

機関番号：20101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21792021

研究課題名(和文) 口腔癌における SFRP 遺伝子の発現解析と分子標的の開発

研究課題名(英文) Expression analysis of SFRP family genes for development of molecular targeted therapy for oral cancer

研究代表者 曾我部 陽平

(SOGABE YOHEI)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：50468104

研究成果の概要(和文)：本研究は口腔扁平上皮癌(OSCC)における SFRP 遺伝子のエピジェネティックな不活化と Wnt シグナル経路関連因子の異常について解析したものである。本研究は OSCC における SFRP 遺伝子群のメチル化と発現消失を初めて明らかにした。OSCC において他の Wnt シグナル関連遺伝子異常は稀であることから、SFRP 遺伝子メチル化は Wnt シグナル活性化の要因の一つと考えられる。SFRP は OSCC の診断・治療において重要な分子マーカーとなりうることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we examined the relationship between Wnt signaling and epigenetic alteration of the secreted frizzled-related protein (SFRP) genes in OSCC. Our results confirm the frequent methylation and silencing of SFRP genes in OSCC, and suggest that their loss of function contributes to activation of Wnt signaling that leads to cell proliferation during oral carcinogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：臨床腫瘍学、エピジェネティクス

## 1. 研究開始当初の背景

Wnt シグナル経路の活性化は発癌に重要な役割を果たしている。これまで、口腔扁平上皮癌(OSCC)においては E-cadherin や  $\beta$ -catenin 蛋白発現異常が高頻度に認められるが、APC、CTNNB1 ( $\beta$ -catenin)、AXIN 遺伝子変異の頻度は低いと報告されている。SFRP 蛋白は Wnt リガンドあるいはその受容体である Frizzled (Fz) と結合することで、Wnt と Fz の結合を阻

害する。我々は以前に分泌型 Frizzled 関連蛋白(SFRP)遺伝子群が、大腸癌・胃癌において高頻度に DNA メチル化によって不活化しており、Wnt シグナル活性化の一因となっていることを報告した。口腔癌における SFRP 遺伝子異常の報告はなされていなかったが、同様のメカニズムによる癌抑制が起こっている可能性が考えられた為、研究の着手へと至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、OSCCにおけるWntシグナル異常の解明および癌診療における新たな分子マーカーを見出すことを目的として、OSCCにおけるSFRP遺伝子異常を解析することとした。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞株と組織検体

17細胞株(HSC-2, HSC-3, HSC-4, Ca9-22, OSC-19, OSC-20, OSC-30, OSC-70, SAS, KOSC-3, Ho-1-u-1, Ho-1-N-1, HOC119, HOC621, MoN2, MoTおよびOM1)および札幌医科大学附属病院歯科口腔外科の口腔扁平上皮癌患者44人からの44の癌組織および33の非癌組織を用いた。フェノールクロロホルムを用いてゲノムDNAを抽出した。Total RNAの抽出にはTRIzol試薬(Invitrogen, USA)およびDNA-free kit(Ambion, USA)を用いた。また、対照としてBiochain社(USA)から市販されている正常口腔粘膜からのTotal RNAを用いた。

### (2) 遺伝子変異解析

APCのexon16のcodon 1140-1545の変異を解析した。この部位に一致するゲノムDNAをAPC-F1およびAPC-R1プライマーを用いて増幅したものからゲル切り出しを行い、PCR産物をABI3100自動シーケンサー(Applied Biosystems, USA)でダイレクトシーケンスを行った。シーケンスはセンスおよびアンチセンス両方向から2組のプライマー

(APC-F2, APC-F3, APC-R2, APC-R3)を用いて行った。またCTNNB1 exon3についてもセンスおよびアンチセンス両方向から増幅し、シーケンサーで変異解析を行った。PCRには50ngのゲノムDNAを含む50 $\mu$ l溶液と1x Ex Taq Buffer(タカラバイオ, 大津)、0.3mM dNTP、それぞれ0.25 $\mu$ Mのプライマーおよび1UのTakara Ex Taq Hot Start Version(タカラバイオ)を用いた。PCRは最初に95 $^{\circ}$ Cで5分間の熱変性を行った後、95 $^{\circ}$ C1分の熱変性-55 $^{\circ}$ C1分のアニーリング-72 $^{\circ}$ C1分の伸張反応を35サイクル行い、72 $^{\circ}$ C7分の最終伸張を行った。プライマー配列をTable Iに示す。

### (3) RT-PCR

SuperScript III 逆転写酵素(Invitrogen)を用い、一本鎖cDNAを作製。コントロールにはGAPDHを用いた。PCRには100ngのcDNAを含む50 $\mu$ lの溶液、1x Ex Taq Buffer(Takara)、0.3mM dNTP、それぞれ0.25 $\mu$ Mのプライマーおよび1UのTakara Ex Taq Hot Start Version(タカラバイオ)を用いた。PCRは最初に95 $^{\circ}$ Cで5分間おいた後、95 $^{\circ}$ C1分-55 $^{\circ}$ C1分-72 $^{\circ}$ C1分を35サイクル、最終伸張を72 $^{\circ}$ C7分の条件で行った。RT-PCR用のプラ

イマー配列とPCR産物のサイズをTable Iに示す。

Table I. Sequences of the primers used in this study and the expected product sizes.

	Sense	Antisense	Product size (bp)
<b>Mutation analysis</b>			
APC	F1: 5'-GCCCTACCAATTATGATGAACGT-3' F2: 5'-GCCACTGCAAGGTTCTTC-3' F3: 5'-TTGAGTGTGCTCGATTGCC-3'	R1: 5'-TGATCTTTAGGCTGCTCTGAT-3' R2: 5'-AAGAGTCACTGGGCTATA-3' R3: 5'-TCAGCTGATGACAAAGATGA-3'	1219
CTNNB1	5'-CCAATCTACTAATGCTAATACGTG-3'	5'-CTGACTCTGACTTTCAGTAAAGG-3'	310
<b>Methylation analysis</b>			
CDH1 MSP-U	5'-TTTTAGTAAATAGTGGTATGGGGGT-3'	5'-AATACAATCAATCAACCAACTAAAACA-3'	160
CDH1 MSP-M	5'-TTAGTAAATAGCGGTACGGGGGC-3'	5'-CGATCGAATCGAACCGAATAAACG-3'	153
SFRP1 MSP-U	5'-GTTTGTAGTTTTTGGAGTTAGTGTGTGT-3'	5'-CTCAACTACAATCAAAAACACACAACA-3'	135
SFRP1 MSP-M	5'-TGTAGTTTTGGAGTTAGTGTGTGT-3'	5'-CTCAACTACAATCAAAAACACACAACA-3'	126
SFRP2 MSP-U	5'-TTTGGGTGGAGTTTTTGGAGTTGTGT-3'	5'-AACCCACTCTCTCAATACAACA-3'	145
SFRP2 MSP-M	5'-GGGTGGAGTTTTTGGAGTTGTGT-3'	5'-CCGCTCTCTCTCAATACAACA-3'	138
SFRP5 MSP-U	5'-GTAAGATTGGTGTGGGTGGGTGT-3'	5'-AAAACCTCAACCAAACTCCATACA-3'	136
SFRP5 MSP-M	5'-AAGATTGGGTGGGTGGGTGGGTGT-3'	5'-ACTCCAAACCAAACTCCGCGTACG-3'	141
SFRP1 bis-seq	5'-GTTTGTGTTTTAAAGGGTGTGTAG-3'	5'-ACACTAATCCRAAACTACAACA-3'	209
SFRP2 bis-seq	5'-TAAAGAAATTTGGTGTGTGTAA-3'	5'-CAACRAAACTCAAACTACAACA-3'	280
SFRP5 bis-seq	5'-TAAATGTTTGGGAGGTAGGAGT-3'	5'-AATGCCAAATAAATAACAACACT-3'	293
<b>RT-PCR</b>			
CDH1	5'-GATCCATTCTTGCTCAACGCT-3'	5'-TCACCTGAGCATCTGTGTTCT-3'	365
SFRP1	5'-CCACGAGTACGACTACGTGAGCT-3'	5'-CTCAGATTCACTGTGTCACAGG-3'	497
SFRP2	5'-ATGATGATGACACGACATAATG-3'	5'-ATGCGCTGAACTCTCTCTGC-3'	322
SFRP5	5'-CAGATGTGCTCCAGTACTTTG-3'	5'-AGAAGAAAGGTAGTAAAGGGAG-3'	346
WNT1	5'-GTCTGATACGCCAAAATCCGG-3'	5'-CTCTGTGTGTGAAAGTTCAATG-3'	404
WNT2	5'-TGAAGACAGATGTGAGTGGC-3'	5'-ACTTACACCAACTGTGGTAT-3'	379
WNT2B	5'-GGACTGATCTCTACTTTGAC-3'	5'-TTGAGTTGAGAGCTTAAATGG-3'	338
WNT3	5'-ATGACACCTGGCCATCTTTG-3'	5'-AGCCGCTGGCATGCTGATTTG-3'	349
WNT3A	5'-GGCATCAAGATTGCTACGAG-3'	5'-CACTTGGAGTGTCTGGTGG-3'	404
WNT4	5'-ATGCTCTGACAACATCCCTA-3'	5'-TGGCGCTGAACTGTGGTGTG-3'	333
WNT5A	5'-TGGGAGTGCAATGTCTCCAAG-3'	5'-AGGTTTATCCACAGTGTGCA-3'	314
WNT5B	5'-GAAAGTGTGGCAATGTGACA-3'	5'-ATCCAACTACTTGTGCAAA-3'	355
WNT6	5'-TACAGCAGGCTGCTATGG-3'	5'-AATGGAGGCAACTCTTCCAG-3'	370
WNT7A	5'-GCAAGCATCACTGTAAACA-3'	5'-TCTTCTTGGCAGCACAGT-3'	310
WNT7B	5'-CATCACAGGTCAGTACCA-3'	5'-CTTACTGTTATGAGGCTTAT-3'	353
WNT11	5'-GAACTGCTCCATTGAGCT-3'	5'-CTTACACTCAATTCAGAGAG-3'	364
GAPDH	5'-CGGAGTCAACGGATTGGTGTAT-3'	5'-AGCCCTCTCCATGGTGGTGAAG-3'	307

### (4) メチル化解析

ゲノムDNAをBisulfite処理し、メチル化特異的PCR(MSP)法およびbisulfiteシーケンス法によりメチル化の解析を行った。PCRには50ngのbisulfite処理を行ったDNAを含む25 $\mu$ lの溶液、1x MSP buffer [67  $\mu$ M Tris-HCl (pH 8.8), 16.6  $\mu$ M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 6.7  $\mu$ M MgCl<sub>2</sub>および10  $\mu$ M 2-mercaptoethanol]、1.25 mM dNTP、それぞれ0.4  $\mu$ Mのプライマーと0.5UのJumpStart Red Taq DNA Polymerase(Sigma)を用いた。MSPでは95 $^{\circ}$ Cで5分間熱変性させた後、95 $^{\circ}$ C30秒-60 $^{\circ}$ C30秒-72 $^{\circ}$ C30秒を35サイクル行った後、72 $^{\circ}$ Cで7分間最終伸張を行った。Bisulfiteシーケンスでは95 $^{\circ}$ C5分の熱変性の後、95 $^{\circ}$ C1分-60 $^{\circ}$ C1分-72 $^{\circ}$ C1分を35サイクル行った後、72 $^{\circ}$ Cの最終伸張を7分間行った。bisulfiteシーケンスで増幅されたPCR産物はpCR2.1TOPOベクター(Invitrogen)で複製され、10のクローンについてシーケンスを施行した。プライマーシーケンスおよびPCR産物のサイズをTable Iに示す。

### (5) ウェスタンブロット

20 $\mu$ gの細胞溶解産物を10%のSDS-PAGEにさらし、溶解したタンパクをImmobilon-P膜(Millipore, USA)に転写。膜はTBS中で5%脱脂乳および0.1%Tween-20でブロックし、抗 $\beta$ -catenin(BD Biosciences, USA)および抗GAPDH抗体(Santa Cruz Biotechnology, USA)でprobeし、enhanced chemiluminescence(Amersham, USA)で可視化した。

### (6) 蛍光免疫染色

チャンバースライド上で培養した細胞をPBS

で洗浄し、4%パラホルムアルデヒドで固定した後、抗β-cateninモノクローナル抗体(BD Biosciences)でインキュベートし、抗マウスIgG Alexa Fluor488(Invitrogen)で染色、FV300-IX71 共焦点レーザー顕微鏡(オリンパス, 東京)で観察を行った。

(7) コロニーフォーメーションアッセイ  
6 ウェルプレート上に  $1 \times 10^5$  の細胞をまき、24 時間後にトランスフェクションを施行。それぞれ 4μg の pcDNA3.1His-SFRP ベクターもしくは空ベクターを Lipofectamine2000 (invitrogen) でトランスフェクトした。トランスフェクションの 24 時間後に、60mm 培養皿に細胞を継代し、G418 を 0.6mg/ml の濃度で含む培地中で 14 日間選択培養。選択培養後コロニーをギムザ染色し、コロニーの総面積を Image J(NIH, USA) ソフトウェアで解析。

(8) 統計分析  
統計解析には SPSS version11.0(SPSS Inc, USA) を使用。SFRP 遺伝子のメチル化と臨床病理学的因子との相関について、マン・ホイットニーの U 検定およびフィッシャーの正確確率検定を用いて評価した。P 値 0.05 未満を有意差ありと判定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) OSCC 細胞株におけるβ-catenin 発現の解析

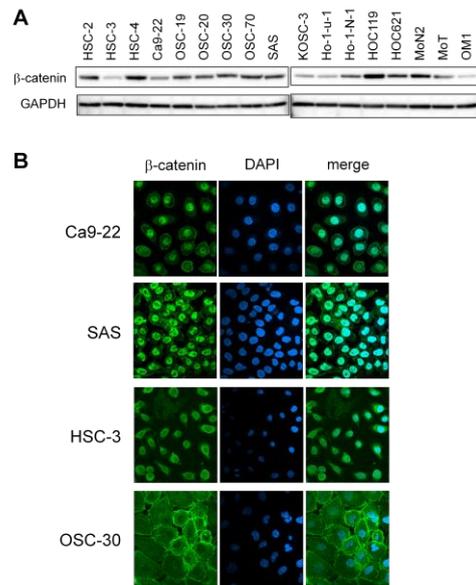
OSCC における Wnt シグナル経路の活性化を知るために、まずはじめに OSCC 細胞株における β-catenin 発現の解析を行った。抗 β-catenin 抗体を用いたウエスタンブロット解析では、調べたすべての細胞株において内因性の β-catenin の発現を認めた (Fig. 1A)。蛍光免疫染色においては 15 細胞株 14 細胞株 (93%) において内因性 β-catenin の核または細胞質への局在を認めた (TableII および Fig. 1B)。7 細胞株 (47%) で β-catenin の細胞膜への局在を認めたが、これらの細胞の多くのが核や細胞質でも局在が見られた。これらのことから、OSCC において Wnt シグナルが活性化している可能性が考えられた。

Table II. Summary of β-catenin staining and genetic/epigenetic analysis of Wnt-related genes in OSCC cell lines.

	β-catenin staining	APC	CTNNB1	CDH1	SFRP1	SFRP2	SFRP5
HSC-2	C	WT	WT	U	M	M	M
HSC-3	C	WT	WT	U	M	M	M
HSC-4	CM	WT	WT	U	M	M	M
Ca9-22	N	WT	WT	U	M	M	M
OSC-19	C	WT	WT	U	U	M	M
OSC-20	C	WT	WT	U	U	M	M
OSC-30	CM	WT	WT	U	U	M	M
OSC-70	C	WT	WT	U	U	M	M
SAS	N	WT	WT	U	M	M	M
KOSC-3	C	WT	WT	U	M	M	M
Ho-1-u-1	ND	WT	WT	U	U	M	M
Ho-1-N-1	NCM	WT	WT	U	U	M	U
HOC119	M	WT	WT	U	M	M	U
HOC821	CM	WT	WT	U	U	U	U
MoN2	CM	WT	WT	U	U	M	M
MoT	ND	WT	WT	U	U	M	M
OM-1	CM	WT	WT	U	U	M	M

β-catenin: C, cytoplasmic; M, membrane-bound; N, nuclear; ND, not done. Genetic/epigenetic analysis: WT, wild-type; M, methylated; U, unmethylated.

Figure 1



##### (2) OSCC における APC および CTNNB1, CDH1 の解析

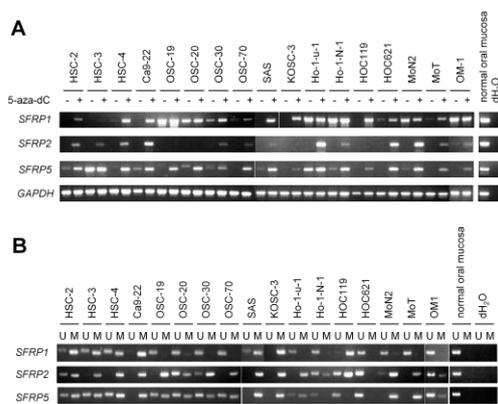
OSCC 細胞における Wnt シグナル活性化のメカニズムを明らかにするため、APC および CTNNB1 の変異解析を行った。17 の OSCC 細胞株を用いて APC 遺伝子の mutation cluster 領域である codon 1140-1545 を調べた。この領域は大腸癌においては体細胞突然変異が高頻度に見られる領域であるが、今回調べた中において、OSCC においては遺伝子変異が一つも見つからなかった (TableII)。我々は OSCC における CTNNB1 の変異についても解析を行った。ヒト癌において最も変異の多く見つかっている exon3 について変異解析を行った。しかしながら、OSCC では APC 同様、CTNNB1 においても変異は見つからなかった。加えて、E-cadherin の消失によって細胞膜に局在する β-catenin が減少する可能性が考えられることから、OSCC 細胞株において CDH1 がエピジェネティックに不活性化されているかどうかを調べた。MSP 解析では CDH1 のメチル化は調べた細胞株中では一つも認められず、RT-PCR ですべての細胞株で CDH1 の発現が確認された。OSCC 細胞株においては、APC、CTNNB1、CDH1 ともメチル化は見られなかった。

##### (3) OSCC 細胞株における SFRP 遺伝子の発現解析

以前に我々は大腸癌や胃癌で 5 つあるうち SFRP のうち 3 つの SFRP (SFRP1, -2, -5) がメチル化によって抑制されている事を報告した。それゆえ、まずは OSCC 細胞株でのこれら 3 つの SFRP について発現の解析を行った。17 細胞株中 7 株 (HSC-2, HSC-3, HSC-4, Ca9-22, SAS, KOSC-3, HOC119) で SFRP1-mRNA の発現

消失が見られ、DNA メチル化転移酵素阻害剤である 5-aza-dC によって発現の回復が見られた (Fig. 2A)。発現レベルの低かった 4 つの細胞株 (OSC-30、OSC-70、HOC621、MoT) において 5-aza-dC によって発現レベルの上昇が見られた (Fig. 2A)。SFRP2 はすべての細胞株で発現が消失し、5-aza-dC により発現の回復が見られた。SFRP5 の mRNA レベルは 15 細胞株 (HSC-2、HSC-4、Ca9-22、OSC-19、OSC-20、OSC-30、OSC-70、SAS、KOSC-3、Ho-1-N-1、HOC119、HOC621、MoN2、MoT、OM-1) で発現消失が見られ、5-aza-dC で発現の回復が見られた (Fig. 2A)。正常口腔粘膜では解析を行った 3 つの SFRP すべてで発現が見られた (Fig. 2A)。これらより、OSCC において SFRP がメチル化を通じたエピジェネティックな抑制の標的となっている可能性が示唆された。

Figure 2



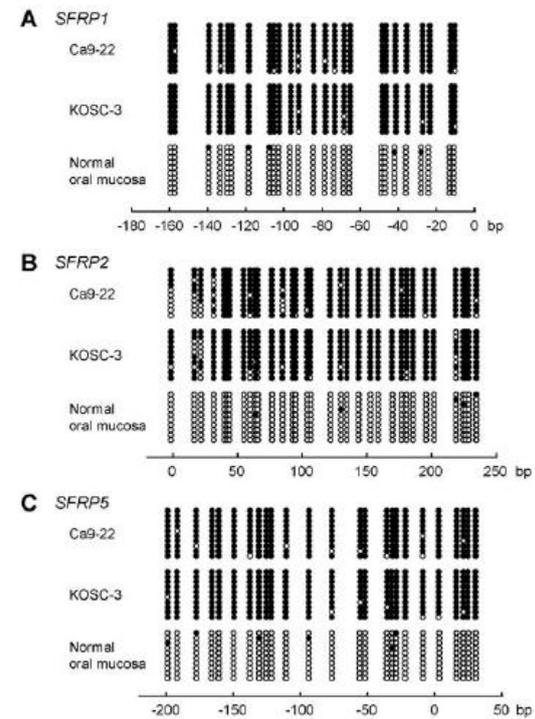
#### (4) OSCC 細胞株における SFRP 遺伝子のメチル化解析

MSP 法にてメチル化の解析を行った。OSCC 細胞株において 17 細胞株中 7 株 (41%) において SFRP1 遺伝子のメチル化を認めた (Fig. 2B、Table II)。SFRP2 は 16 細胞株 (94%)、SFRP5 は 14 細胞株 (94%) でメチル化が認められた (Fig. 2B、Table II)。少しの例外を除いて、メチル化と SFRP 遺伝子の発現抑制との間には相関が見られた。HSC-3 細胞と Ho-1-u-1 細胞において、SFRP5 遺伝子のメチル化が見られたが (Fig. 1B)、mRNA の発現が見られる (Fig. 1A) のは、非メチル化のアレルによる可能性が考えられる。逆に、RT-PCR 解析では SFRP1 の転写レベルは 4 つの細胞株 (OSC-30、OSC-70、HOC621、MoT) で抑制されていたが、メチル化は認められなかった (Fig. 2)。同様に、HOC621 は SFRP2、-5 とともにメチル化が見られなかったが、転写も見られなかった (Fig. 2)。メチル化が見られないにもかかわらず 5-aza-dC により遺伝子発現が回復する事から、これらの細胞においては他の何かのエピジェネティックな機構が関わっている

のかもしれない (Fig. 2A)。正常口腔粘膜においてはいずれの SFRP 遺伝子ともメチル化は認められなかった (Fig. 2B)。

より詳細なメチル化の状態を知るため、OS 抽出した OSCC2 株と正常口腔粘膜の bisulfite シークエンスを施行した。結果、正常口腔粘膜ではほぼすべての CpG サイトでメチル化が検出されなかったのに対し、解析を行った Ca9-22 細胞および KOSC-3 細胞においては SFRP1、-2、-5 とともに広範囲にメチル化が検出された (Fig. 3)。

#### (5) OSCC 臨床例における SFRP のメチル化 OSCC 培養株で SFRP の高頻度な



メチル化が認められた事より、OSCC 臨床例における異常メチル化の解析を行った。MSP 法では SFRP1 は 42 例中 10 例 (24%)、SFRP2 は 44 例中 16 例 (36%)、SFRP5 は 43 例中 7 例においてメチル化が見られた (Table III、Fig. 4)。2 症例において PCR 増幅が不十分であった為、SFRP1 のメチル化の判定が不能、1 症例において SFRP5 のメチル化の判定が不能であった。解析を行った 44 症例のうち 22 症例 (50%) において、SFRP1、-2、-5 のうち少なくとも 1 つ以上の SFRP のメチル化が認められた (Table III)。一般的に SFRP のメチル化は癌特異的に見られるのに対し、OSCC の非癌部でも SFRP のメチル化が検出された (Fig. 4)。これは癌部に隣接する非癌部から組織を採取したため、癌細胞が混入していた可能性が考えられる。

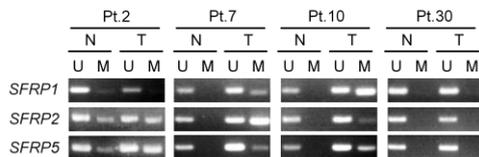
Table III. SFRP methylation and clinicopathological features in primary OSCC.

	No.	SFRP1 <sup>a</sup>		SFRP2		SFRP5 <sup>b</sup>		Any SFRP	
		Unmethylated	Methylated	Unmethylated	Methylated	Unmethylated	Methylated	Unmethylated	Methylated
Total	44	32	10	28	16	36	7	22	22
		76.20%	23.80%	63.60%	36.40%	83.70%	16.30%	50.00%	50.00%
Sex									
Male	25	16	9	15	10	21	3	12	13
Female	19	16	1	13	6	15	4	10	9
		p=0.051		p=0.753		p=0.680		p=1.000	
Age (years, mean ± SD)	64.32±14.11	64.50±14.17	65.00±10.52	63.44±15.01	64.82±13.82	63.56±14.38	67.14±14.05	62.41±14.00	66.23±14.28
		p=0.919		p=0.738		p=0.548		p=0.376	
pT category									
pT1	8	7	0	5	3	7	1	4	4
pT2	26	20	6	18	8	22	3	16	10
pT3	4	3	1	2	2	3	1	1	3
pT4	6	2	3	3	3	4	2	1	5
		p=0.060		p=0.526		p=0.339		p=0.145	
pN category									
pN0	27	20	5	17	10	22	5	14	13
pN1	9	6	3	7	2	7	1	5	4
pN2	7	5	2	3	4	6	1	2	5
pN3	1	1	0	1	0	1	0	1	0
		p=0.652		p=0.911		p=0.664		p=0.686	
pM category									
pM0	44	32	10	28	16	36	7	22	22
pM1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		p=1.000		p=1.000		p=1.000		p=1.000	
Stage									
I	8	7	0	5	3	7	1	4	4
II	15	11	4	10	5	12	3	9	6
III	10	8	2	8	2	8	1	6	4
IV	11	6	4	5	6	9	2	3	8
		p=0.146		p=0.535		p=0.956		p=0.273	
Differentiation									
Moderate	18	14	4	14	4	16	1	13	5
Well	22	16	5	13	9	17	5	9	13
		p=1.000		p=0.312		p=0.206		p=0.062	
Mode of invasion									
2	6	5	1	4	2	4	2	4	2
3	17	13	3	13	4	14	3	9	8
4C	9	5	4	5	4	8	1	4	5
4D	2	2	0	1	1	1	0	1	1
		p=0.378		p=0.684		p=0.693		p=0.868	
Smoking									
+	23	15	8	13	10	19	3	11	12
-	20	16	2	15	5	16	4	11	9
		p=0.142		p=0.336		p=0.691		p=0.763	
Alcohol									
+	26	19	6	17	9	22	3	15	11
-	17	12	4	11	6	13	4	7	10
		p=1.000		p=1.000		p=0.413		p=0.358	

<sup>a</sup>Total sample number is 42 for SFRP1. <sup>b</sup>Total sample number is 43 for SFRP5.

次に、SFRP 遺伝子メチル化の状態と OSCC の臨床病理学的所見との関連について検討を行った (Table III)。男性において SFRP1 のメチル化が多い傾向にあった。その他 SFRP のメチル化は年齢、T 分類、N 分類、N 分類、分化度、病期分類、喫煙歴、飲酒歴との間に関連を見いだす事は出来なかった。

Figure 4

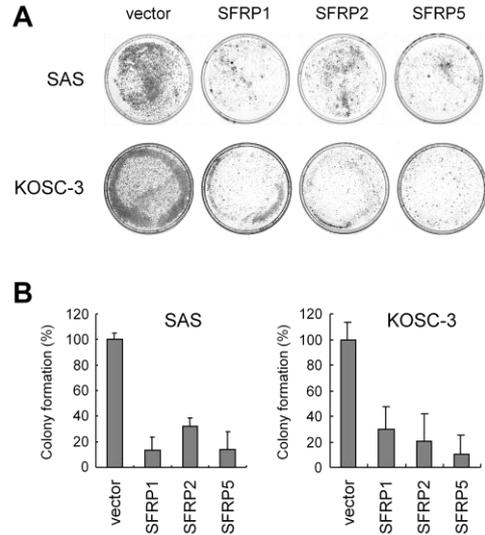


#### (6) SFRP 高発現による OSCC 細胞の増殖抑制

これまでの結果より、SFRP の発現消失が OSCC 細胞の発現消失につながっている可能性が考えられた。OSCC 細胞株における Wnt 配位子の発現を RT-PCR によって解析した。Wnt1、Wnt2 遺伝子はいずれの OSCC 細胞株においても発現が見られなかったものの、すべての OSCC 細胞株において、複数の Wnt 遺伝子の発現が認められた (Fig. 5)。特に Wnt3A、-6、-7 は多くの OSCC 細胞株で発現が認められた。正常口腔粘膜においては Wnt 遺伝子群の発現は一つも見られなかった (Fig. 5)。これらの事より、OSCC 細胞において SFRP 遺伝子の発現消失は Wnt 配位子に何らかの影響を与えてい

る可能性が考えられた。我々は OSCC 細胞株である SAS と KOSC-3 において SFRP1、-2、-5 をトランスフェクションで強制発現させ、コロニーフォーメーション解析を行う事で SFRP による腫瘍増殖抑制能の機能解析を行った (Fig. 6)。これらの細胞で SFRP を強制発現させる事によって細胞増殖が明らかに抑制された事から、OSCC においては SFRP は Wnt シグナルを抑制する事によって腫瘍を抑制している可能性が示唆された。

Figure 6



#### (7) まとめ

正常口腔上皮ではβ-catenin 蛋白は細胞膜に局在しているが、OSCC では膜局在が減少・消失して細胞質・核への集積が増加することが複数の研究者により報告されている。さらに、そのようなβ-catenin 蛋白の発現変化は予後不良因子であるという報告もある。我々の蛍光免疫染色の結果からも、ほとんどの細胞株においてβ-catenin の細胞質・核集積を認める一方、細胞膜局在を示した細胞株は半数以下であった。これらのことから OSCC の発癌に Wnt シグナルが重要な役割を担っている事が推測される。しかし、これまでの報告から OSCC における APC、CTNNB1、AXIN の遺伝子変異頻度は極めて低いとされている。さらに複数の研究者が APC の LOH を解析しているがその頻度は 13%~73%とばらつきが多い。我々も OSCC 細胞株における APC、CTNNB1 の遺伝子変異および CDH1 のメチル化を解析したが、一例も異常を認めなかった。

今回、我々は OSCC 細胞株および臨床例において SFRP 遺伝子メチル化が高頻度であることを明らかにした。OSCC における APC、CTNNB1、AXIN、CDH1 遺伝子異常が稀であることと併せると SFRP メチル化は OSCC における Wnt シグナル活性化の主要なメカニズムの一

つであると考えられる。OSCC において SFRP が癌抑制遺伝子として機能しているかどうかを確認するために、細胞株における Wnt リガンド遺伝子の発現解析を行ったところ、全ての細胞株において複数の Wnt リガンドの発現が確認されたことから、SFRP の消失は Wnt シグナルの活性化につながると考えられた。SFRP 発現が消失した OSCC 細胞に SFRP 遺伝子を導入することで増殖が抑制されたことから、SFRP が OSCC における新規の癌抑制遺伝子である事が示唆された。

本研究は OSCC における SFRP 遺伝子群のメチル化と発現消失を初めて明らかにした。OSCC において他の Wnt シグナル関連遺伝子異常は稀であることから、SFRP 遺伝子メチル化は Wnt シグナル活性化の要因の一つと考えられる。SFRP は OSCC の診断・治療において重要な分子マーカーとなりうる事が示唆された。

#### 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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

曾我部 陽平 (SOGABE YOHEI)  
札幌医科大学・医学部・研究員  
研究者番号：50468104

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

荻 和弘 (OGI KAZUHISO)  
札幌医科大学・医学部・助教  
研究者番号：40433114  
平塚 博義 (HIRATSUKA HIROYOSHI)  
札幌医科大学・医学部・教授  
研究者番号：50165180  
時野 隆至 (TOKINO TAKASHI)  
札幌医科大学・医学部・教授  
研究者番号：40202197