

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 24年 6月 27日現在

機関番号：32650

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22792017

研究課題名（和文）

口腔癌のマッピングアレイを用いた全染色体上の構造異常と新規癌抑制遺伝子の解明

研究課題名（英文）

Analysis of structural abnormality of whole chromosomes and novel tumor suppressor gene using mapping arrays in oral cancer

研究代表者

山本 信治 (YAMAMOTO NOBUHARU)

東京歯科大学・歯学部・講師

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 を用いて口腔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口腔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】口腔扁平上皮癌症例 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 が口腔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。

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、これも海外論文で発表し大きな成果をあげた。

研究成果の概要（英文）：[Purpose] We analyzed genomic copy number abnormality on all genomes in the oral squamous cell carcinoma using Affymetrix GeneChip(R) Mapping 10K Array in this study and tried the identification of the new metastasis connection gene of the oral cavity squamous cell carcinoma. [Materials and Methods] We used 20 oral squamous cell carcinoma cases. We analyzed a metastasis to regional lymph node-positive case (pN(+))3 case and a negative case (pN(-))2 case by GeneChip(R) 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 oral squamous cell carcinoma-related gene. As for this study, information as we exceeded imagination with the conducted genomic analysis much more was obtained till now, and the results were given as a new search method surely and this gave a presentation by foreign countries thesis and gave large result.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：口腔がん、DNA マッピングアレイ、ヘテロ接合性消失 (LOH)

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。

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～数千の口腔癌に関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遥かに超えるほどの情報量が得られる。さらに、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 法により検証する。

この新探索法により、体内に潜む微小転移細胞や再発の早期発見に結びつけ、世界初の口腔癌の再発・転移関連遺伝子の同定を計ることを目的とする。

3. 研究の方法

【平成 22 年度】

- 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：得られた LOH とコピー数異常 (CNA) の結果と、臨床的・病理組織学的特性からフ

イッシャーの直接確率法を用いて、統計解析し再発・転移の予測の関係について検討を行う。

【平成 23 年度】

前年度に引き続き、多数の口腔癌患者組織、さらに非扁平上皮癌（腺系癌・悪性黒色腫など）を用いて、以下の研究を行う。

- 1) 実験進行中に新たに入手した試料についても随時 DNA を抽出する。
- 2) 口腔非扁平上皮癌についても全ゲノム上のマイクロサテライト領域を DNA マッピングアレイ解析を用いて行う。
- 3) 既知癌抑制遺伝子の異常との関連性を検討し、さらに予後や悪性度との比較も行う。
- 4) 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 法により検証する。

以上の結果をもとに、口腔扁平上皮癌の再発・転移過程に関与する一連の癌抑制遺伝子群の局在を同定することと、体内に潜む微小転移細胞や転移の発現パターンの相違の役割を考察する。

4. 研究成果

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)。

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 9 件)

- ① 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*, 査読有, 22: 187-192, 2010.
- ② Kuroiwa T., Yamamoto N., Onda T., Bessho H., Yakushiji T., Katakura A., Takano N., Shibahara T. Analysis of copy number abnormality

(CNA) and loss of heterozygosity (LOH) in the whole genome using single nucleotide polymorphism (SNP) genotyping arrays in tongue squamous cell carcinoma. *Journal of the Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, 査読有, 37: 550-555, 2011.

- ③ Yamamoto N., Okubo T., Sakuma T., Sugahara K., Yamamoto M., Muramatsu K., Watanabe A., Yakushiji T., Nomura T., Takano N., Shibahara T.

Clinical study of multiple primary and double cancers including oral squamous cell carcinoma. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology*, 査読有, (in press).

- ④ 別所央城、山本信治、作間 巧、橋本貞光、高野伸夫、柴原孝彦。

副咽頭間隙に進展した巨大な多形腺腫の 1 例. *日本口腔外科学会雑誌*, 査読有, 56: 313-317, 2010.

- ⑤ 薬師寺孝、菅原圭亮、池田千早、山本信治、柴原孝彦、笠原清弘。

抜歯を契機に発見した上顎智歯から上顎洞に生じた動静脈奇形の 1 例. *日本口腔外科学会雑誌*, 査読有, 56: 600-604, 2010.

- ⑥ 神尾 崇、坂本潤一郎、和光 衛、佐野 司、作間 巧、山本信治、柴原孝彦。

下顎骨に発生した脈瘤性骨嚢胞の画像所見. *歯科学報*, 査読有, 110: 472-477, 2010.

- ⑦ 菅原圭亮、高橋真言、河地 誉、池田千早、薬師寺孝、山本信治、野村武史、高野伸夫、柴原孝彦、片倉 朗。

市原市における行政主導の口腔がん検診. *老年歯科医学*, 査読有, 25: 340-346, 2010.

- ⑧ 山本信治、小林史明、高木 亮、江口 淳、橋本貞光、柴原孝彦。

ステノン管原発の耳下腺扁平上皮癌の 1 例. *日本口腔外科学会雑誌*, 査読有, 57: 274-278, 2011.

- ⑨ Sakuma, T., Yamamoto, N., Onda, T., Sugahara, K., Yamamoto, M., Muramatsu, K., Watanabe, A., Kamio, T., Sakamoto, J., Sano, T., Matsuzaka, K., Takano, N., Shibahara, T.

Aneurysmal bone cyst in mandible: Report of 2 cases and review of literature. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology*, 査読有, (in press).

[学会発表] (計 3 4 件)

1. 大久保剛、山本信治、菅原圭亮、池田千早、薬師寺孝、野村武史、高野伸夫、大森 泰、石井康裕、柴原孝彦
東京歯科大学千葉病院における口腔癌の多発癌・重複癌に関する臨床的検討

第 289 回東京歯科大学学会総会, 平成 22 年 5 月 9 日, 東京都

2. 柯 文昌、菅原圭亮、作間 巧、池田千早、薬師寺孝、山本信治、野村武史、高野伸夫、柴原孝彦

台湾における口腔扁平上皮癌患者の CRISP3 遺伝子解析

第 289 回東京歯科大学学会総会, 平成 22 年 5 月 9 日, 東京都

3. 岩本昌士、山本信治、松坂賢一、柴原孝彦

口底部に発生した舌神経由来神経鞘腫の 1 例

第 189 回日本口腔外科学会関東地方会, 平成 22 年 6 月 19 日, 栃木県

4. 作間 巧、山本信治、神尾 崇、坂本潤一郎、松坂賢一、佐野 司、柴原孝彦

下顎骨に生じた脈瘤性骨嚢胞と線維性骨異形成症が併発した 1 例

第 44 回日本口腔科学会関東地方部会, 平成 22 年 9 月 4 日, 浦安市

5. 山本信治、河地 誉、菅原圭亮、池田千早、薬師寺孝、野村武史、高野伸夫、柴原孝彦

口腔癌の多発癌・重複癌に関する臨床的検討

第 55 回日本口腔外科学会総会, 平成 22 年 10 月 16 日, 千葉市

6. 柯 文昌、河地 誉、菅原圭亮、作間 巧、池田千早、薬師寺孝、山本信治、高野伸夫、柴原孝彦

台湾における口腔がんの臨床統計

第 55 回日本口腔外科学会総会, 平成 22 年 10 月 16 日, 千葉市

7. 菅原圭亮、作間 巧、池田千早、大野啓介、河地 誉、薬師寺孝、山本信治、高野伸夫、柴原孝彦

口腔扁平上皮癌患者の CRISP3 遺伝子解析

第 55 回日本口腔外科学会総会, 平成 22 年 10 月 16 日, 千葉市

8. Kawachi, H., Sugahara, K., Ikeda, C., Yakushiji, T., Yamamoto, N., Nomura, T., Takano, N., Shibahara, T., Katakura, A.

Verification of gene polymorphism in oral squamous cell carcinoma

第 9 回アジア口腔顎顔面外科学会総会, 平成 22 年 10 月 26 日, クアラルンプール (マレーシア)

9. Onda, T., Yamamoto, N., Uchiyama, T., Takano, N., Shibahara, T.

Over expression of *zinc finger, DHHC-type containing 14* gene located on chromosome 6q25.3 in human tongue squamous cell carcinoma

第 9 回アジア口腔顎顔面外科学会総会, 平成 22 年 10 月 26 日, クアラルンプール (マレーシア)

10. 関根理予、薬師寺孝、菅原圭亮、池田千早、山本信治、野村武史、片倉 朗、高野伸夫、柴原孝彦

NBI システム搭載拡大内視鏡により発見した

早期浸潤扁平上皮癌の 5 例

第 29 回日本口腔腫瘍学会総会, 平成 23 年 1 月 27 日, 熊本市

11. 薬師寺孝、関根理予、菅原圭亮、別所央城、恩田健志、池田千早、山本信治、野村武史、高野伸夫、柴原孝彦、片倉 朗

口腔粘膜疾患における内視鏡的診断の試み

-NBI システム搭載拡大内視鏡による口腔粘膜の観察-

第 29 回日本口腔腫瘍学会総会, 平成 23 年 1 月 27 日, 熊本市 (優秀ポスター賞)

12. Nomura, T., Kawachi, H., Sugahara, K., Ikeda, C., Yakushiji, T., Yamamoto, N., Takano, N., Shibahara, T.

Oral squamous cell carcinoma and cultural risk in Japan

第 89 回 IADR 学会総会, 平成 23 年 3 月 17 日, サンディエゴ (アメリカ)

13. 大野啓介、菅原圭亮、河地 誉、関根理予、山本信治、片倉 朗、高野伸夫、柴原孝彦

Linear array genotyping kit を用いた口腔扁平上皮癌患者の HPV 検出

第 35 回日本頭頸部癌学会, 平成 23 年 6 月 9 日, 名古屋市

14. 菅原圭亮、作間 巧、大野啓介、河地 誉、薬師寺孝、山本信治、野村武史、高野伸夫、柴原孝彦

口腔扁平上皮癌における CRISP3 遺伝子解析

第 35 回日本頭頸部癌学会, 平成 23 年 6 月 10 日, 名古屋市

15. 加藤 宏、薬師寺孝、関根理予、渡部幸央、菅原圭亮、山本信治、野村武史、高野伸夫、柴原孝彦

拡大内視鏡観察結果から生検を行い確定診断が得られた早期舌癌の 3 例

第 191 回日本口腔外科学会関東地方会, 平成 23 年 7 月 9 日, 横浜市

16. 山本信治、逢坂竜太、菅原圭亮、薬師寺孝、野村武史、山内智博、高野伸夫、柴原孝彦、村松 敬

T1, T2 舌扁平上皮癌における浸潤様式に関する臨床的検討

第 21 回日本口腔粘膜学会総会, 平成 23 年 9 月 24 日, 鹿児島市

17. 関根理予、薬師寺孝、菅原圭亮、池田千早、山本信治、野村武史、高野伸夫、柴原孝彦、片倉 朗、田中陽一

健常粘膜から上皮内癌における血管形態の 3 次元構築画像による検討

第 21 回日本口腔粘膜学会総会, 平成 23 年 9 月 24 日, 鹿児島市

18. 薬師寺孝、関根理予、菅原圭亮、野村武史、山本信治、高野伸夫、柴原孝彦

NBI 搭載拡大内視鏡による口腔粘膜の観察-正常粘膜所見-

第 21 回日本口腔粘膜学会総会, 平成 23 年

9月24日、鹿児島市（優秀ポスター賞）
19. 藤本侑子、太尾英子、折戸 聡、中田江利加、井本大智、村松恭太郎、恩田健志、山本信治、野村武史、山内智博、須賀賢一郎、中野洋子、大畠 仁、高木多加志、内山健志、高野伸夫、柴原孝彦
東京歯科大学千葉病院口腔外科当直業務における過去5年間の患者の臨床統計
第292回東京歯科大学学会総会、平成23年10月15日、千葉市
20. 中田江利加、折戸 聡、藤本侑子、太尾英子、川上真奈、恩田健志、山本信治、野村武史、山内智博、須賀賢一郎、中野洋子、大畠 仁、高木多加志、内山健志、高野伸夫、柴原孝彦
東京歯科大学千葉病院口腔外科における平成22年度初診患者の臨床統計
第292回東京歯科大学学会総会、平成23年10月15日、千葉市
21. 山本信治、逢坂竜太、菅原圭亮、薬師寺孝、野村武史、山内智博、高野伸夫、柴原孝彦、村松 敬
T1, T2 舌扁平上皮癌におけるYK分類4C, 4D型に関する臨床的検討
第56回日本口腔外科学会総会、平成23年10月22日、大阪市
22. 野村武史、渡部幸央、関根理予、恩田健志、薬師寺孝、山本信治、高野伸夫、柴原孝彦
蛍光光学機器を用いた悪性・前癌病変におけるSurgical marginの設定
第56回日本口腔外科学会総会、平成23年10月22日、大阪市
23. 吉田秀児、山本信治、山内智博、田中順一、高野伸夫、柴原孝彦
角化嚢胞性歯源性腫瘍に由来する原発性下顎骨扁平上皮癌の1例
第56回日本口腔外科学会総会、平成23年10月22日、大阪市
24. 恩田健志、作間 巧、薬師寺孝、山本信治、野村武史、高野伸夫、柴原孝彦
口腔扁平上皮癌の分泌タンパク質解析
第56回日本口腔外科学会総会、平成23年10月22日、大阪市（優秀ポスター賞）
25. 菅原圭亮、大野啓介、薬師寺孝、山本信治、野村武史、高野伸夫、柴原孝彦、片倉 朗
地域歯科医師会と共同で行ってきた口腔がん検診-千葉市での20年間の実績と将来展望-
第56回日本口腔外科学会総会、平成23年10月22日、大阪市
26. 渡部幸央、関根理予、菅原圭亮、恩田健志、薬師寺孝、山本信治、野村武史、高野伸夫、柴原孝彦
Low-grade dysplasiaを伴う口腔白板症の臨床統計的検討
第56回日本口腔外科学会総会、平成23年

10月22日、大阪市
27. Onda, T., Sakuma, T., Bessho, H., Yakushiji, T., Yamamoto, N., Nomura, T., Takano, N., Shibahara, T.
Proteomics based identification of differentially expressed proteins in human oral squamous cell carcinoma
第89回国際口腔外科学会、平成23年10月26日、サンディエゴ（チリ）
28. 作間 巧、恩田健志、山本信治、神尾 崇、坂本潤一郎、内山健志、高野伸夫、柴原孝彦
下顎骨に発生した脈管性骨嚢胞の2例
第192回日本口腔外科学会関東地方会、平成23年12月10日、東京都
29. 山本信治、逢坂竜太、菅原圭亮、薬師寺孝、野村武史、山内智博、高野伸夫、柴原孝彦、松坂賢一
舌扁平上皮癌における浸潤様式に関する臨床的検討-第1報：YK分類について-
第30回日本口腔腫瘍学会総会、平成24年1月26日、大宮市
30. 逢坂竜太、山本信治、菅原圭亮、薬師寺孝、野村武史、山内智博、高野伸夫、柴原孝彦、松坂賢一
舌扁平上皮癌における浸潤様式に関する臨床的検討-第2報：YK分類の予後不良症例について-
第30回日本口腔腫瘍学会総会、平成24年1月26日、大宮市
31. 恩田健志、渡部幸央、作間 巧、薬師寺孝、山本信治、野村武史、高野伸夫、柴原孝彦
口腔扁平上皮癌の診断用分子マーカーの探索
第30回日本口腔腫瘍学会総会、平成24年1月26日、大宮市
32. 渡部幸央、野村武史、関根理予、菅原圭亮、恩田健志、薬師寺孝、山本信治、高野伸夫、柴原孝彦
Low-grade dysplasiaを伴う口腔白板症の臨床統計的検討
第30回日本口腔腫瘍学会総会、平成24年1月26日、大宮市（優秀ポスター賞）
33. 関根理予、薬師寺孝、渡部幸央、菅原圭亮、池田千早、山本信治、野村武史、高野伸夫、柴原孝彦、片倉 朗、田中陽一
健常粘膜から上皮内癌における血管形態の3次元構築画像による検討
第30回日本口腔腫瘍学会総会、平成24年1月26日、大宮市（優秀ポスター賞）
34. 逢坂竜太、折戸 聡、川上真奈、恩田健志、山本信治、野村武史、山内智博、須賀賢一郎、中野洋子、高木多加志、内山健志、高野伸夫、柴原孝彦
東京歯科大学千葉病院口腔外科における平成21年度および22年度の初診患者・全身麻酔施行患者の臨床統計

第 21 回日本有病者歯科医療学会総会，平成 24 年 3 月 17 日，宇都宮市

〔図書〕（計 0 件）

該当なし。

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

該当なし。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 信治 (YAMAMOTO NOBUHARU)

研究者番号：60385185

(2) 研究分担者

該当なし。 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

該当なし。 ()

研究者番号：