

平成 21 年 5 月 8 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19592109

研究課題名（和文） エナメル上皮腫におけるヘテロ接合性消失の検討

研究課題名（英文） Loss of heterozygosity analysis and its relationship with  
Clinicopathological features in ameloblastoma

研究代表者

長塚 仁（NAGATSUKA HITOSHI）

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：70237535

研究成果の概要：

腫瘍の発生には癌関連遺伝子の遺伝的変化が重要であることが知られている。本研究では、代表的な歯原性腫瘍であり、いまだ決定的治療法のないエナメル上皮腫について、腫瘍特異的な癌抑制遺伝子の同定と解析を目的とし、ヘテロ接合性消失解析による広範な遺伝子レベルでの検索を行った。結果からは、エナメル上皮腫瘍の再発や顎骨侵襲性に関連する癌抑制遺伝子の存在が示唆され、同腫瘍の特異性を解明する一助となる成果が見られた。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：口腔病理学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯学

キーワード：歯原性腫瘍、エナメル上皮腫、遺伝子解析、ヘテロ接合性、LOH 解析  
癌抑制遺伝子、ING ファミリー

## 1. 研究開始当初の背景

歯原性腫瘍特にエナメル上皮腫は、生物学的には良性とされているものの、顎骨侵襲性が高く、再発率が高いことが知られている。

さらに、再発エナメル上皮腫では細胞学的な悪性所見がみられ、癌化する例が経験される。また、組織学的、細胞学的には悪性所見を示さず転移を起こす症例のあることが報告されている。そのため、エナメル上皮腫は臨

床的に準悪性として取り扱われ、顎骨離断を含む広範な切除が求められることも多い。患者は30-40歳代に多いこともあり、これらの治療は患者のQOLに極めて多大な影響を与えている。

一方、腫瘍は良性の段階から複数の癌関連遺伝子に生じた遺伝的変化が蓄積した結果生じる。さらに悪性化に伴い転移を含む憎悪の段階を通じてさらなる遺伝子の変化を獲得す

ることが知られる。特に癌抑制遺伝子は、その欠失ないしは不活性化によって細胞に癌としての特性を持たせる遺伝子である。近年では、良性腫瘍の段階から癌遺伝子のみでなく癌抑制遺伝子にも異常が生じている可能性が示唆されている。

エナメル上皮腫の癌抑制遺伝子に関する研究は研究開始当初の段階では、代表的な癌抑制遺伝子であるp53等に関する免疫組織化学的手法を用いた研究が散見されるのみであり、遺伝子レベルでの癌抑制遺伝子に関する報告はごく限られた遺伝子を検討した報告が1件存在するのみであった (Nodit L. et al., Modern Pathology, 17, 1062-1067, 2004)。

研究代表者らは、歯胚・歯原性腫瘍での分化誘導因子、基底膜成分の同定に成果を上げるとともに、口腔癌における腫瘍特異的なヘテロ接合性消失 (LOH) の検出による新規癌抑制遺伝子候補の同定について成果を上げてきた。癌抑制遺伝子が細胞周期の制御に係わる場合、1つの遺伝子のみでなく、他のファミリー遺伝子が協力または拮抗して働いていることが考えられるため、エナメル上皮腫のような準悪性腫瘍では、複数の癌抑制遺伝子のヘテロ接合性消失が腫瘍の増殖性に大きく関わっている可能性が考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究では、エナメル上皮腫 (初発、再発例、高浸潤性、低浸潤性、各亜型等) について、遺伝子検索を行い、腫瘍特異的な癌抑制遺伝子候補を同定、解析することを目的とした。

得られる結果は歯原性腫瘍の特異性を解明する一助となり、顎骨切除法に代わる分子標的治療への応用により患者QOLの大幅な改善に寄与することが見込まれた。

## 3. 研究の方法

### (1) 歯原性腫瘍の材料収集

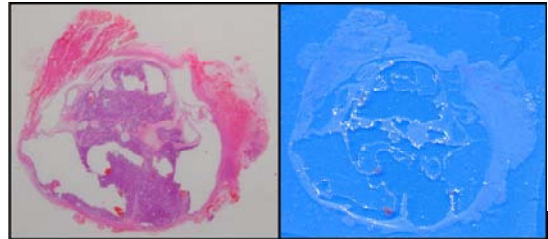
岡山大学病院病理部 (口腔病理部門) に保

存されているパラフィンブロックを使用した。歯原性腫瘍材料としてエナメル上皮腫を用い、WHO分類に従った組織学的分類を行った。

### (2) DNAの抽出

パラフィンブロックおよびホルマリン固定材料からのDNA抽出を行った。正常組織と主要組織の分離にはマイクロダイセクション法を用いた (図1)。

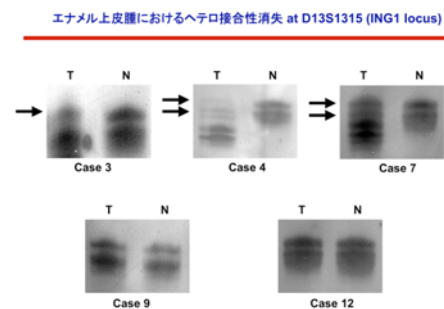
図1. マイクロダイセクションによる標的細胞の抽出



### (3) ヘテロ接合性消失解析

抽出したDNAについて、特異的マイクロサテライトマーカーを用いて癌抑制遺伝子候補を含む領域をPCR反応で増幅後、8%ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、銀染色にてDNAを検出した。腫瘍組織の相同染色体 (ヘテロ接合) の2本のDNAバンドのうちの1本が、正常組織のDNAバンドに比して50%以下の場合をLOHケースとして計測した (図2)。

図2. エナメル上皮腫におけるLOH



### (4) 臨床パラメータとLOHの関連の検討

LOH解析の結果と、原発例、再発例、組織学的特徴 (浸潤性など) を含んだ臨床データとの相関関係を統計処理により解析した。

## 4. 研究成果

### (1) 研究の主な成果について

数種類のマイクロサテライトマーカーを用いたgenome wideなスクリーニングの結果、エナメル上皮腫の発生と浸潤に関与すると考えられる癌抑制遺伝子候補として、INGが挙げられた。

INGは、代表的な癌抑制遺伝子であり、アポトーシスやDNA修復、細胞周期調節に重要な役割を果たすp53遺伝子と協力して機能する遺伝子であり、ING 1-5から成る遺伝子ファミリーを形成している。

検索したエナメル上皮腫の症例において、ING遺伝子ファミリーを含む領域に高頻度(33.3-72.2%)にLOHが検出された。LOHが検出された症例は、組織学的に浸潤性が強い傾向を示した。

INGファミリー遺伝子のLOHの有無と、臨床的特徴(年齢、性別、派生部位)、組織学的特徴(充実性、嚢胞型、初発例、再発例、浸潤性など)との関連性の検討では、充実性増殖を示す症例は有意にING2のLOH検出率が高いことが示された。

また、再発例ではING遺伝子ファミリーの複数において、LOH検出率が高い傾向が示された。

これらの結果から、エナメル上皮腫ではING遺伝子ファミリーがエナメル上皮腫の浸潤性、再発能の獲得に関与している可能性が示唆され、ING遺伝子ファミリーのヘテロ接合性消失が、腫瘍の予後予測因子と成りうる可能性がある。

#### (2) 結果の位置づけとインパクトについて

エナメル上皮腫における遺伝子レベルでの研究は、ごく限られた領域に関する報告が1件あるのみであり、組織学的特徴や臨床的特徴について検討した研究は現在まで報告されていない。

本研究で得られた結果は、①良性腫瘍であるエナメル上皮腫においても、共通する現象として癌抑制遺伝子に遺伝的变化が認められ、

その変化がエナメル上皮腫の生物学的な態度と関連性があることを示唆した点が、同腫瘍の特異性の解明に重要である。

#### (3) 今後の展望について

詳細な癌抑制遺伝子の機能解析のために、癌抑制遺伝子発現解析、mRNA発現解析、遺伝子変異解析を行う。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計14件)

① Borkosky SS, Gunduz M, Nagatsuka H, Beder LB, Gunduz E, Al Sheikh Ali M, Rodriguez AP, Cilek MZ, Tominaga S, Yamanaka N, Shimizu K, Nagai N, Frequent deletion of ING2 locus at 4q35.1 associates with advanced tumor stage in head and neck squamous cell carcinoma, J Cancer Res Clin Oncol, 135 巻5号 703-713 頁、2009年、査読有り

② Lefevre M, Gunduz M, Nagatsuka H, Gunduz E, Al Sheikh Ali M, Beder L, Fukushima K, Yamanaka N, Shimizu K, Nagai N, Fine deletion analysis of 1p36 chromosomal region in oral squamous cell carcinomas, J Oral Pathol Med, 38 巻1号 94-98 頁、2008年、査読有り

③ Katase N, Gunduz M, Beder L, Gunduz E, Lefevre M, Hatipoglu OF, Borkosky SS, Tamamura R, Tominaga S, Yamanaka N, Shimizu K, Nagai N, Nagatsuka H, Deletion at Dickkopf (dkk)-3 locus (11p15.2) is related with lower lymph node metastasis and better prognosis in head and neck squamous cell carcinomas, Oncol Res, 17 巻6号、273-282 頁、2008年、査読有り

④ Borkosky SS, Nagatsuka H, Orita Y,

Tsujiigiwa H, Yoshinobu J, Gunduz M, Rodriguez AP, Missana LR, Nishizaki K, Nagai N, Sequential expressions of Notch1, Jagged2 and Math1 in molar tooth germ of mouse, *Biocell*, 32 卷 3 号、251-258 頁、2008 年、査読有り

⑤ Al Sheikh Ali M, Gunduz M, Gunduz E, Tamamura R, Beder L, Tominaga S, Onoda T, Yamanaka N, Grenman R, Shimizu K, Nagai N, Nagatsuka H, Lack of B-RAF mutations in head and neck squamous cell carcinoma, *Folia Biol (Praha)*, 54 卷 5 号、157-161 頁、2008 年、査読有り

⑥ Nakano K, Siar CH, Tsujiigiwa H, Nagatsuka H, Nagai N, Kawakami T, Notch signaling in benign and malignant ameloblastic neoplasms, *Eur J Med Res*, 13 卷 10 号、476-480 頁、2008 年、査読有り

⑦ Sathi GSA, Nagatsuka H, Tamamura R, Fujii M, Gunduz M, Inoue M, Rivera RS, Nagai N, Stromal cells promote bone invasion by suppressing bone formation in ameloblastoma, *Histopathology*, 53 卷、458-467 頁、2008 年、査読有り

⑧ Sheikh Ali MA, Gunduz M, Nagatsuka H, Gunduz E, Cengiz B, Fukushima K, Beder LB, Demircan K, Fujii M, Yamanaka N, Shimizu K, Grenman R, Nagai N, Expression and mutation analysis of epidermal growth factor receptor in head and neck squamous cell carcinoma, *Cancer Sci*, 99 卷 8 号、1589-1594 頁、2008 年、査読有り

⑨ Gunduz M, Gunduz E, Rivera RS, Nagatsuka H, The inhibitor of growth (ING) gene family: potential role in cancer therapy, *Curr Cancer Drug Targets*, 8 卷 4 号、275-284 頁、2008 年、査読有り

⑩ Gunduz M, Beder LB, Gunduz E, Nagatsuka

H, Fukushima K, Pehlivan D, Cetin E, Yamanaka N, Nishizaki K, Shimizu K, Nagai N, Downregulation of ING3 mRNA expression predicts poor prognosis in head and neck cancer, *Cancer Sci*, 99 卷 3 号、531-538 頁、2008 年、査読有り

⑪ Cetin E, Cengiz B, Gunduz E, Gunduz M, Nagatsuka H, Bekir-Beder L, Fukushima K, Pehlivan D, N MO, Nishizaki K, Shimizu K, Nagai N, Deletion mapping of chromosome 4q22-35 and identification of four frequently deleted regions in head and neck cancers, *Neoplasma*, 55 卷 4 号、299-304 頁、2008 年、査読有り

⑫ Rivera RS, Gunduz M, Nagatsuka H, Gunduz E, Cengiz B, Fukushima K, Beder LB, Pehlivan D, Yamanaka N, Shimizu K, Nagai N, Involvement of EphA2 in head and neck squamous cell carcinoma: mRNA expression, loss of heterozygosity and immunohistochemical studies, *Oncol Rep*, 19 卷 5 号、1079-1084 頁、2008 年、査読有り

⑬ Gunduz E, Gunduz M, Beder LB, Tamamura R, Nagatsuka H, Nagai N, Inhibitor of growth (ING) family: An emerging molecular target for cancer therapy, *Journal of Hard Tissue Biology*, 17 卷 1 号、1-10 頁、2008 年、査読有り

⑭ Cengiz B, Gunduz M, Nagatsuka H, Beder L, Gunduz E, Tamamura R, Mahmut N, Fukushima K, Ali MA, Naomoto Y, Shimizu K, Nagai N, Fine deletion mapping of chromosome 2q21-37 shows three preferentially deleted regions in oral cancer, *Oral Oncol*, 43 卷 3 号、241-247 頁、2007 年、査読有り

〔学会発表〕（計15件）

- ① Lefeuvre Mathieu、Examination of loss of heterozygosity in 1p36 chromosomal region in oral squamous cell carcinoma、第50回歯科基礎医学会、2008年9月23日、東京
- ② Silvia Susana Borkosky、Microsatellite analysis of ING tumor suppressor genes in ameloblastoma、第17回硬組織再生生物学会、2008年8月30日、徳島
- ③ Gul San Ara Sathi、Stromal Cells Promote Bone Invasion by Suppressing Bone Formation in Ameloblastoma、第17回硬組織再生生物学会、2008年8月30日、徳島
- ④ Mahmoud Al Sheikh Ali、Expression and mutation analysis of epidermal growth factor receptor (EGFR) in head and neck squamous cell carcinoma、第19回日本臨床口腔病理学会、2008年8月20日、東京
- ⑤ 片瀬直樹、頭頸部扁平上皮癌における Dkk 遺伝子ファミリーの LOH 解析、第97回日本病理学会、2008年5月15日、金沢
- ⑥ 玉村亮、エナメル上皮腫間質細胞における骨吸収因子の免疫組織化学的検討、第97回日本病理学会、2008年5月15日、金沢
- ⑦ Beder Levent、頭頸部扁平上皮癌における転移抑制遺伝子候補遺伝子に関する研究、第26回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会、2008年2月21日、大阪
- ⑧ Gunduz E、Molecular Analysis of ING3 and ING4 and Their Prognostic Role in Head and Neck Cancers、第66回日本癌学会学術総会、2007年10月3日、横浜
- ⑨ グンデウズ エスラ、頭頸部癌における癌抑制遺伝子ファミリー新規メンバーING3 及び ING4 の分子生物学的解析、第49回歯科基礎医学会、2007年8月31日、札幌
- ⑩ グンデウズ メーメット、頭頸部癌にお

る EGFR シグナル経路の分子生物学及び組織病理解析、第49回歯科基礎医学会、2007年8月31日、札幌

⑪ Beder Levent、Down-regulation of ING3 mRNA Expression Predicts Poor Prognosis in Head and Neck cancer、第31回日本頭頸部癌学会、2007年6月13日、横浜

⑫ Gunduz M、The Role of EGFR Pathway in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas、第98回 AACR、2007年4月14日、Los Angeles, USA

⑬ Gunduz Mehmet、Tumor suppressor genes, Oncogenes and gene therapy in cancer、2nd Agean Pharmacogenomics meeting、2007年5月25日、Isparta, Turkey

⑭ Gunduz Mehmet、Single nucleotide polymorphisms and individualized therapy、2nd Agean Pharmacogenomics meeting、2007年5月25日、Isparta, Turkey

⑮ Gunduz E、Molecular analysis of ING4 and its splicing variants in oral cancer、第98回 AACR、2007年4月14日、Los Angeles, USA

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

長塚 仁 (NAGATSUKA HITOSHI)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号：70237535

### (2) 研究分担者

永井 教之 (NAGAI NORIYUKI)  
岡山大学・名誉教授  
研究者番号：90085770  
Mehmet Gunduz (MEMETUTO GUNDEUZU)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教  
研究者番号：70333507  
辻極 秀次 (TUJIGIWA HIDETUGU)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教  
研究者番号：70335628

玉村 亮 (TAMAMURA RYO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教  
研究者番号：00403494

(3)連携研究者  
なし