

平成 22 年 5 月 28 日現在

研究種目：若手研究 (B)
研究期間：2008～2009
課題番号：20791550
研究課題名 (和文) 口腔扁平上皮癌におけるアポトーシス阻害遺伝子 *survivin* の発現について
研究課題名 (英文) Expression of Apoptosis inhibitor gene, *Survivin*, in Human Oral Squamous Cell Carcinoma
研究代表者
池田千早 (IKEDA CHIHAYA)
東京歯科大学・歯学部・助教
研究者番号：80385187

研究成果の概要 (和文)：東京歯科大学倫理委員会の承認をうけ、38 名の口腔扁平上皮癌患者から同意をえて腫瘍組織、正常組織を採取した。そのすべてにおいて DNA の抽出を終了した。また、10 名において RNA を抽出した。その RNA のうち無作為に 3 名を選び Microarray を用いて全ゲノム網羅的に、口腔扁平上皮癌患者の遺伝子発現解析を行った。その結果 3 名で共通して過剰発現、発現低下を示したアポトーシス関連遺伝子は認めなかった。20 名の口腔扁平上皮癌患者の腫瘍組織、正常組織で *Survivin* の DNA コピー数を、また、5 つの口腔扁平上皮癌由来細胞株を用い *Survivin* の遺伝子発現を Real-time PCR 法にて解析した。その結果、口腔扁平上皮癌患者の腫瘍組織で 20 名中 5 名 (25.0%) で DNA コピー数の増幅を認め、細胞株の全て (100%) で *Survivin* 遺伝子の過剰発現を認めた。本研究は、口腔扁平上皮癌患者における診断や治療において新たなツールを見出すのに、有意義なものと考えられる。また、本研究の発展により、アポトーシスのカスケードにおいて新たな因子を見いだすことが予想される。

研究成果の概要 (英文) : We received the approval of the Tokyo Dental College Ethical Review Board and we obtained its consent from 38 patients with oral squamous cell carcinoma and obtained a tumor tissue, a normal tissue. We completed extraction of the DNA in the all. Also, it extracted RNA in ten people. We randomly chose three people among the RNA, and all genome cover analyzed the gene expression of the oral cavity squamous cell carcinoma patients using microarray. We randomly chose three people among the RNA, and all genome cover analyzed the gene expression of the oral cavity squamous cell carcinoma patients using Microarray. As a result, three people did not show the apoptosis association gene which they were common, and showed overexpression, a manifestation decrease. We used five oral cavity squamous cell carcinoma origin cell line in a DNA copy number of *Survivin* with the tumor tissue of 20 patients with oral squamous cell carcinoma, a normal tissue and analyzed gene expression of *Survivin* by real-time PCR. As a result, five of 20 people

(25.0%) showed the amplification of the DNA copy number with the tumor tissue of patients with oral squamous cell carcinoma, and all (100%) of the cell line showed the overexpression of the Survivin gene. It is thought that this study is significant to find a new tool in a diagnosis and the treatment in patients with oral squamous cell carcinoma. Also, it is suggested that we find a new factor in cascade of apoptosis by development of this study.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
20年度	1,400,000	420,000	1,820,000
21年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

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：歯学、癌、遺伝子、アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

Survivin は Inhibitor of Apoptosis (IAP) gene family の一つとして同定され、第17番染色体長腕上(17q25)に存在し、主として胎生期のG2期あるいは有糸分裂期に発現する (Ambrosini et al., 1997)。近年、食道癌 (Kato et al., 2001)をはじめ大腸癌 (Ambrosini et al., 1997)、肺癌 (Mariano et al., 1999)、および皮膚癌 (Lorenzo et al., 2000) など種々のヒト悪性腫瘍においてその蛋白が過剰発現することが報告されている。また、DNAのメチル化によりその発現が抑制さ

れていると報告されている。しかしながら、口腔領域での検索は十分になされていないのが現状である。そこで、口腔扁平上皮癌 (oral squamous cell carcinoma : OSCC) および前癌病変といわれる口腔粘膜疾患における Survivinの発現を、mRNAおよび蛋白レベルで検索し、さらにそのDNAのメチル化の関わりを調べることでsurvivinの役割を解析する。

これまでに、OSCC 一次症例 71 例および白板症 38 症例について免疫組織学的染色法を用い Survivin 蛋白の発現について検索した結果、正常細胞において Survivin 蛋白および Survivin mRNA の発現はほとんどみられず、

OSCC の 41 症例 (58%)、白板症の 14 症例 (37%) においてその過剰発現が認められたことから、OSCC および白板症においてアポトーシスが阻害されていることが示唆された。また、OSCC 一次症例 21 例について RT-PCR 法を用い Survivin mRNA の発現を検索した。8 例 (38%) で過剰発現を認め、Survivin 蛋白の発現は RNA レベルで調整されていることが示唆された。さらに、OSCC 由来細胞株 8 種類において脱メチル化部位を特異的に切断する制限酵素を用い Survivin exon1 のメチル化について検索したところ、正常細胞では DNA のメチル化がみられるが、5 種 (63%) において脱メチル化が認められた。このことから、Survivin の発現には DNA の脱メチル化が深く関わっていることが示唆された。メチル化させることによりその発現が抑制できる可能性が示唆される。Survivin の抑制が可能になれば、癌細胞においてアポトーシス誘導を促し、癌抑制因子として応用し得ると考えられる。以上より、Survivin は OSCC の発生において関与している可能性が示唆された。

2. 研究の目的

国内外において、Survivin の発現については、食道癌をはじめ、胃癌、肺癌、大腸癌など種々の悪性腫瘍で検索されており、その過剰発現が報告されている。また、近年では DNA のメチル化によりその発現が抑制されているとの報告もなされた。しかしながら、口腔領域での検索はほとんどなされていないのが現状である。本研究では、OSCC における Survivin 蛋白および mRNA の発現、また、メチル化との関係について検索・解明することにより、将来的には Survivin のアポトーシス阻害を抑制することで、癌細胞をアポトーシスへ導き、癌細胞抑制としての遺伝子治療に貢献できるであろう。加えて、その他のアポトーシス関連遺

伝子についても Microarray 法を用い解析する。本研究の結果は、口腔癌における診断や治療において新たなツールを見出すのに、有意義なものと考えられる。

また、本研究の発展により、アポトーシスのカスケードにおいて新たな因子を見出すことが予想される。

3. 研究の方法

東京歯科大学口腔外科学講座にて加療を行った口腔扁平上皮癌患者、前癌病変といわれる白板症患者を対象とした。また口腔扁平上皮癌由来細胞株も使用した。

本学倫理委員会の承認を得た後、口腔扁平上皮癌患者から同意をえて腫瘍組織、正常組織を採取する。それぞれ DNA、RNA を抽出し、ランダムに数名を選択し、totalRNA を用いて Microarray にて全ゲノム網羅的に Survivin を中心としたアポトーシス関連遺伝子の発現を中心に解析し、ターゲット遺伝子を選択する。Microarray は Roche NimbleGen の 385K-4Plex アレイ (72,000 プローブ x4) を使用する。Survivin および選択したターゲット遺伝子 DNA コピー数と遺伝子発現を Real-time PCR 法により検索するため、抽出した totalRNA を逆転写した cDNA を生成。Survivin および、その他ターゲット遺伝子にプライマーを設計し、Real-time PCR を行う。Survivin および各遺伝子の DNA のコピー数と mRNA の発現を解析する。また、抗 Survivin 抗体、その他候補遺伝子の抗体にて反応させる。DAB を用い発色検鏡し免疫組織学的にその蛋白の発現を検索する。さらにメチル化を検索するために、抽出した DNA に制限酵素 HindIII を加え DNA を切断エタノール沈殿した試料に制限酵素 Hpa II を加えメチル化されていない部位を切断エタノール沈殿した試料を用い Survivin exon1 に特異的なプライマ

ーを用い PCR 法により増幅させる。3%アガロースゲルを用い、電気泳動にて分離する。

なお本研究はヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針を遵守して実施している。

4. 研究成果

東京歯科大学倫理委員会の承認をうけ、38名の口腔扁平上皮癌患者から同意をえて腫瘍組織、正常組織を採取した。そのすべてにおいて DNA の抽出を終了した。また、10名において RNA を抽出した。その RNA のうち無作為に 3名を選び Microarray を用いて全ゲノム網羅的に、口腔扁平上皮癌患者の遺伝子発現解析を行った。その結果 3名で共通して過剰発現、発現低下を示したアポトーシス関連遺伝子は認めなかった。20名の口腔扁平上皮癌患者の腫瘍組織、正常組織で Survivin の DNA コピー数を、また、5つの口腔扁平上皮癌由来細胞株を用い Survivin の遺伝子発現を Real-time PCR 法にて解析した。その結果、口腔扁平上皮癌患者の腫瘍組織で 20名中 5名 (25.0%) で DNA コピー数の増幅を認め、細胞株の全て (100%) で Survivin 遺伝子の過剰発現を認めた。本研究は、口腔扁平上皮癌患者における診断や治療において新たなツールを見出すのに、有意義なものと考えられる。また、本研究の発展により、アポトーシスのカスケードにおいて新たな因子を見いだすことが予想される。残念ながら今回は、免疫染色、メチル化の検索において条件設定が上手くいかず、成果を挙げられなかったが、今後は症例数を増やし、Survivin の DNA コピー数、mRNA および蛋白レベルで発現を解析し、さらにその DNA のメチル化の実験を行っていく予定である。

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)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田 千早 (IKEDA CHIHAYA)

東京歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：80385187

(2) 研究分担者：なし

(3) 連携研究者：なし