

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：平成20年度～平成22年度

課題番号：20592362

研究課題名(和文) NF- κ B 依存型分子プロファイリングによる口腔癌特異的バイオマーカーの探索研究課題名(英文) Exploration of oral cancer-specific biomarkers by profiling of NF- κ B-dependent molecules

研究代表者 東 雅之 (AZUMA MASAYUKI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：20144983

研究成果の概要(和文)：

- ①口腔癌患者においては、癌組織における MMP-9, uPA, COX-2, Cyclin D1 の強発現はリンパ節転移のマーカーになりうることが示唆された。
- ②治療効果による血清中バイオマーカー値を測定したところ、口腔癌患者の治療前の血清中バイオマーカー値と比較して有意に低下した。
- ③口腔癌患者血清中におけるバイオマーカー値は、N ステージ、リンパ管・血管浸潤が関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：

- ①It has been suggested that enhanced expression of MMP-9, uPA, COX-2 and cyclin D1 in oral cancer tissues may be biological markers for the development of cancer metastasis.
- ②Serum levels of biological markers in oral cancer patients were significantly diminished by cancer treatment. ③Serum levels of biological markers in oral cancer patients correlated with N-stage and lymphangio-hemangiogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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、バイオマーカー、増殖因子、接着分子、蛋白分解酵素、サイトカイン、ケモカイン

1. 研究開始当初の背景：

口腔癌を含む多くの癌において腫瘍マーカーとして使用されているものには、CEA や SCC

抗原、シフラ、CA19-9、 α -フェトプロテイン (AFP)、CA15-3、PSA、CA125 などが挙げられるが、これらのマーカーは癌の多段階発癌

分子機構の解析に基づいて同定されたものではないため、マーカーとしての精度と特異性に欠如するところがある。そこでこれまで例えば、種々の悪性能を有するマウス由来扁平上皮細胞株について、ディファレンシャルディスプレイ法と cDNA マイクロアレイ法を用いて発現する遺伝子の変化を検索した結果、悪性度の進展にともなって細胞増殖や抗アポトーシス作用、血管新生に関与する遺伝子の発現増強がみられ、この発現増強には NF- κ B シグナル伝達系の関与が示唆されている。また、口腔扁平上皮癌患者の血清中には健常者に比較して有意に高い VEGF が検出されることが報告されている。一方すでに我々は、口腔癌細胞においては転写因子 NF- κ B が正常細胞に比較して著明に高発現していること、また口腔癌細胞において VEGF 発現量は NF- κ B により厳密に制御されていることを報告してきた。さらに強制的に NF- κ B 活性を抑制した口腔癌細胞株においては、放射線や抗癌剤に対する感受性が著しく増強し、これは放射線や抗癌剤が誘導する IL-6 や IL-8 の産生を抑制することに起因していることを明らかにした。したがって以上の学術的背景より、口腔癌において NF- κ B により発現調節されている増殖・浸潤・血管新生・転移関連分子を探索し、口腔癌特異的バイオマーカーとして同定することは口腔癌の早期発見・早期診断に寄与し、その結果、口腔癌患者の生存率の向上と QOL の改善に著しく貢献するものと考えられる。

2. 研究の目的：

NF- κ B は癌の増殖から転移までに関与する種々の遺伝子プロモーター領域に結合する重要な転写因子であることが示唆されている。そして NF- κ B の活性化は種々の癌において、細胞の悪性転換や増殖能、遊走能、生存および放射線や化学療法に対する抵抗性の獲得に寄与することが明らかにされている。そこで本研究においては、口腔癌細胞において発現増強している NF- κ B 依存型分子を探索した後、口腔癌患者血清中におけるバイオマーカー分子を解析することにより、臨床病態を緊密に反映する口腔癌特異的バイオマーカーの同定を行うことを目的とする。

3. 研究の方法：

NF- κ B 高発現ヒト口腔癌細胞株におけるバイオマーカー候補分子群の探索、(2) 変異型 I \cdot B- κ cDNA 導入細胞クローンの樹立、(3) 変異型 I \cdot B- κ cDNA 導入細胞クローン担癌ヌードマウスにおける血清中バイオマーカー分子群濃度の抑制効果、(4) 口腔癌細胞のリンパ節・遠隔転移組織におけるバイオマーカー発現増強の解析、(5) プロテアソーム阻害剤 Bortezomib による腫瘍・転移巣および

血清中バイオマーカーの発現抑制。

4. 研究成果：

口腔癌におけるバイオマーカー探索の目的にて解析を行い、以下の結果を得た。

1. NF- κ B 高発現ヒト口腔癌細胞株におけるバイオマーカー候補遺伝子群の探索のため、ヒト口腔扁平上皮癌細胞株である B88 細胞および Hnt 細胞、BHY 細胞を用いた。これら細胞株において TNF- α 、IL-1 α 、IL-6、GRO-1、HGF、GM-CSF、COX-2、Cyclin D1、MMP-9、uPA、CXCR-4 の発現について、蛋白レベルと mRNA レベルにて検索した結果、これらバイオマーカー分子群の多くが高発現していた。

2. 変異型 I \cdot B- κ cDNA 導入細胞クローンを樹立し、担癌ヌードマウスを作製した。親株細胞においては導入細胞クローンが形成する腫瘍に比較して有意に腫瘍増大傾向を示した。親株細胞担癌マウス、導入細胞クローン担癌マウス、および非担癌マウス（コントロール）より採血を行い、血清中のバイオマーカー分子群の濃度を測定したところ、親株細胞担癌ヌードマウスと比較して変異型 I \cdot B- κ cDNA 導入細胞クローン担癌ヌードマウスでの著しい血清中バイオマーカー分子群の濃度低下を確認した。

3. 口腔癌細胞のリンパ節・遠隔転移組織におけるバイオマーカー発現増強の解析を行った結果、2. にて形成された腫瘍組織および転移リンパ節・遠隔臓器においては、TNF- α 、IL-1 α 、IL-8、GRO-1、HGF、GM-CSF、COX-2、Cyclin D1、MMP-9、uPA、CXCR-4 に対する発現の増強が確認された。

4. 口腔癌患者原発腫瘍・転移リンパ節組織における NF- κ B 活性とバイオマーカー分子発現との関連性につき解析した。口腔癌症例（舌、口底、下顎歯槽歯肉、上顎歯槽歯肉）において頸部リンパ節転移有りとなし無しの症例について、パラフィン包埋切片を用いて NF- κ B の構成成分である p65 とバイオマーカー各分子の発現につき免疫組織化学的手法を用いて解析した結果、NF- κ B (p65) 活性と有意な相関性を示すバイオマーカー (MMP-9、uPA、COX-2、Cyclin D1) を同定した。すなわち口腔癌患者においては、MMP-9、uPA、COX-2、Cyclin D1 の強発現はリンパ節転移のマーカーになりうることを示唆された。

5. 口腔癌患者における治療効果と血清中バイオマーカー値との関連性につき解析した。

4. により同定されたバイオマーカーに焦点を絞り、口腔癌患者の治療前の血清中バイオマーカー値をベースラインとし、放射線治療や抗癌剤治療施行中、また治療後 1 か月毎、あるいは外科的手術後の血清中バイオマーカー値を測定した。その結果、治療による腫瘍の縮小効果を反映して、上記腫瘍マーカーの発現の低下傾向が認められた。しかし、CR

や PR などの治療効果とバイオマーカー値の低下との間には明らかな有意差は確認されなかった。

6. 口腔癌患者でのバイオマーカー値上昇を促進する因子を解析した。口腔癌患者血清中におけるバイオマーカー値と年齢、性、発生部位、T ステージ、N ステージ、リンパ管・血管浸潤の有無、腫瘍分化度、腫瘍浸潤様式、喫煙の有無などとの関連性を解析したところ、バイオマーカー値上昇促進に N ステージ、リンパ管・血管浸潤が関与している可能性が示唆された。

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 4 件)

1. 東 雅之、シェーグレン症候群に対する病期対応型テーラーメイド医療の構築、四国歯学会雑誌、査読無、23 巻、2011、85-89.
2. 桃田幸弘、東 雅之、舌痛を訴える患者について考える—舌痛症を中心に—、四国歯学会雑誌、査読無、23 巻、2011、133-137.
3. Spaan M, Porola P, Iain M, Rozman B, Azuma M, Konttinen YT. Healthy human salivary glands contain a DHEA-sulphate processing intracrine machinery, which is deranged in primary Sjögren's syndrome. J Cell Mol Med, 査読有、13, 2009, 1261-1270.
4. Sekiguchi M, Iwasaki T, Kitano M, Kuno H, Hashimoto Y, Azuma M, Hla T, Sano H. Role of sphingosine 1-phosphate in the pathogenesis of Sjögren's syndrome. J Immunol, 査読有、180, 2008, 1921-1928.

[学会発表] (計 19 件)

1. 茂木勝美、シェーグレン症候群唾液腺へのリンパ球浸潤における性ホルモン修飾酵素の役割、第 47 回日本口腔組織培養学会学術大会、2010 年 11 月 13 日、高知市
2. 山村佳子、カンジダ菌の検出と口腔乾燥の関連性、第 19 回日本口腔感染症学会総会、2010 年 11 月 6 日、大阪市
3. 高野栄之、単純性骨嚢胞を疑う骨性異形成症と考えられた 1 例、第 58 回日本口腔科学会中・四国地方部会、2010 年 11 月 6 日、広島市
4. 可児耕一、臼歯部離開を呈した閉口障害の 1 例、第 58 回日本口腔科学会中・四国地

方部会、2010 年 11 月 6 日、広島市

5. 茂木勝美、シェーグレン症候群唾液腺へのリンパ球浸潤における性ホルモン修飾酵素の役割、第 55 回日本口腔外科学会総会、2010 年 10 月 17 日、千葉市
6. 細川浩良、口腔白板症の臨床病理学的検討—悪性化の指標を探る—、第 55 回日本口腔外科学会総会、2010 年 10 月 17 日、千葉市
7. 東 雅之、口腔内科の役割と展望、四国アイランド歯科口腔外科 夏期合同研究会、2010 年 7 月 24 日、坂出市
8. 桃田幸弘、舌痛を訴える患者さんについて考える—舌痛症を中心に—、第 37 回四国歯学会例会、2010 年 7 月 1 日、徳島市
9. 東 雅之、徳島大学歯学部における口腔内科学分野の役割、第 37 回四国歯学会例会、2010 年 7 月 1 日、徳島市
10. 高野栄之、舌痛症患者に対する知覚・痛覚定量分析装置による痛みの客観的評価、第 64 回日本口腔科学会学術集会、2010 年 6 月 25 日、札幌市
11. 山村佳子、当科における口腔カンジダ症の臨床統計、第 39 回日本口腔外科学会中・四国地方会、2010 年 5 月 22 日、徳島市
12. 尾上富太郎、口腔扁平上皮癌細胞株における癌幹細胞マーカーの発現とヌードマウス造腫瘍性能の関連性、第 54 回日本口腔外科学会総会・学術大会、2009 年 10 月 9 日、札幌市
13. 内田大亮、ベスナリノンは CXCR-4 の発現抑制を介して唾液腺癌細胞の遠隔転移を抑制する、第 68 回日本癌学会学術総会、2009 年 10 月 3 日、横浜市
14. 尾上富太郎、ヒト唾液腺癌細胞株における癌幹細胞マーカーの発現とヌードマウス造腫瘍性との関連性、第 68 回日本癌学会学術総会、2009 年 10 月 3 日、横浜市
15. 大江 剛、超選択的動注化学放射線療法が著効した頸部リンパ節後発転移の 1 例、第 38 回日本口腔科学会中・四国地方会、2009 年 5 月 30 日、広島市
16. 茂木勝美、ヒト唾液腺導管細胞におけるアクアポリン 5 の発現誘導の解析、第 63

回日本口腔科学会学術集会、2009年4月16日、浜松市

()

研究者番号：

17. 佐々井明子、当科におけるエナメル上皮腫の臨床統計学的検討、第56回日本口腔科学会中・四国地方部会、2008年11月28日、米子市

18. 尾上富太郎、口腔扁平上皮癌の転移における metabotropic glutamate receptor 5 の役割、第67回日本癌学会学術総会、2008年10月29日、名古屋市

19. 尾上富太郎、唾液腺癌におけるケモカインレセプターCXCR4の発現、第53回日本口腔外科学会総会、2008年10月20日、徳島市

[図書] (計1件)

1. 東 雅之 他、飛鳥出版室、口腔内科学(癌細胞の増殖制御機構)、2008年、142-149

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東 雅之 (AZUMA MASAYUKI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：20144983

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者