

平成 21 年 6 月 18 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19592314

研究課題名(和文) 間質組織の異常から見た口腔白板症と扁平上皮癌の発症機序の検討

研究課題名(英文) Occurrence mechanism of oral leukoplakia and squamous cell carcinoma examining from abnormality of stromal tissue

研究代表者

豊島 貴彦(TOYOSHIMA TAKAHIKO)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：90338533

研究成果の概要：

腫瘍間質組織の遺伝子発現プロファイルを網羅的に解析した結果、EGF、TGF-beta、IL-1beta がヒト口腔扁平上皮癌組織の腫瘍間質組織において著明に発現亢進していることが確認できた。これらの遺伝子の内、TGF-beta についてのタンパク発現を Western blot にて解析したところ、多くのサンプルで発現の亢進が認められた。以上のことより、口腔癌の発症に周囲間質組織の TGF-beta の発現亢進が関与している可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19年度	1,800,000	540,000	2,340,000
20年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：

科研費の分科・細目：医歯薬学・歯学・外科系歯学

キーワード：腫瘍間質組織、口腔癌における発症機序、口腔癌発癌予測システム

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍の異常な形質、すなわち旺盛な増殖能、周囲組織への高い浸潤・破壊能、遠隔臓器への転移能などは、悪性腫瘍細胞を決定的に区別する特性であり、全て腫瘍細胞自身の生物学的特性に由来するものと考えられていた。そのため、悪性腫瘍に関する研究は主に腫瘍細胞に向けられていた。しかし近年、悪性腫瘍生体内での形質発現に、周囲組織と

の相互作用が不可欠であることが知られるようになって以来、腫瘍周囲の血管新生の亢進、母床組織や間質組織と腫瘍細胞の接着、免疫細胞とのサイトカインや接着分子を介した相互作用などが盛んに研究されるようになった。すなわち癌とは癌細胞の存在だけで成立するのではなく、周囲の正常に見える生体内環境が癌細胞を癌にする潜在能を持つという考え方が認知されてきた。そこで口

口腔癌においてその発症機序を解明し、より一層正確な発症予測システムを確立するためには、粘膜固有層組織および腫瘍間質組織の詳細な解析が必須であると考えた。

2. 研究の目的

病変組織をサンプルとした DNA チップ解析による発現異常遺伝子の同定と、その組織内発現パターンの検索、病変部線維芽細胞と何種類かの系で共培養することによって上皮系細胞の増殖能その他に起こる変化の評価、さらに、その遺伝子の導入またはノックダウンがマウス上皮異形成の発症に及ぼす影響を解析する。ここで得られる一連の結果から、口腔癌の発症メカニズムにおける周囲組織の影響を把握し、遺伝子診断・治療に結びつけることを目的とする。

3. 研究の方法

1. 口腔扁平上皮癌の間質組織における遺伝子発現プロファイルの解析

生検または切除術で得られたヒト口腔扁平上皮癌 (OSCC) 組織のパラフィン超薄切片を作製し、トルイジンブルー染色をした後、LCM にて腫瘍間質組織を切離・採取する。採取した組織より total RNA を抽出し、double stranded cDNA を合成する。これを鋳型にして、in vitro transcription を 2 回行ってビオチン化 cRNA を増幅・合成する。断片化 cRNA をサンプルとして、GeneChip Expression Analysis System (Affymetrix, USA) にて腫瘍間質組織の遺伝子発現プロファイルを網羅的に解析する。対照として、周囲健全粘膜の粘膜固有層および粘膜下層組織を用いる。同一患者の癌組織と正常組織間で comparison analysis を行い、周囲組織において発現増強している遺伝子と発現減弱している遺伝子をそれぞれ抽出する。抽出された遺伝子の発現を、同一検体を用いた real-time PCR で確認する。

2. 発現変化が認められた遺伝子のタンパク発現解析

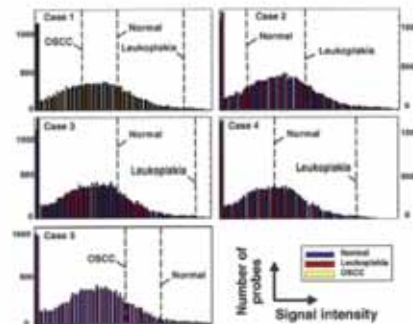
上記の解析で発現変化が認められた遺伝子について、その遺伝子産物の発現変化と組織内・細胞内分布を免疫組織染色で検索する。

4. 研究成果

1. 口腔扁平上皮癌の間質組織における遺伝子発現プロファイルの解析

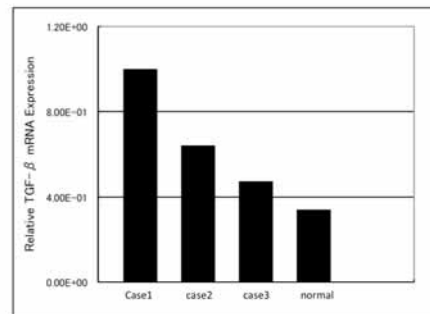
15 例のヒト口腔扁平上皮癌組織より、LCM にて腫瘍間質組織 (線維芽細胞) を切離・採取し total RNA を抽出した。GeneChip Expression Analysis System にて腫瘍間質

組織の遺伝子発現プロファイルを網羅的に解析した結果、EGF、TGF-beta、IL-1beta がヒト口腔扁平上皮癌組織の腫瘍間質組織において著明に発現亢進していることが確認できた。(Fig.1)



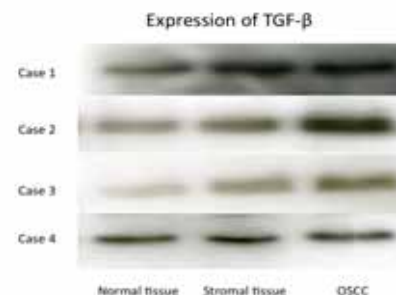
2. 腫瘍間質組織での EGF、TGF-beta、IL-1beta 遺伝子発現解析

網羅的解析で用いたサンプルにおける、EGF、TGF-beta、IL-1beta の遺伝子発現を real-time PCR で解析したところ、正常組織の間質組織と比較して、すべてのサンプルにおいて 3 つ遺伝子の発現の亢進が認められた。(Fig.2)



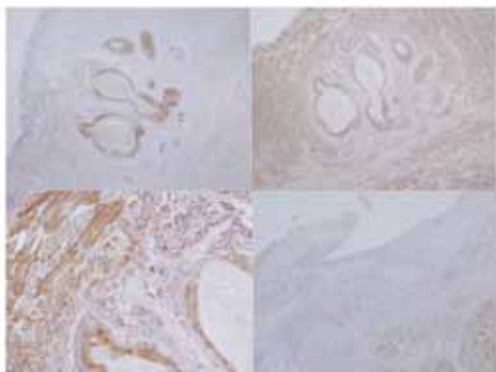
3. TGF-beta のタンパク発現解析

網羅的解析から抽出された遺伝子の内、TGF-beta についてのタンパク発現を Western blot にて解析したところ、多くのサンプルで発現の亢進が認められた。(Fig.3)



4. TGF-beta の免疫組織学的検討

30 例の口腔癌組織と同一検体の正常組織について TGF-beta の免疫組織染色を行なったところ、22 例 (73%) で癌組織周囲の間質組織に強い染色が認められた。(Fig.4)



以上のことより、口腔癌の発症に周囲間質組織の TGF-beta の発現亢進が関与している可能性が示唆された。

今後は計画書に示した、in vitro で病変周囲線維芽細胞との共培養が口腔癌細胞株に及ぼす影響の解析と、in vivo で TGF-beta のノックダウンによるマウス上皮性異形成発症への影響を解析し、口腔癌の発症メカニズムについて詳細に検討を行いたいと考える。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1)研究代表者

豊島孝彦(Toyoshima Takahiko)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：90338533

(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：80294429

(3)連携研究者

伊東大典(Itoh Daishuke)

東京医科歯科大学・歯学部・特任講師

研究者番号：40286844

