

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19791521
 研究課題名 (和文) 分泌蛋白または膜蛋白のスクリーニングによる新規口腔癌バイオマーカーの同定
 研究課題名 (英文) Identification of new oral cancer biomarker through the screening of secreted and cell surface protein.
 研究代表者
 三谷 佳嗣 (MITANI YOSHITSUGU)
 広島大学・病院・歯科診療医
 研究者番号：30432678

研究成果の概要：分泌蛋白質もしくは膜蛋白質はがんにおいて重要な役割を果たしており、診断マーカーや分子標的治療となりうる可能性を持っている。本研究はこの分泌蛋白質、膜蛋白質のみに限定したスクリーニング法を利用し、新規口腔癌バイオマーカーの同定を試みた。今回残念ながら新規マーカーの同定には至らなかったが、いくつかの膜蛋白、分泌蛋白が得られた。今後継続して研究を行うことで、新規癌マーカーが得られると考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	0	2,000,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

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：悪性腫瘍、新規癌バイオマーカー、分泌蛋白質、膜蛋白質

1. 研究開始当初の背景

分泌蛋白質もしくは膜蛋白質はがんにおいて重要な役割を果たしており、癌診断マーカーや分子標的薬剤となりうる可能性を持っている。これまで申請者らは Serial analysis of gene expression (SAGE) 法を利用して新規診断マーカーとなる分泌蛋白質または膜蛋白質を同定してきた (*J Pathol*, 208; 633-42, 2006. *Oncogene*, 25; 2546-57, 2006. *J Pathol*, 207; 185-98, 2005. *Cancer Res*, 64; 2397-405, 2004)。長年多くのがん研究が行われてきたが、実際の診断血清マ

ーカーとして使用出来るものは数えるほどしかなく、また近年がんに対する分子標的治療として開発され、現在実際に使用できるものは *Her-2/neu* などであり、実際にはほとんど無い。

理想的な癌バイオマーカーの条件として以下のことが提唱されている。(1) 癌において高い発現を示し、正常では殆どその発現を認めない。(2) 癌化の早期から発現が亢進し持続する。(3) 大部分の臨床検体で明らかに発現が認められる。(4) その発現は分泌蛋白質もしくは膜蛋白であること (Kinzler KW, et

al. Cancer Res, 2001)。これらの条件を満たす事が出来れば、癌の早期発見が可能であり、またその遺伝子において、がん化の過程に関与にしていれば診断マーカーだけでなく、分子標的治療となりえることが考えられる。そこで申請者らは新規口腔癌バイオマーカーの同定として分泌蛋白質もしくは膜蛋白質をスクリーニングすることに注目した。

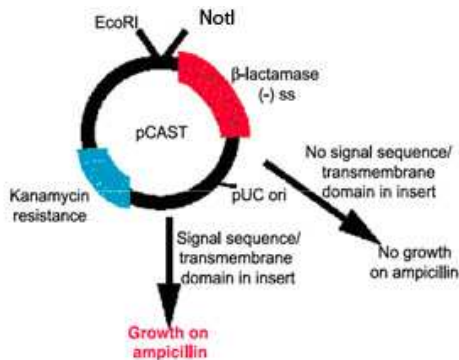
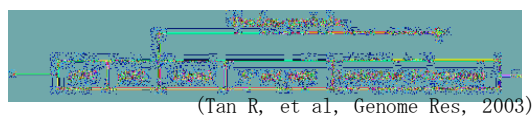
分泌蛋白質の同定には、これまでバイオインフォマティクスや cDNA マイクロアレー、MALDI-TOF MS、シグナル・シーケンス・トラップ法など様々な方法で試みられているが、これらには限界がある。分泌蛋白質には N 末端に特徴的なシグナルシーケンスが認められるが、本研究ではこの特徴に注目し、シグナルシーケンスを有する cDNA が、インフレームで導入されることによりセレクトが可能となるベクターを Tna R, Fu GK(Genome Res, 2003), Ferguson DA, Graff JM(Cancer Res, 2005)らと同様に構築した。本方法でのスクリーニングは乳癌でのみ Ferguson DA, Graff JM(Cancer Res, 2005)により報告されている。

2. 研究の目的

これまでがんに関連した研究は多数あるが、本研究は新規口腔癌バイオマーカーの同定を目標とし、分泌蛋白質もしくは膜蛋白質に限定したスクリーニングを試みる。最終的に ELISA 法による血清診断や、将来的に口腔癌のみに有用で正常組織に殆ど作用しない分子標的治療の開発を目的とする。

3. 研究の方法

本研究では leaderless β -lactamase にインフレームでシグナルシーケンスを有する cDNA が融合することで、分泌蛋白質もしくは膜蛋白質のセレクトが可能となる以下のベクターを構築した。



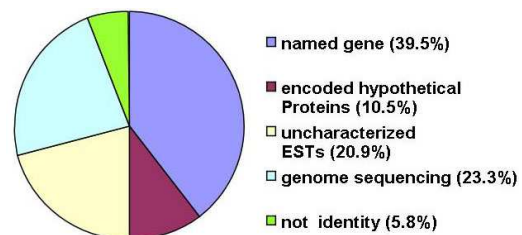
(Ferguson DA, et al, Cancer Res, 2005)

ベクターには β -lactamase のシグナルペプチドを欠損させた mutant がある。そのため、mutant-lactamase の上流において、シグナルペプチドを有する cDNA がインフレームで融合することにより、初めてセレクトが可能となる。このベクターを使用し、以下のように研究を試みた。

- (1) 口腔扁平上皮癌細胞 2 株と本学倫理委員会の承認と患者の同意を得た外科的に切除された口腔扁平上皮癌組織 2 例を使用し、Poly A+ RNA を抽出。その後 EcoRI, NotI 付加した cDNA を作成し、作製したベクターにライゲーションを行い大腸菌に導入する。得られたクローンはカナマイシンとアンピシリン両方に耐性であることを確認する。両抗生剤耐性であることが必要である。
- (2) 得られたクローンはシーケンスによる配列確認を行う (最低約 2000 クローン)。
- (3) 既知未知を問わず、得られた遺伝子には PCR もしくは Real-time PCR にて正常組織では殆ど発現は認めないが、癌組織において発現が高いことを確認する。
- (4) 未知の遺伝子であれば抗体の作製を行い、Western blot や免疫染色による検討を行う。また免疫染色ではその局在を検討する。
- (5) 未知の遺伝子では機能解析を行う。具体的には発現ベクターや siRNA により、該当遺伝子での口腔癌 stable 株を作製し細胞増殖や浸潤能、アポトーシス等について検討を行う。
- (6) 分泌蛋白ならそのレセプターの同定、また膜蛋白ならリガンドの同定。さらに下流の経路を同定する。
- (7) 既知未知を問わず、ELISA 法による血清診断を目標とする。

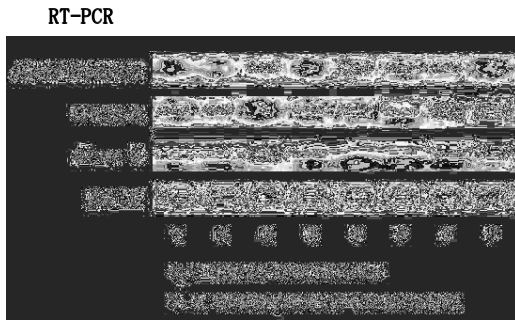
4. 研究成果

今回これまでにアンピシリン、カナマイシン両耐性のクローンは 86 クローンのみ得られた。得られたクローンはすべてシーケンスを行った。内訳は以下の通りである。



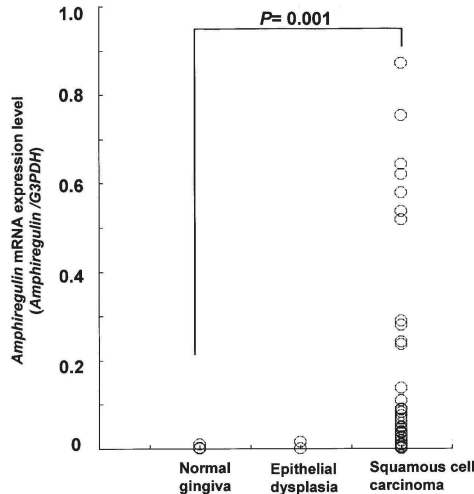
約 50%のクローンが分泌蛋白質、膜蛋白質としてスクリーニングができた。しかしながら得られたクローン数が少なく、現段階では解析するには乏しいと考えられる。これは技術的な問題があり、現在改良を重ねクローン取得効率を上げている。

得られた遺伝子は RT-PCR, Real-time RT-PCR にて口腔扁平上皮癌にて発現が亢進しているかどうか確認をした。以下代表例を示す。

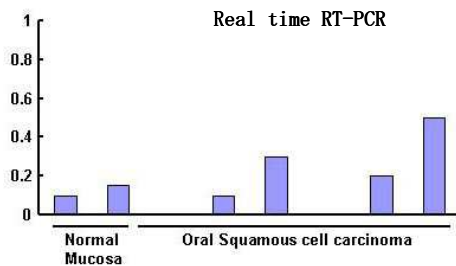


(1) Amphiregurin

EGFR に結合し、EGFR を活性化する増殖因子 (リガンド) として知られており、口腔癌においてその発現量が正常口腔粘膜や上皮異形成と比較して高かった。

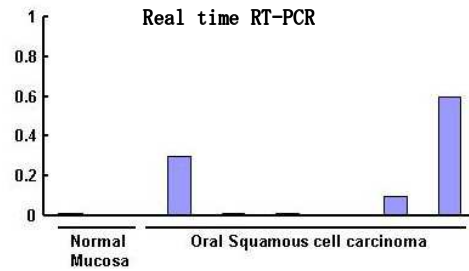


(2) Gene A について



正常口腔粘膜にも発現しており、癌特異性が高いものとは考えられない。

(3) Gene B について



正常口腔粘膜には発現がほとんど無く、癌特異性が高いものと考えられる。

いずれの得られた遺伝子は、クローン数が少なく今回残念ながら機能解析にまでは至らなかった。しかしながら本研究において分泌蛋白質、膜蛋白がスクリーニング出来ることがわかり、今後継続して研究を続けることで、新規癌マーカーが得られることが示唆された。

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)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Shigeishi H, Higashikawa K, Hiraoka M, Fujimoto S, Mitani Y, Ohta K, Takechi M, Kamata N. Expression of epiregulin, a novel epidermal growth factor ligand associated with prognosis in human oral squamous cell carcinomas. *Oncol Rep.* 19(6):1557-1564, 2008, 査読有
- ② Mitani Y, Oue N, Matsumura S, Yoshida K, Noguchi T, Ito M, Tanaka S, Kuniyasu H, Kamata N, Yasui W. Reg IV is a serum biomarker for gastric cancer patients and predicts response to 5-fluorouracil-based chemotherapy. *Oncogene.* 26(30):4383-4393, 2007, 査読有
- ③ Matsumura S, Oue N, Mitani Y, Kitadai Y, Yasui W. DNA demethylation of vascular endothelial growth factor-C is associated with gene expression and its possible involvement of lymphangiogenesis in gastric cancer. *Int J Cancer.* 120(8): 1689-1695, 2007, 査読有

[学会発表] (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三谷 佳嗣 (MITANI YOSHITSUGU)

広島大学・病院・歯科診療医

研究者番号：30432678

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者