

平成 21 年 6 月 25 日現在

研究種目：基盤研究 C

研究期間：2007～2008

課題番号：19592312

研究課題名（和文）唾液より検出される新規腫瘍マーカーの機能解析による
口腔癌の新しい診断法の確立

研究課題名（英文）

研究代表者

松浦 光洋 (MATUURA MITUHIRO)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：00297037

研究成果の概要：

口腔癌の治療成績は、病変を早期に発見して早期に適切な治療を施せば概して非常に良好であるが、早期癌の発見率は約 20%といわれている。そのことは炎症性口腔粘膜疾患や前癌病変との鑑別が困難なことが原因と考えられ、治療の遅れにつながり、予後不良となることがある。早期癌の適切な診断には、前癌病変あるいは早期の遺伝子異常の段階で病変をとらえる必要がある。以前より、我々は口腔癌患者の担癌状態である治療前と、非担癌状態と考えられる治療後(退院時)の患者の唾液を採取し、採取した唾液からタンパク質を抽出し、ProteinChip System により蛋白プロファイル解析を行っており、治療前後の唾液中における蛋白プロファイルの相違を解析することで、担癌状態の唾液中に特異的に発現する新規腫瘍マーカーの同定を試みており、担癌状態で共通して高発現を認める 14 種類の蛋白を検出している。

口腔癌の治療成績を向上させるため、担癌状態の唾液中に特異的に発現する蛋白をさらに同定・解析し、新規腫瘍マーカーを発見・機能解析することで、唾液による客観性、非侵襲、少量の材料で検査できる簡便な早期癌のスクリーニング方法を開発することを本研究の目的とした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,600,000	510,000	2,110,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,050,000	4,450,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：口腔癌・唾液・腫瘍マーカー ^

1. 研究開始当初の背景

口腔の早期癌の治療成績は、病変を早期に発見して早期に適切な治療を施せば概して非常に良好である。口腔内は直視できるので、

早期発見が容易なはずであるが、炎症性口腔粘膜疾患や前癌病変との鑑別、または治療後再発の適切な診断ができないと治療の遅れにつながり、予後不良となることがある。早

早期癌の適切な診断には、前癌病変あるいは早期の遺伝子異常の段階で病変をとらえる必要がある。唾液による口腔癌診断に関しては以前より、いくらかの試みが行われてきたが、いずれも口腔癌に特異的な変化を唾液で検出できるのかといった検討である。

我々は、癌患者の担癌状態（治療前）と非担癌と考えられる状態（治療後）の唾液をプロテインチップによって網羅的に解析し、新たな癌関連因子候補を見いだそうとする試みを行ってきた。

すなわち、

口腔癌患者の担癌、非担癌状態での唾液中タンパク質のプロテインチップを用いた網羅的解析。

担癌状態で特異的な変化として検出される腫瘍マーカー候補因子の同定。

腫瘍マーカー候補の組合せによる高い精度をもつ診断法確立の検討。

同候補因子の口腔癌の発生、進展における発現の意味。

について検討している。

唾液による口腔癌診断に関しては、口腔癌における特異的な変化を唾液中に検出し、その腫瘍マーカーの可能性を論じた論文を見る。2004年、Dr. DT Wong のグループは、T1, T2 の口腔癌を持つ患者の唾液と健常者の唾液から各々mRNA を抽出して 1,976 個の遺伝子発現を解析し、IL-8, IL-1B, DUSP1, HA3, OAZ1, S100P, SAT といった遺伝子の過剰発現が診断に有用である可能性を示した(Salivary Transcriptome Diagnostic for Oral Cancer Detection, Y. Li, MARS. John, X. Zhou, et al., Clin. Cancer Res. 10, 8442-8450, 2004) 。このことは、唾液中の遺伝子変化を網羅的に把握することができ、新規腫瘍マーカーの候補を同定する

ことができる可能性を示唆している。申請者らは、Dr. DT Wong との共同研究を以前より行っており、この「唾液中における遺伝子発現の網羅的解析による口腔癌検出」の次なる課題である同一患者の担癌、非担癌状態での遺伝子変化についても共同研究を開始し、唾液中のタンパク質を遺伝子発現と同様に網羅的に解析し腫瘍マーカーとすることができないかと考え、予備検索を行った。

口腔癌患者の担癌状態である治療前と、非担癌状態と考えられる治療後（退院時）の患者の唾液を採取し、採取した唾液からタンパク質を抽出し、ProteinChip Systemにより蛋白プロファイル解析（外部委託：CHIPHERGEN社）を行った。そして、治療前後の唾液中における蛋白プロファイルの相違を解析することで、担癌状態の唾液中に特異的に発現する新規腫瘍マーカーの同定を試みた。その結果、検索した16症例の担癌状態で共通して高発現を認める14種類の蛋白を検出できた。

さらに研究を進め、口腔癌患者30人より同様の探索を行い、担癌状態の唾液中に共通して特異的に高発現を認める8種類の蛋白を検出することに成功した。この8種類のうち3種類は未知の蛋白であり5種類の蛋白は既知の蛋白であった。これらの蛋白は新規腫瘍マーカー候補因子と考えられた。

本研究では、これらの唾液より見出された新規腫瘍マーカーについて、その発現の意味と機能解析を行うことであった。

2. 研究の目的

早期癌のスクリーニングには客観性、非侵襲、少量の材料で検査できること、特異性、早期の変化を反映する検出感度などが必要である。唾液による口腔癌の早期診断に関しては以前より、いくらかの試みが行われてきたが、いずれも癌で過剰発現あるいは特異的に変

化する因子が唾液中に検出できるか否かを検討するものであった。我々は、腫瘍由来の既知の因子の変化を唾液で検出する従来の方法ではなく、担癌状態での唾液中の蛋白の変化を網羅的に解析し、新規腫瘍マーカー候補を検出してきた。そこで、これらの因子の発現が前癌病変を含む口腔癌の発生、進展にどのような意味を持つのかについても検討することが本研究の特色である。本研究では、唾液より検出された新規腫瘍マーカーの腫瘍ならびに宿主の変化を把握することで口腔癌病態の把握に新知見を得ることが出来るものと考え、独創的な意義の大きいものと考える。

3. 研究の方法

我々は担癌状態の患者の唾液中に特異的に高発現する2種類の蛋白を検出した。

・ Cystatin SN precursor

```

1      11      21      31      41      51
1  MQSLSTLLL LLSLAVALA ASPEEEDRII EGCTYADLN DEVQRAGE AISEYKKAK 63
61  DQYRRLYLV LRADQTVGG WNEEDQWGG RITCKRSQEN LTCARREQ ELQKQLQSE 120
121  EYEVYWEKR RSLVKSKQGE G 141
  
```

・ Salivary acidic proline-rich phosphoprotein 3/4

```

1      11      21      31      41      51
1  MLLLLSYAL LAFSAALLD EDNSEEDYPL VISYGGSEQ FIDEERQAPP LGADSQPSA 60
61  EGKDQDQQPPQ QEPPQQGGQ QQEPPPQQK PQEPPPQQGH PPPPQQRPQG PPQQGHPP 120
121  PQEPQQPPQ QGHQQAPPP PPPPQQPP PPQQPPQPP QGHQ 141
  
```

(1) Cystatin SN precursor と Salivary acidic proline-rich phosphoprotein 3/4 のポリクローナル抗体作製。

(2) 口腔扁平上皮癌細胞株における Cystatin SN precursor と Salivary acidic proline-rich phosphoprotein 3/4 の蛋白発現をウェスタンブロット法により検討した。

(3) 口腔扁平上皮癌細胞株を用いて siRNA による発現抑制を行い、その有効性を検討する。

- ・ siRNA発現ベクターはpiGENE™hU6ベクターを用いステムループタイプのsiRNA発現ベクターを作製する。

- ・ リポフェクタミン法にて口腔癌細胞に導入する。
- ・ 細胞の増殖能の変化を倍加時間、³H-Thymidineの取り込みにより検索する。

以上の結果をDNAヒストグラムにて細胞周期の解析を行う。界面活性剤による裸核を行い、PI(propidium iodide)を核に浸透させ、DNAを染色させ、フローサイトメトリーによりDNAヒストグラムを作製して細胞周期の解析を行い、検討する。

4. 研究成果

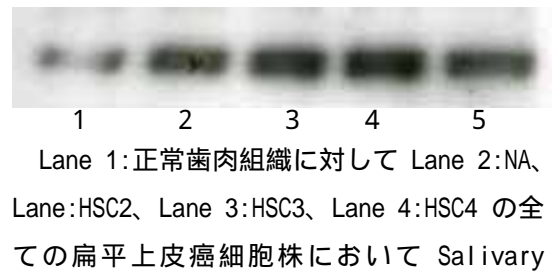
我々は担癌状態の患者の唾液中に特異的に高発現する2種類の蛋白 Cystatin SN precursor と Salivary acidic proline-rich phosphoprotein 3/4 を検出した。

(1) ポリクローナル抗体作製に関して、Salivary acidic proline-rich phosphoprotein 3/4に対しては抗原性分析を行い、他のProline rich proteinと交差しない以下の配列部位として選択した。

39-54 CEQFIDEERQGPPLGGQ(Amd) (total antigenic score: 0.877

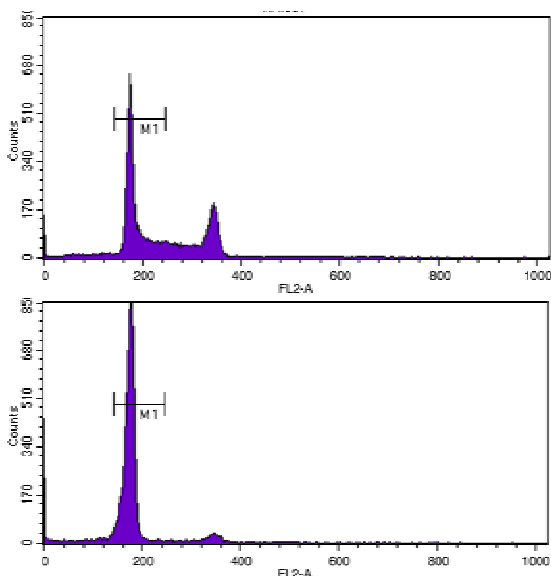
30-50付近は比較的APRP3/4特異的な配列だが、S33, S38がリン酸化を受け、またS33は糖鎖修飾を受ける可能性があるため、これらは避けた。また、キャリアとの結合用にN末端にシステインを付加し、ペプチド末端に対するペプチド特異的な抗体の産生を抑えるため、C末端はアミド化(Amd)を行った。

(2) 口腔扁平上皮癌細胞株における Salivary acidic proline-rich phosphoprotein 3/4 蛋白発現の検討。



acidic proline-rich phosphoprotein 3/4 の蛋白発現は著明であった。

(3) 口腔扁平上皮癌細胞株を用いて siRNA による Salivary acidic proline-rich phosphoprotein 3/4 の発現抑制を行い、細胞周期を検討した。



siRNA による発現抑制により、G1 arrest が誘導された。

このことから、口腔癌において、Salivary acidic proline-rich phosphoprotein 3/4 の過剰発現が細胞増殖に関与している可能性が示唆され、口腔癌患者の唾液中に過剰発現していることから、Salivary acidic proline-rich phosphoprotein 3/4 が唾液による新規腫瘍マーカーとなり得る可能性があることが考えられた。

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)

[学会発表](計1件)

1. Saliva tumor markers for the identification of oral cancer S. Shintani, M. Hatori, T. Toyoshima, Y. Kurihara, Y. Kurokawa, H. Nakahira, T. Ito, T. Shirota. European Association for Cranio-Maxillofacial Surgery 9th - 12th September 2008 Bologna, Italy

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松浦 光洋 (MATUURA MITUHIRO)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：00297037

(2) 研究分担者

新谷 悟 (SHINTANI SATORU)

昭和大学・歯学部・教授

研究者番号：80294420

伊東 大典 (ITO DAISUKE)

東京医科歯科大学・歯学部・特任講師

研究者番号：40286844