤癌においては p53、Ki67、PCNA は腫瘍浸潤先端部で多く発現を認めたが、Ror2 に関しては腫瘍胞巣の中心部や腫瘍辺縁部などさまざまな場所で発現が確認された。発現量は癌化 (軽度上皮異形成→高度上皮異形成→浸潤癌) に伴い Ror2、p53、Ki67、PCNA ともに増加傾向にあり、特に Ror2 と PCNA との間に統計学的相関関係が認められた。

【考察】 過去の報告によると Wnt5a または Ror2 をノックアウトした場合は糸状仮足の形成がされずゼノプス胚の収束伸張 (CE) が抑制され、逆に Wnt5a または Ror2 の過剰発現は糸状仮足形成を促進するが、仮足の方向性がランダムに形成されるため極性を失い CE が抑制されると考えられている。従って今回 Ror2 が発現している癌胞巣部分では細胞の運動性が亢進し、かつ極性が失われているとも考えられる。Ror2 が細胞の運動性亢進に関与している理由として他に Nishita らがアニマルキャップ (未分化細胞塊) を用いて JNK の機能が CE に必須であることを示し、Jackson らはそれまで転写制御が主な機能と考えられてきた JNK の役割が細胞の

移動性にも重要であることを示している。Ror2 は Wnt5a の受容体として、Wnt/JNK 経路を起動させることから Ror2 と細胞の運動性の亢進との間には深い関係があると考えられた。一方、Ror2 が JNK の活性を誘発する以外に転写活性を制御する β -カテニン/TCF 経路を抑制するといった働きをすることが最近明らかにされている。Macleod RJ らは、大腸がん細胞において野生タイプの Ror2 の過剰発現は Wnt5a による β -カテニン/TCF 経路の抑制を促進させるが、細胞内ドメインが削除された変異型 Ror2 は過剰発現した Ror2 や Wnt5a に対して抑制的に働くことを報告している。つまり正常組織での Wnt5a/Ror2 の発現は β -カテニン/TCF 経路を抑制し細胞の増殖を制御していると考えられるが、癌などでは細胞増殖能が亢進していると考えられるため、さまざまな人の癌での Wnt5a の増加の報告や今回の癌における Ror2 の過剰発現の結果とは矛盾している。従って癌で発現が亢進している Wnt5a や Ror2 は、正常な機能を果たせない変異体である可能性も否定できないと思われた。

p53、Ki67、PCNA の発現部位と Ror2 の発現部位との相違を認めたことについては、Ror2 が、細胞自体の極性が失われ、かつ運動能が亢進している部分を染め出し、逆に細胞増殖が旺盛な部位では発現が少ないことが影響しているのではないかと考えられた。また Ror2 は PCNA と正の相関関係が認められ、p53、Ki67 とは弱い正の相関関係が認められたが、この点については組織の悪性度が上昇することによる付随的なものと考えられた。

哺乳動物細胞において、Wnt5a によって Frizzled4 (Fz4) のエンドサイトーシスが促進されることが Chen W らによって報告され、Fz4 自体が細胞内シグナル伝達の引き金になるのではないかと考えられている。今回の研究では膜貫通型タンパクである Ror2 が細胞質内にも認められたことから、シグナル伝達に Ror2 自身またはその細胞内ドメインがゴルジ体や小胞体、ミトコンドリアといった細胞内小器官に取り込まれてシグナル伝達を行っている可能性も示唆された。

本研究は、口腔癌やその前癌病変である上皮異形成における Ror2 の発現およびその局在、そして既存の増殖因子との発現部位の相違について研究したものであるが、今回の実験で得られた知見は今後の口腔癌と PCP 経路のかかわりについて重要な役割をはたすものと考えられる。よって、本研究者は博士 (医学) の学位を得る資格があると認める。