

機関番号：32650

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21792033

研究課題名(和文) 口腔扁平上皮癌における新規転移メカニズムの解明

研究課題名(英文) Clarification of Novel Metastatic mechanism in Oral Squamous Cell Carcinoma

研究代表者

恩田 健志(ONDA TAKESHI)

東京歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：30433949

研究成果の概要(和文)：

本研究の目的は、ヒト全遺伝子搭載DNAチップを用いて口腔扁平上皮癌の新規転移関連遺伝子を同定し転移の診断および腫瘍の悪性度の評価を可能にすることであった。口腔組織、口腔扁平上皮癌組織、リンパ節転移組織の網羅的遺伝子発現解析により zinc finger DHHC-type containing 14(ZDHHC14)、Spleen tyrosine kinase(SYK)等をはじめとした、75個の候補遺伝子をリストアップした。各症例に共通して発現異常が認められる遺伝子は少なくとも口腔扁平上皮癌においては50遺伝子以上は存在する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：

The aim of this study was to identify novel metastasis-associated gene of oral squamous cell carcinoma by using DNA microarray on which all human genes are carried in order to make it possible to diagnose metastasis as well as to evaluate grade of tumor. Based on a global gene expression analysis on oral tissue, oral squamous cell carcinoma tissue and lymph node metastasis tissue, 75 of candidate genes including zinc finger DHHC-type containing 14(ZDHHC14) and Spleen tyrosine kinase(SYK) have been listed up. It has suggested a possible existence of more than 50 of genes with impaired expression, which are commonly recognized in each case, at least in oral squamous cell carcinoma, if not in all cases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,900,000	570,000	2,470,000

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：扁平上皮癌・プロテオミクス・癌遺伝子・癌抑制遺伝子

1. 研究開始当初の背景

癌転移の有無は、臨床上癌患者の予後に直結する因子の一つである。近年、遺伝子の発現異常と各種癌転移との関係が少しずつ報告されてきた。とくに Spleen tyrosine kinase (SYK) は乳癌及び膵臓癌でリンパ節転移を有する症例において高頻度に発現が低下して

いる事が報告されている。さらに培養細胞を用いた実験により SYK の発現を抑制すると細胞の浸潤能が増強されるという現象も報告されている。癌転移メカニズムの分子生物学的解析は、新規予後の判定方法、新規治療法選択基準の設定、新規転移抑制剤の開発等、臨床上非常に有用であり、この SYK 遺伝子の

果たす役割は検討する必要がある。また口腔癌領域における SYK 遺伝子の果たす役割はいまだ明らかになっていない。

2. 研究の目的

口腔癌、正常組織、リンパ節転移組織を用いて以下の事項を明らかにする。

ヒト全遺伝子搭載 DNA チップを用いて、癌、正常組織、リンパ節転移組織における SYK をはじめとする、転移関連遺伝子における遺伝子の発現状態を網羅的に明らかにする。RT-PCR, Real-Time PCR により、半定量的、定量的にみつけた発現異常遺伝子を確認する。免疫染色によりこれらの遺伝子タンパクの局在と発現状態を明らかにする。これらの遺伝子の発現状態を正常、癌、リンパ節転移組織のそれぞれについて検討し、腫瘍マーカーとして用いることができるかどうかを検討する。PCR-SSCP, Direct sequencing による DNA の構造異常及び Methylation specific PCR による DNA のエピジェネティックな変化を解析し、発現異常の原因を明らかにする。検討された遺伝子の完全長 cDNA を発現ベクターに組み込み、遺伝子導入法を用いて口腔扁平上皮癌由来細胞株に導入し遺伝子の機能解析を行う。

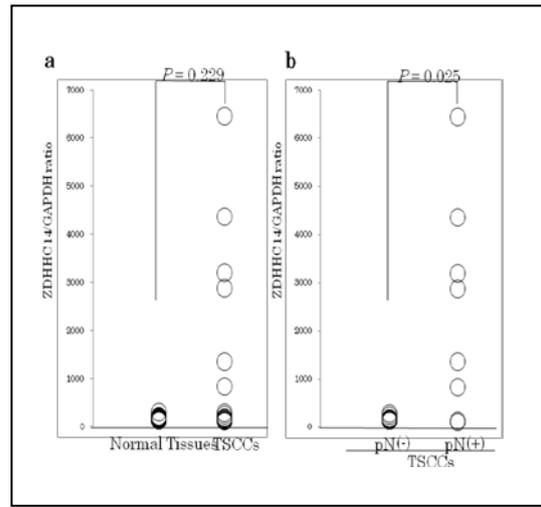
3. 研究の方法

各組織から mRNA とタンパクを抽出・精製する。微量サンプルや入り組んだ構造のサンプルについては凍結ミクロトームとレーザーマイクロダイセクション装置によってサンプルを切り出す。抽出・精製・増幅した各 mRNA に Cy3, Cy5 で色素標識し、ヒト全遺伝子が搭載された affymetrix 社製 GeneChip で mRNA の発現状態を解析する。特徴的な動向を示した遺伝子について、RT-PCR と real-time PCR により発現状態を確認する。それぞれ処理済 DNA チップをマイクロレイ読みとり解析スキャナーで標準化して読み取る。読み取ったデータをコンピューター上で解析し、発現異常(発現増強、発現減弱)が認められた遺伝子を選別する。PCR-SSCP, Direct sequencing による DNA の構造異常及び Methylation specific PCR による DNA のエピジェネティックな変化を解析し、発現異常の原因を明らかにする。検討された遺伝子の完全長 cDNA を発現ベクターに組み込み、遺伝子導入法を用いて口腔扁平上皮癌由来細胞株に導入し遺伝子の機能解析を行う。In vitro invasion assay, Wound healing assay による機能解析を行う。

4. 研究成果

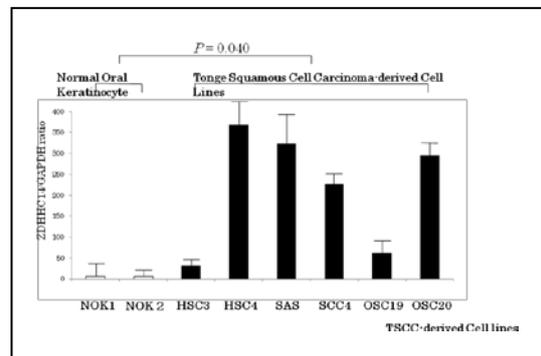
口腔組織、口腔扁平上皮癌組織、リンパ節転移組織の網羅的遺伝子発現解析により zinc finger DHHC-type containing 14 (ZDHHC14)、Spleen tyrosine kinase (SYK) 等をはじめとした75個の候補遺伝子をリストアップした。また、これまでに我々が解析してきたプロテオ

ミクス解析による口腔扁平上皮癌の網羅的タンパク質発現解析の結果とリンクさせ有力な遺伝子および遺伝子産物をリストアップした。各症例に共通して発現異常が認められる遺伝子は少なくとも口腔扁平上皮癌においては50遺伝子以上は存在する可能性が示唆された。ZDHHC14遺伝子はマイクロレイ解析にて病理組織学的にリンパ節転移を有する症例で高頻度に発現が亢進している遺伝子としてリストアップされた候補遺伝子である。臨床検体を用いてReal-Time PCRにより同遺伝子のmRNA発現量を定量した結果、高頻度な発現亢進が確認できた(8/20例40%)。

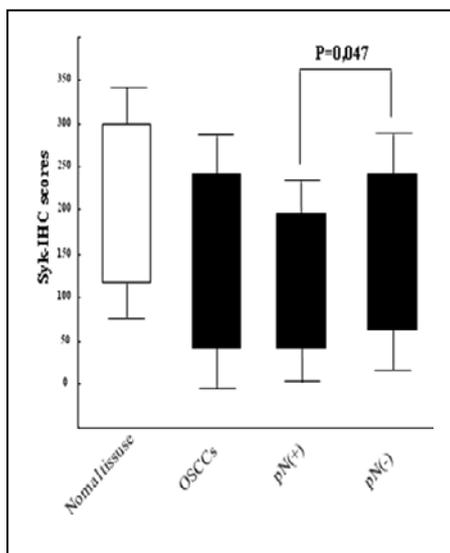
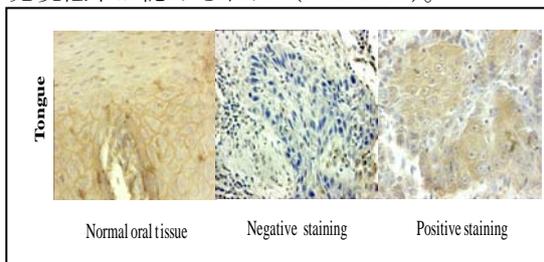


さらにmRNA発現亢進はpN(+)症例において有意に認められた(P=0.025)。

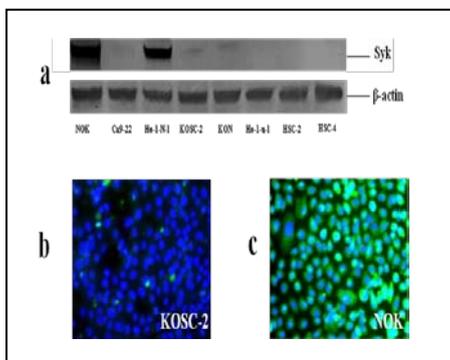
Case No.	Gender	Age	T	N	Stage	pN	Distant sites	Preop	Postop	Final	ZDHHC14 (up/down)
1	M	41	2	2b	4	-	well	well	well	alive	-
2	M	29	1	1	2	-	well	well	well	alive	+
3	M	63	1	0	1	-	well	well	well	alive	-
4	M	23	2	1	3	-	well	well	well	alive	+
5	F	60	4	2b	4	-	well	well	well	alive	+
6	F	62	2	0	2	-	well	well	well	alive	-
7	M	42	1	0	1	-	well	well	well	alive	-
8	M	68	1	1	2	-	well	poor	death	dead	-
9	M	26	2	2b	4	-	well	well	well	alive	+
10	M	28	1	0	1	-	poor	poor	meta	alive	-
11	M	23	2	2b	4	+	well	well	well	alive	+
12	M	47	2	2b	4	-	well	well	well	alive	+
13	M	22	1	0	1	-	well	well	well	alive	-
14	M	44	2	0	2	-	well	well	well	alive	-
15	F	24	2	2b	4	+	well	well	well	alive	+
16	F	28	1	0	1	-	well	well	well	alive	-
17	M	67	1	0	1	-	well	well	well	alive	-
18	F	62	1	0	1	-	well	well	well	alive	-
19	M	22	1	0	1	-	well	well	well	alive	-
20	M	27	2	2b	4	-	well	well	well	alive	+



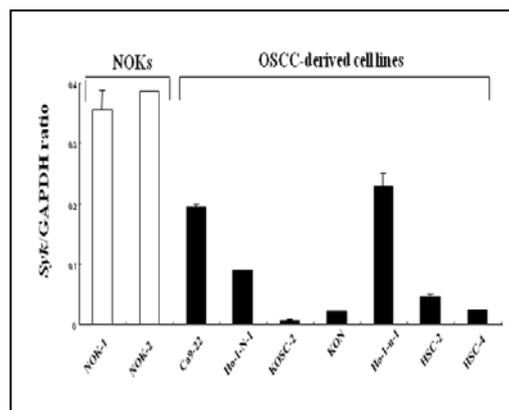
Syk遺伝子は病理組織学的にリンパ節転移を有する症例で、高頻度に発現が低下している遺伝子としてリストアップされた候補遺伝子である。臨床検体を用いた免疫組織化学染色法では、正常組織と比較して、53例中33例62%でSykの発現低下が認められた。また、リンパ節転移症例において統計学的に有意にSykの発現低下が認められた (P=0.0042)。



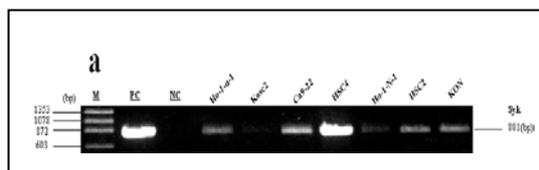
免疫蛍光染色法により正常細胞と比較して口腔扁平上皮癌由来細胞株すべてにおいてSykタンパク質の発現低下が認められた (7株中7株: 100%)。



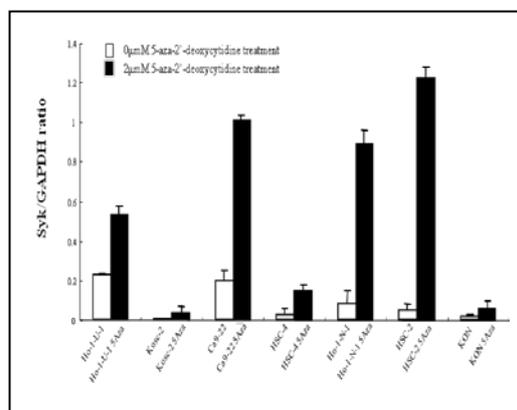
定量的Real-time PCR法によるmRNAの定量においても口腔扁平上皮癌由来細胞株においてSykの発現低下が認められた。



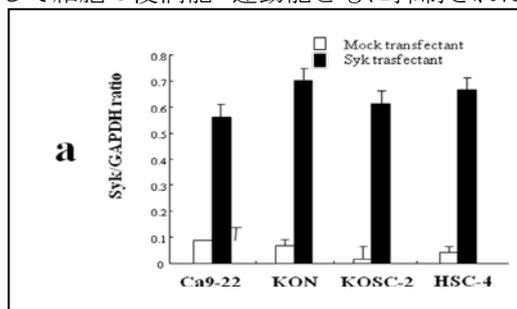
PCR-SSCP法によるDNA構造解析では、変異は検出されなかったが、Syk遺伝子5'側CpG island領域に高頻度なメチル化が検出された。

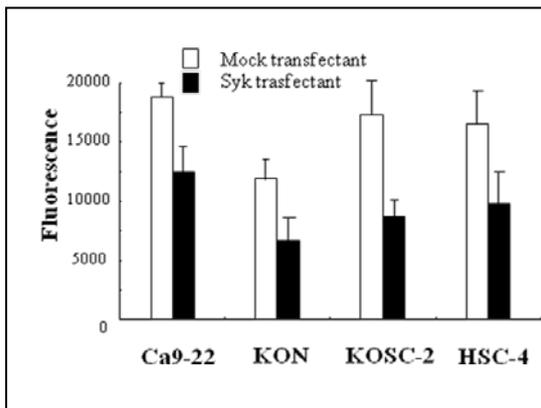
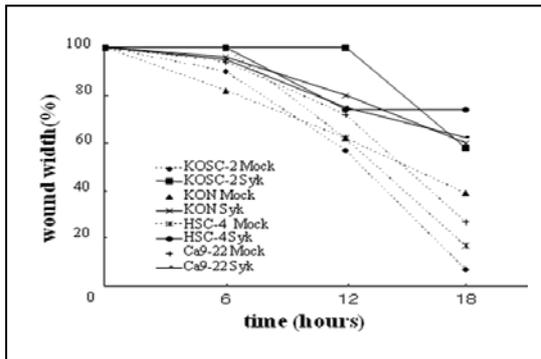
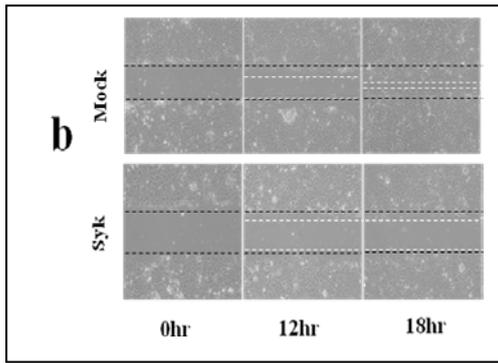


さらに脱メチル化剤によるdemethylation assayにおいても、これらの細胞株でSyk mRNAの発現が回復した。



Wound healing assayではSykを導入した癌細胞は、ベクターのみを導入した癌細胞と比較して細胞の浸潤能・運動能ともに抑制された。





これらの結果はSykの発現低下が口腔扁平上皮癌で高頻度な事象であること、またその発現の低下がエピジェネティックな制御による可能性が示唆された。さらにSykの発現低下と口腔扁平上皮癌の浸潤・転移能との関連が示唆された。

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 2 件)

- ① Ogane S, Onda T, Takano N, Yajima T, Uchiyama T, Shibahara T. Spleen tyrosine kinase as a novel candidate tumor suppressor gene for human Oral squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*. 2009 Jun 1;124(11):2651-7.
- ② Onda T, Yamamoto N, Kuroiwa T, Katakura A, Takano N, Shibahara T. Aberrant expression of the ZDHHC14 gene in squamous cell carcinoma of the human tongue. *Asian Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2010 Oct 22(4):187-192.

[学会発表] (計 3 件)

- ① 第15回European Society for Medical Oncology, 第34回European Cancer Organisation. 2009年9月22日. International Congress Centrum, ドイツ(ベルリン), Onda T, Aberrant expression of *ZDHHC14* gene in human tongue squamous cell Carcinoma.
- ② 第9回Asian Congress on Oral and Maxillofacial Surgery. 2010年11月26日. Kuala Lumpur Convention Centre マレーシア(クアラルンプール). Onda T, Over expression of zinc finger, DHHC-type containing 14 gene located on chromosome 6q25.3 in human tongue squamous cell carcinoma.
- ③ 第29回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会. 2011年1月27日. 崇城大学市民ホール(熊本市) 恩田健志. 口腔扁平上皮癌由来細胞株の2D-DIGE解析.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

恩田 健志 (ONDA TAKESHI)
東京歯科大学・歯学部・助教