

平成 22 年 4 月 30 日現在

研究種目：若手研究 (B)
研究期間：2008～2009
課題番号：20791549
研究課題名 (和文)：口腔癌におけるマッピングアレイを用いた全染色体上の構造異常の解明
研究課題名 (英文)：Elucidation of the structural abnormality on all chromosomes using mapping array in oral cancer

研究代表者
山本 信治 (YAMAMOTO NOBUHARU)
東京歯科大学・歯学部・助教
研究者番号：60385185

研究成果の概要 (和文)：【目的】本研究では Affymetrix GeneChip® Mapping 10K Array を用いて舌扁平上皮癌における全ゲノム上のゲノムコピー数異常を解析し舌扁平上皮癌の新規転移関連遺伝子の同定を試みた。【材料および方法】舌扁平上皮癌症例 20 例を使用した。病理組織学的に所属リンパ節転移陽性例 (pN(+)) 3 例および陰性例 (pN(-)) 2 例を GeneChip® Mapping 10K Array により解析し、pN(-) 例と比較して pN(+) 例に共通して認められるゲノムコピー数異常を検出、同座位に存在する転移関連遺伝子候補をリストアップした。さらに候補遺伝子の mRNA 発現状況を定量的 Real-time PCR 法により検証した。【結果】 pN(+) 例に共通してゲノムコピー数が増加していた領域は 16 領域、減少していた領域は 32 領域であった。これらの領域上に存在する 75 の候補遺伝子をリストアップした。pN(+) 例に特異的にコピー数が増加していた領域の一つ 6q25.3 領域には ZDHHC14 遺伝子が座位していた。同遺伝子の mRNA 発現量を定量した結果、高頻度な発現亢進が認められた (8/20 例 40%)。さらに mRNA 発現亢進は pN(+) 症例において有意に認められた (P=0.019)。【結論】これらの結果から ZDHHC14 が舌扁平上皮癌の新規転移関連遺伝子である可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：[Purpose] We analyzed genomic copy number abnormality on all genomes in the squamous cell carcinoma of the tongue using Affymetrix GeneChip® Mapping 10K Array in this study and tried the identification of the new metastasis connection gene of the squamous cell carcinoma of the tongue. [Materials and a method] We used 20 squamous cell carcinoma of the tongue cases. We analyzed a metastasis to regional lymph node-positive case (pN(+)) 3 cases and a negative case (pN(-)) 2 cases by GeneChip® Mapping 10K Array for histopathology and detected genome copy number abnormality we were common to a pN(+) case as compared with a pN(-) case, and to be found and listed the metastasis connection gene candidates who were present in theatrical company rank. Furthermore, we inspected the mRNA manifestation situation of the candidate gene by quantitative Real-time PCR. [Results] In the region that we were common to a pN(+) case, and a genomic copy number increased, 16 regions, region that decreased were 32 regions. We listed 75 existing candidate genes on these regions. A ZDHHC14 gene did locus in the one 6q25.3 region of the region that a copy number specifically increased for a pN(+) case. As a result of having assayed the mRNA expression level of the gene, high-frequency manifestation sthenia was found (40% of 8/20 cases). Furthermore, the mRNA manifestation sthenia was significantly found in a pN(+) case (P = 0.019). [Conclusions] These results suggested the possibility that ZDHHC14 was a new metastasis of the squamous cell carcinoma of the tongue-related gene.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：舌扁平上皮癌、ヘテロ接合性消失 (LOH)、コピー数異常 (CNA)、一塩基多型 (SNP)、癌抑制遺伝子 (TSG)

1. 研究開始当初の背景

癌治療において再発・転移の有無は重要な診断情報であり、その後の治療方針に大きく影響する。一旦、再発・転移が発生するとその結果は死に至ることが多いため、再発・転移が確認されていなくても、原発腫瘍の状況等から再発・転移の可能性が高いと判断されたときは、外科的追加切除や予防的な抗がん剤治療が行われる。しかし、予防的な抗がん剤治療では、実際に明らかな転移が存在しない事や、抗がん剤治療をしなくても良好な予後を得る症例が含まれているために、強い副作用を招くような強力な治療を行うことは少なく、結果として抗がん剤治療の効果が低下する。転移に関する、より信頼性のある情報があれば、強力な抗がん剤治療を行う根拠となり、また、不要な治療を避ける事が可能となる。

我々はこれまで、平成 17 年度から 2 年間、科学研究費 (課題番号 17791497) によって循環血清中の多くの free DNA、中でも、腫瘍細胞の free DNA の特定に成功し、再発・転移の早期診断や治療の効果判定に役立てている。その成果は海外論文でも発表し、高い評価を得ている。現在までに行われた口腔扁平

上皮癌におけるヘテロ接合性消失 (LOH) に関する研究から、多くのマイクロサテライト領域が判明している。この LOH の局在情報を癌細胞の指紋と考え、循環血清中の腫瘍 free DNA の検出を行う研究が可能となっている。そこで、本研究はさらに発展させ、口腔扁平上皮癌患者から抽出した DNA を用い、DNA マッピングアレイ解析を用いた全ゲノム上の LOH とコピー数異常の有無を検索する。その結果、数百〜数千の口腔癌に関与する新規未知癌抑制遺伝子座位が一度に同定することが可能となる。さらに本研究はこれまで行われてきたゲノム解析とは想像を遥かに超えるほどの情報量が得られ、新探索方法として確実に実績が上げられ、体内に潜む再発転移細胞の早期発見に結びつけられれば、口腔癌の再発・転移の診断・治療の向上に大きく貢献することが期待される。

2. 研究の目的

本研究は、これまで当講座において LOH に関する研究から、多くのマイクロサテライト領域を特定してきた。これらは、海外論文でも発表し高い評価を得ている。今回はさらに発展させ、31 億個の分子からなるヒトゲノムを

篩いに分け、ほんの一握り変異した遺伝子、欠損遺伝子や過剰コピーされた遺伝子を特定することが必要となる。これは気の遠くなる解析で、その進行はこれまで遅々としていた。そこで、本研究は Affymetrix 社製の GeneChip DNA マッピングアレイ解析を行い全ゲノム上のマイクロサテライト領域を一度に解析し、数百〜数千の口腔癌に關与する新規未知癌抑制遺伝子座位を一度に同定する。これはこれまで行われてきたゲノム解析とは想像を遙かに超えるほどの情報量が得られ、体内に潜む微小転移細胞や再発の早期発見に結びつけ、口腔癌の転移の診断・治療の向上を計ることを目的とする。

3. 研究の方法

1) 患者検体：東京歯科大学口腔外科を受診した100名の口腔扁平上皮癌患者から採取した検体を試料とする。試料は生検時または手術時に採取・保存しておく（採血も同時に行う）。
2) DNA の抽出：腫瘍ならびに正常 DNA は通法に従いフェノール・クロロフォルム抽出法により抽出・加工・調整する。採血しておいた全血液は遠心分離し白血球から正常 DNA を抽出する。
3) PCR およびマイクロサテライト解析：抽出した DNA を鋳型とし PCR 法 (polymerase chain reaction) を用いて増幅させ、マイクロサテライト解析を行なう。この解析は、Affymetrix 社製の GeneChip DNA マッピングアレイ解析を行い全染色体上の構造異常をマイクロサテライト領域を一挙に特定する。
4) ヘテロ接合性消失 (LOH) の評価：得られたマイクロサテライトバンドをコンピューター上にスキャンし、その強度を数値化する。腫瘍から得られた DNA におけるシグナル強度を、対応する正常組織または血液試料から得られた DNA と比較し、シグナル強度が 50%以

下を LOH と判定する。

5) 結果の再現性の確認：LOH を認めた試料については結果に再現性があることを確認するため、再度 PCR マイクロサテライト解析を行う。

6) 解析：LOH の頻度と臨床的・病理組織学的特性（性別、発生部位、TNM 分類、分化度、および経過など）から転移発生・予後予測の關係について解析を行う。

4. 研究成果

全ゲノムLOH解析の結果、1q31.1領域にコピー数の減少（コピー数：1）を認め、LOHの存在が示唆された。30例全例において、1q31.1領域に存在するマイクロサテライトマーカー（D1S1189、D1S2151、D1S2595）を用いたLOH解析を行った結果、D1S1189で18/30（60%）、D1S2151で16/30（53%）、D1S2595で21/30（70%）に高頻度なLOHが認められた。この領域には、*FAM5C*遺伝子が存在しており、Real-time quantitative RT-PCRの結果、舌癌由来細胞株5種において全例で、正常細胞株と比較し明らかな発現低下が認められ、15例の舌癌患者においても正常組織と比較し、有意に発現の低下が認められた。今回の結果より、1q31.1領域にLOHの存在が認められ、この領域に存在する*FAM5C*遺伝子は癌抑制遺伝子である可能性が示唆された。この研究はこれまで行われてきたゲノム解析とは想像を遙かに超えるほどの情報量が得られ、新探索方法として確実に実績が上げられ、これも海外論文で発表し大きな成果をあげた。また、日本口腔外科学会の学術奨励賞も受賞し高い評価を得た。

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 2 件）

①黒岩 司、山本信治、恩田健志、別所央城、
薬師寺 孝、片倉 朗、高野伸夫、柴原孝彦、
舌扁平上皮癌における高密度 SNP Genotyping
アレイを用いた全ゲノムコピー数とヘテロ
接合性消失の解析、日本口腔外科学会雑誌、
査読有、54 巻、2008、316-322

② Kuroiwa Tsukasa, Yamamoto Nobuharu,
Onda Takeshi, Shibahara Takahiko、
Expression of the FAM5C in tongue squamous
cell carcinoma、Oncology Reports、査読有、
22 巻、2009、1005-1011

〔学会発表〕（計 2 件）

① Kuroiwa Tsukasa, Yamamoto Nobuharu,
Onda Takeshi, Uchiyama Takeshi, Takano
Nobuo, Shibahara Takahiko、Analysis of
copy number abnormality (CNA) and loss of
heterozygosity (LOH) on whole genome using
single nucleotide polymorphism (SNP)
genotyping arrays in tongue squamous cell
carcinoma、第 8 回アジア口腔顎顔面外科学
会、2008 年 11 月 4 日、バンコク（タイ）

② Onda Takeshi, Yamamoto Nobuharu,
Yakushiji Takashi, Takagi Ryo, Kamiyama
Isao, Uchiyama Takeshi, Takano Nonuo,
Shibahara Takahiko、Aberrant expression of
ZDHHC14 gene in human tongue squamous
cell carcinoma、2009 年 9 月 20 日、ベルリ
ン（ドイツ）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 信治 (YAMAMOTO NOBUHARU)

東京歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：60385185

(2) 研究分担者：なし

(3) 連携研究者：なし