

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592245

研究課題名（和文）唾液より検出される2類の新規口腔癌特異的腫瘍マーカーの機能解析

研究課題名（英文）functional analysis of novel two specific oral cancer marker detected from saliva

研究代表者

松浦 光洋（MATSUURA MITSUHIRO）

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：00297037

研究成果の概要（和文）：口腔癌の早期診断のためのバイオマーカーとして唾液による口腔癌診断の可能性を網羅的に解析した。その結果、口腔癌患者唾液中に特異的高発現を検出した cystatin SN と salivary acidic proline-rich phosphoprotein 3/4 は唾液新規腫瘍マーカーとなり得る可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：Salivary proteomic analysis was performed to obtain a reliable screening test for early diagnosis of oral squamous cell carcinoma and that the cystatin SN and salivary acidic proline-rich phosphoprotein 3/4 might be a promising tumor biomarker for oral squamous cell carcinoma.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：唾液

## 1. 研究開始当初の背景

口腔癌の治療成績は、病変を早期に発見して早期に適切な治療を施せば良好な治療成績が得られ、口腔の形態、機能低下を避けることができる。口腔内は直視できるので、早期発見が容易なはずであるが、炎症性口腔粘膜疾患や前癌病変との鑑別、または治療後に再発の適切な診断ができないと治療の遅れにつながり、予後不良となることがある。早期癌の適切な診断には、前癌病変あるいは早期の遺伝子異常の段階で病変をとらえる必要

がある。唾液による口腔癌診断に関しては以前より、いくらかの試みが行われてきたが、いずれも口腔癌に特異的な変化を唾液で検出できるのかといった検討であった。

我々は、癌患者の担癌状態（治療前）と非担癌と考えられる状態（治療後）の唾液をプロテインチップによって網羅的に解析し、新たな癌関連因子候補を見いだしてきた。そこで、本研究では唾液より検出された新規腫瘍マーカー候

補に関して、口腔癌における発現とその意味、さらに分子標的としての可能性について検討する。

## 2. 研究の目的

我々は癌患者の担癌状態（治療前）と非担癌と考えられる状態（治療後）の唾液をプロテインチップによって網羅的に解析し、検出された新たな癌関連因子候補が唾液新規腫瘍マーカーとなり得るかといった課題、また口腔癌病態の把握に新知見を得ることを目的としてきた。

## 3. 研究の方法

### cystatin SNとsalivary acidic proline-rich phosphoprotein 3/4の口腔癌の発生、進展における発現の意義の検討

- (1) cystatin SN と salivary acidic proline-rich phosphoprotein 3/4 のポリクローナル抗体を作成し、正常口腔粘膜、白板症、口腔癌患者切除標本を用いて免疫組織染色を行い、以下について検討する。
  - ① 候補蛋白質の発現部位、細胞内局在を検索する
  - ② 各腫瘍組織の病期分類や予後と候補タンパク質の発現を比較検討する。

口腔癌患者切除標本はUICC分類によるTNM分類を用いて病期分類を行い、各病期別のcystatin SNとsalivary acidic proline-rich phosphoprotein 3/4の発現を比較検討する。予後については5年生存率を参考にして分類し、cystatin SNとsalivary acidic proline-rich phosphoprotein 3/4の発現を比較検討する。
  - ③ 組織学的悪性度（分化度、浸潤様式）比較検討する。

口腔癌患者切除標本をUICC分類に従い、分化度を高、中、低、未分化の4つに分け、分化度別のcystatin SNとsalivary acidic proline-rich phosphoprotein 3/4の免疫組織染色の評価をする。

浸潤形式においては山本・小浜の分類に従い、1~4型に分類して、同様にcystatin SNとsalivary acidic proline-rich phosphoprotein 3/4の免疫組織染色の評価をする。
- (2) これらの結果より、正常口腔粘膜、白板症と口腔癌患者切除標本におけるcystatin SNとsalivary acidic

proline-rich

phosphoprotein 3/4 の免疫組織染色による発現を比較検討することで臨床的にcystatin SNとsalivary acidic proline-rich phosphoprotein 3/4の口腔癌の発生、進展における意義の検討をする。

- (3) 口腔扁平上皮癌細胞株におけるcystatin SNとsalivary acidic proline-rich phosphoprotein 3/4の発現
  - ① cystatin SNとsalivary acidic proline-rich phosphoprotein 3/4のポリクローナル抗体を使用したウェスタンブロット法を行うことにより口腔扁平上皮癌細胞株におけるタンパク発現を検討する。
  - ② 口腔扁平上皮癌細胞株の培養上清をELISA法によりcystatin SNとsalivary acidic proline-rich phosphoprotein 3/4を検出することにより、cystatin SNとsalivary acidic proline-rich phosphoprotein 3/4が癌細胞より分泌される物質かどうか検討する。

## 4. 研究成果

唾液サンプルにおける蛋白発現のピーク強度を比較し、Paired-U検定により有意差を示した結果、治療前より治療後に発現が減少する17種類の蛋白質と発現が増加する9種類の蛋白質が検出できた。また、マーカー候補の組み合わせによる階層的クラスタリング解析を実施したところ、いくつかの条件で担癌状態と非担癌状態を分けることが可能であった。ことより、有効な複数のマーカーを組み合わせることで、簡便な口腔領域の扁平上皮癌の診断アッセイシステムが確立できる可能性が示唆された。さらに新規腫瘍マーカー候補と考えられる担癌状態で発現の高いピークの蛋白を逆相HPLCにて精製し、PMFおよびMS/MS解析を行わない、PMF及びMS/MS解析の結果をもとに、データベース検索を行なった結果、腫瘍マーカー候補蛋白

が、Cystatin SN precursor (Salivary Cystatin SA-1)であることが極めて高いことがわかった。なお、精製標品の分子量(13930.8)はCystatin SN (14316.07)の分子量より小さいので、バイオマーカー候補はN末端からさらに3残基プロセシングされていると示唆された。同様に高発現ピークの解析から salivary acidic proline-rich phosphoprotein 3/4 が候補遺伝子として挙がってきた。In vitro での発現プロファイルをさらに確認するために、数種の口腔扁平上皮癌細胞株 HSC2, HSC3, HSC4, SAS を用いてウェスタンブロット法を施行したところ、SAS でその発現が最も高いことが確認された。現在までに同定された口腔癌関連遺伝子の発現プロファイルは多数の扁平上皮癌細胞株および実際の癌患者から採取された唾液および生検材料において in vitro、in vivo 両面から詳細な検索が行われた。同定された cystatin SA-I は N-terminal から3アミノ酸が消失した truncated型が高発現していること、salivary acidic proline-rich phosphoprotein 3/4 も同様に口腔扁平上皮癌細胞の一部にその発現が高く見られる事から、口腔癌早期発見の生物学的指標となる可能性を報告した。

#### 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5件)

1. Shintani S, Hamakawa K, Nakashiro K, Shiota T, Hatori M, Tanaka M, Kuroshita Y, Kurokawa Y Friend leukaemia insertion (Fli)-1 is a prediction marker candidate for radiotherapy resistant oral leukaemia insertion (Fli)-1 is a prediction marker candidate for radiotherapy resistant oral squamous cell carcinoma. International Journal of Oral Maxillofacial Surgery 査読有 39(11) 2010 1115-1119
2. Shintani S, Hamakawa H, Ueyama Y, Hatori M, Toyoshima T Identification of a truncated cystatin SA-1 as a saliva biomarker for oral squamous cell carcinoma using the SELDI ProteinChip platform International Journal of Oral Maxillofacial Surgery 査読有 39(1) 2010 439-443
3. Shintani S, Nakashiro K, Hamakawa H, Shiota T, Hatori M, Kawamoto Y, Sasaki A Genome-wide cDNA microarray screening to reveal gene-expression profiles correlated to chemosensitivity of oral squamous cell carcinoma cell lines 査読有 Asian Journal of Oral Maxillofacial Surgery 22 2010 7-11
4. Li C, Yazawa K, Kondo S, Mukudai Y, Sato D, Kurihara Y, Kamatani T, Shintani S The root bark of *Paeonia moutan* is a potential anticancer agent in human oral squamous cell carcinoma cells Anticancer research 査読有 32 2012 2625-2630
5. Sato D, Yazawa K, Kondo S, Mukudai Y, Li C, Kamatani T, Katsuta H, Yoshihama Y, Shiota T, Shintani S A potential anticancer activity of extracts derived from the roots of *Scutellaria baicalensis* on human oral squamous cell carcinoma cells Molecular and Clinical Oncology 査読有 1 2013 105-111 DOI: 10.3892/mco.2012.14

[学会発表] (計4件)

1. Shintani S, Hatori M, Toyoshima T, Kurihara Y, Kurokawa Y, Nakahira H, Ito T, Shiota T Saliva tumor markers for the identification of oral cancer European Association for Cranio-Maxillofacial Surgery 2008年11月9-12日 Bologna Italy
2. Yoshida S, Nagae G, Kaneda A, Tsuji S, Matsusaka K, Yagi K, Isagawa T, Tachikawa T, Shintani S, Aburatani H Epigenomic profiling of oral cancer 2012AACR 2012年04月05日~2012年04月05日 Chicago, Illinois, USA
3. Kurihara Y, Sato D, Shiota T, Kondo S, Kataoka M, Urata Y, Fujiwara T, Shintani S Telomerase-Specific Replication-Selective Virotherapy combined with radiation therapy for oral squamous cell carcinoma cells 2012AACR 2012年04月05日~2012年04月05日 Chicago, Illinois, USA

4. Sato D, Kurihara Y, Kondo S, Shiota T, Urata Y, Fujiwara T, Shintani S  
Telomerase-Specific  
Replication-Selective oncolytic  
viruses for adenoid cystic carcinoma  
cell lines 2012AACR 2012年04月05日～  
2012年04月05日 chicago, Illinois, USA

[その他]

ホームページ等

<http://www.omfs-showa.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松浦 光洋 (MATSUURA MITSUHIRO)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：00297037

(2) 研究分担者

新谷 悟 (SHINTANI SATORU)

昭和大学・歯学部・教授

研究者番号：80294429