

機関番号：13802

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：平成20年～平成22年

課題番号：20592015

研究課題名 (和文) 頭頸部癌の上皮間葉移行に関する臨床的および基礎的研究

研究課題名 (英文) Endothelial Mesenchymal Transition in Head and Neck Cancer

研究代表者

峯田 周幸 (MINETA HIROYUKI)

浜松医科大学 医学部 教授

研究者番号：40190714

研究成果の概要 (和文)：頭頸部癌の上皮間葉移行について

EMT が関与すると考えられる 9 つの癌抑制遺伝子のメチル化について調べた。p16 は 55%、RASSF1A は 20%、H-cadherin は 44%、E-cadherin は 40%、MGMT は 31%、DAPK は 46%、DCC は 30%、GALR1 は 42%、TAC1 は 55%の症例に高メチル化を認めた。全体では 41%(336/819)にメチル化を認めた。E-cadherin にメチル化を認めた症例に有意にリンパ節転移を認めた。またメチル化を認めたものほど再発の頻度が高かった。

研究成果の概要 (英文)：Endothelial Mesenchymal Transition in Head and Neck Cancer

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：上皮間葉移行

1. 研究開始当初の背景

近年、DNA のメチル化を始めとするエピジェネティックな変化が、RNA 合成、ひいてはタンパク質の発現を抑制することから、癌化機構の一つとして注目されている。発癌のプロセスでは癌遺伝子の活性化および癌抑制遺伝子の不活性化が生じるが、遺伝子自体に異常のないエピジェネティックな変化は、転写調節領域の CpG のメチル化と

ヒストンのアセチル化やメチル化などの修飾によるクロマチンの構造変化が発現制御の鍵を握っており、転写のメインスイッチとも言われている。DNA メチル化によって不活化される代表的遺伝子としては、p16INK4a、E-cadherin、RASSF1、hMLH1、BRCA1、Rb などが知られており、細胞周期の制御異常や遺伝子不安定性などを介して癌化に関与している。

癌細胞にはゲノムの不安定性のみならずエピジェネティックな変化により転写、翻訳、タンパクの分解などに影響をされると考えられている。もともとはひとつの細胞がエピジェネティックな制御により上皮細胞、間葉系細胞、血液細胞といった 3 つの表原型に変わると考えられている。最近癌の浸潤・転移に、発生の過程で重要な

EMT(Epithelial-MesenchymalTransition; 上皮間葉転換)が関与すると考えられ、上皮に発現し間葉系細胞に発現しな**E-cadherin**の発現低下も、この上皮間葉転換の現象の一部と捉える考え方もある。**E-cadherin**の発現低下にはプロモーター領域の高メチル化が高頻度に関係しているといわれている。この代表的な細胞接着に関与する分子である**E-cadherin**は、EMTの獲得に伴ってその発現が抑制されることから、EMTの指標としてよく用いられる。

2. 研究の目的

頭頸部癌におけるEMTに関連する遺伝子の解析を行い癌の浸潤や転移のメカニズムを検討する。

3. 研究の方法

EMTの指標として**E-cadherin**のプロモーター領域のメチル化解析を臨床検体にて行い、臨床病理学的検討を行った。また**E-cadherin**のほかにEMTに関連すると考えられる8種類の癌抑制遺伝子のメチル化を調べた。

4. 研究成果

EMTの可逆性の基礎にエピジェネティックな変化がある可能性が想定されている。実際、DNAメチル化やヒストンのメチル化、アセチル化などのエピジェネティックな変化がEMTに伴っておこることを示す

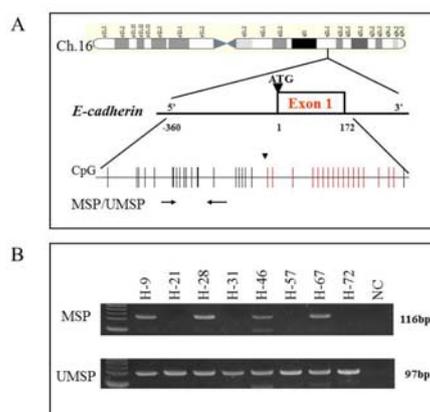
報告もある。こうした点の解明は、頭頸部扁平上皮癌の転移の原因を探る上で有益と考えられる。

今回われわれは、頭頸部扁平上皮癌 91 症例に対し 9 種類の癌抑制遺伝子のプロモーター領域のメチル化度を調べた。手術検体から得た組織から DNA を抽出し、その DNA をバイサルファイト処理しメチル化解析のサンプルとして使用した。解析方法は、MSP/UMSP 法ないしリアルタイム MSP 法にて調べた。

癌関連遺伝子	メチル化の頻度
P16	55%
TAC1 (tachykinin precursor 1)	55%
DAPK (death-associated protein kinase)	46%
H-cadherin	44%
E-cadherin	40%
GALR1 (galanin receptor type 1)	42%
MGMT (O6-methylguanine-DNA methyltransferase)	31%
DCC (deleted in colorectal carcinoma)	30%
RASSF1A (RAS association domain family 1A)	20%

p16 は 55%、RASSF1A は 20%、H-cadherin は 44%、E-cadherin は 40%、MGMT は 31%、DAPK は 46%、DCC は 30%、GALR1 は 42%、TAC1 は 55%の症例に高メチル化を認めた。全体では 41%(336/819)にメチル化を認めた。

EMTの獲得に伴ってその発現が抑制されることから、EMTの指標としてよく用いられる。今回われわれは、**E-cadherin**のプロモーター領域のメチル化解析を臨床検体にて行い、臨床病理学的検討を行った。

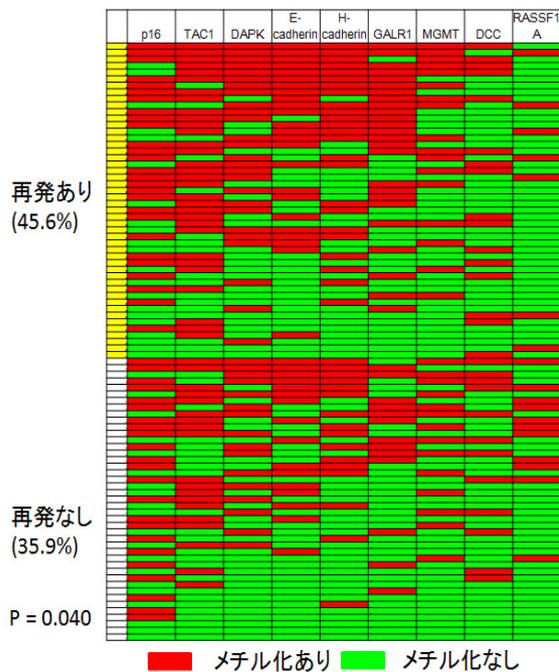


(A) E-cadherin は 16 番染色体に位置し、エキソン 1 とその上流のプロモーター領域に、MSP/UMSP プライマーを設定した。
 (B) 臨床検体のサンプル MSP の結果。H-9,28,46,67 は、高メチル化を示した。H-21,31,57,72 において低メチル化を示した。

Patients and tumor characteristics (n=100)	Methylation		P-value*
	Present(n=40)	Absent (n=60)	
Age			
65 and older (57)	19	38	
Under 65 (43)	21	22	0.0869
Gender			
Male (78)	30	48	
Female (22)	10	12	0.7995
Smoking status			
Smoker (69)	29	40	
Never smoker (31)	11	20	0.3476
Alcohol exposure			
Ever (60)	22	38	
Never (40)	18	22	0.8512
Tumor size			
T1-2 (49)	21	28	
T3-4 (51)	19	32	0.3567
Lymph-node status			
N0 (44)	13	31	
N+ (56)	27	29	0.0453*
Stage			
I, II, III (45)	15	30	
IV (55)	25	30	0.1525

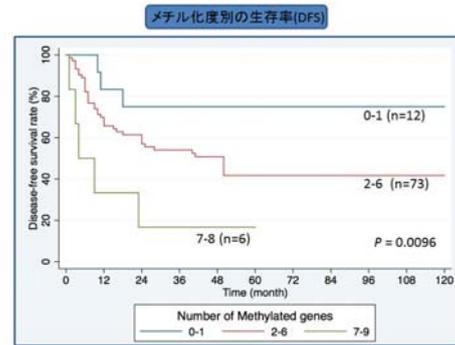
Fisher's exact probability test

E-cadherin のプロモーター領域のメチル化は 100 例中 40 例に認めた。E-cadherin にメチル化を認めた症例に有意にリンパ節転移を認めた(P=0.0453)。



次に再発の有無と各遺伝子のメチル化との関連を調べた。

再発を認めた症例(48 例)は、9 遺伝子においてメチル化の頻度は、45.6%であった。再発を認めなかった症例(43 例)は、メチル化の頻度は 35.9%であった。両群間のメチル化の頻度に有意差を認めた(P=0.040)。



In HNSCC, the disease-free survival rates decrease with an increasing number of genes. Kaplan-Meier estimates for patients with HNSCC.

高メチル化群(9 遺伝子中 7 遺伝子以上にメチル化を認めた症例)、中メチル化群(2 から 6 遺伝子にメチル化を認めた群)、低メチル化群(0 ないし 1 遺伝子にメチル化を認めた群)で生存率(Disease free survival)を比較検討した。メチル化遺伝子が増加するほど生存率の有意な低下を認めた(P=0.0096)。

まとめ：EMT に関与するといわれる E-cadherin 遺伝子のプロモーター領域のメチル化解析では、リンパ節転移を認めた症例で有意にメチル化を認めた。また、E-cadherin を含む複数の癌抑制遺伝子のメチル化解析では、再発の有無、生存率において有意差を認めた。発癌のみならず、生命予後にも大きく関係していると考えられた。

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)

[雑誌論文] (計4 件)

1)、頭頸部がん治療による体重減少および経口摂取不足に対し、NSTによる栄養介入の有
用性、高木なつ子、加藤明彦、仲山順子、齋
藤えり子、深谷文香、山本知広、金子誠、平野
美佳子、山内克哉、中村利夫、青木克憲、峯田
周幸、日本病態栄養学会誌 13 巻 1 号
Page35-39、2010

2)、KIT and platelet-derived growth factor
receptor α gene expression in laryngeal
small cell carcinoma. Kanazawa T, Nokubi
M, Takizawa K, Matsuzawa S, Shinnabe A,
Mineta H, Iino Y. J Laryngol Otol. 2010
124:1340-3.

3)患者にやさしいインフォームドコンセント、峯
田周幸、JOHNS 26:1879-1883, 2010

4)、頭頸部腫瘍診療の論点に寄せて、峯田周
幸、JOHNS 26:1603、2010

[学会発表] (計0 件)

[図書] (計4 件)

- 1) 日本耳鼻咽喉科用語解説集(金芳堂)
- 2) 眼窩骨膜下膿瘍に対する手術治療のEB
Mとは? : EBM 耳鼻咽喉科・頭頸部外
科の治療(中外医学社)
- 3) 喉頭腫瘍、HPVワクチン : 耳鼻咽喉科・
頭頸部外科研修ノート(診断と治療社)
- 4) 頸部・気管食道学、 図解 耳鼻咽喉科
(金芳堂)

[産業財産権]

○出願状況 (計0 件)

○取得状況 (計0 件)

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織
(1)研究代表者
峯田 周幸 (MINETA HIROYUKI)
浜松医科大学・医学部・教授
研究者番号：40190714

(2)研究分担者
三浦 克敏 (MIURA KATUTOSHI)
浜松医科大学・医学部・教授
研究者番号：20173974

細川 誠二 (HOSOKAWA SEIJI)
浜松医科大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：50377743

岡村 純 (OKAMURA JUN)
浜松医科大学・医学部・助教
研究者番号：00402305

(3)連携研究者
()

研究者番号：