

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592956

研究課題名(和文)CEA遺伝子familyの癌と周囲組織における発現と相互作用の検討

研究課題名(英文)Study on the expression status of CEA gene family in cancer and surrounding normal tissue and on the interaction between cancer and normal mesenchymal cells.

研究代表者

小池 博文(KOIKE, HIROFUMI)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10595995

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円、(間接経費) 1,140,000円

研究成果の概要(和文)：CEA遺伝子familyのうちCEACAM1が口腔扁平上皮癌(OSCC)細胞株で特異的に発現低下しており、臨床検体では正常組織と比べ癌部で減弱し、発現強度と腫瘍径、進展度の間に逆相関関係があった。OSCC細胞株を用いCEACAM1強制発現株を作製したところ増殖能、浸潤能の低下を認めた。CEACAM1強制発現OSCC細胞株と共培養した正常線維芽細胞ではCEACAM1発現上昇を認めた。またWnt経路遺伝子群も発現低下していた。CEACAM1は外分泌因子であり、臨床検体の発現状況を考慮すると周囲正常組織がCEACAM1を分泌し腫瘍の増殖抑制に働く可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Of the CEA family genes, CEACAM1 was the most depressed expression in the oral squamous cell carcinoma (OSCC)-derived cell lines. CEACAM1 expression in clinical samples detected strong signal in normal epithelium and very weak signal in tumor. There is a significant inverse correlation between signal intensity and tumor size/stage. Expression vector including cDNA of CEACAM1 was constructed and two OSCC derived cell lines were transformed by the vector, and transformant indicated CEACAM1 suppresses the growth and invasion of the tumor. Then, co-culture of the transformant and normal fibroblasts was performed, resulting in the increased expression of CEACAM1 in fibroblasts. The decreased expression of the representative genes, CCND1, CDNK1, MYC, of the Wnt signaling pathway was observed in the co-cultured fibroblasts. Suppressing possibility was suggested tumor growth might be suppressed by CEACAM1 expressed from the surrounding normal tissue cells.

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：CEA遺伝子ファミリー 口腔癌 遺伝子発現ベクター

1. 研究開始当初の背景

免疫、脈管形成、アポトーシス、腫瘍抑制、転移に関与すると言われ、細胞接着タンパクとしても機能している CEA 遺伝子ファミリーに関して、培養細胞株、臨床サンプル（癌原発巣、周囲組織）を用いて発現状態を調べると共に、実験的に培養癌細胞と培養線維芽細胞において発現ベクターを用いた遺伝子強制発現を行い、それぞれの細胞の変化を調べると共に共培養による相互作用を調べる。さらに、invasion assay と wound healing assay により浸潤能の変化やマウスにおける転移能の変化を調べ、実際の口腔癌治療へのターゲット遺伝子になる可能性を検討する。

2. 研究の目的

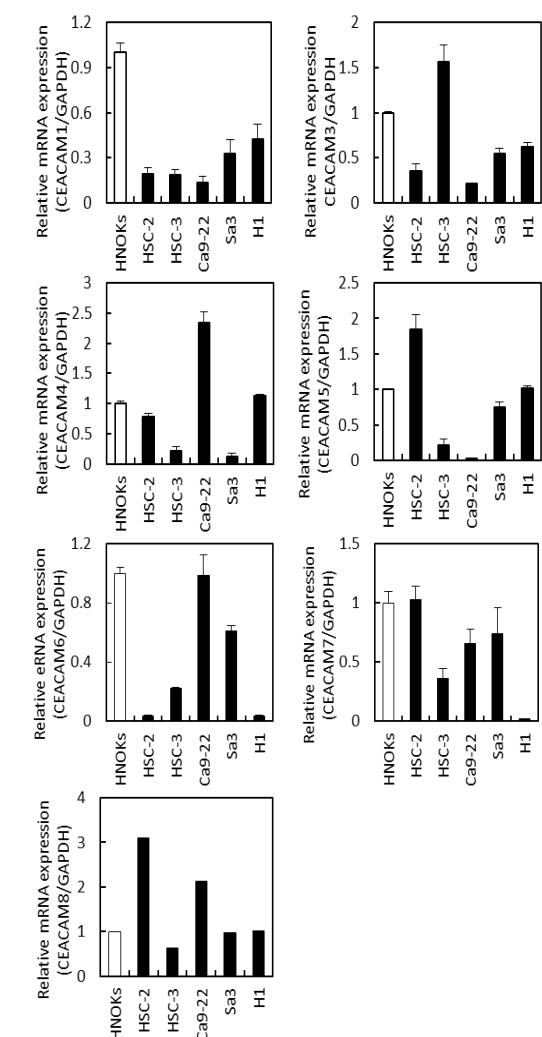
本研究では、単一の遺伝子を云々するものではなく、CEA 遺伝子ファミリーとして多数の遺伝子の動向を総合的に口腔癌で明らかにし、さらに、周囲組織との相互作用や関連性を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

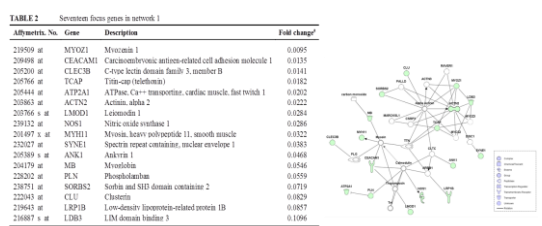
- (1) CEA family 遺伝子の発現状態を、マイクロアレイ解析で明らかにする。
- (2) 臨床サンプルでの CEA family 遺伝子の発現状態を Real-time PCR と免疫染色で明らかにする。
- (3) パスウェイ解析により形成ネットワークを同定し、増殖、細胞周期、アポトーシス、細胞運動性などに関する遺伝子との相互作用を検討する。
- (4) CEA family 遺伝子発現ベクターの導入実験により、細胞の形質変化を明らかにする。
- (5) 形質転換細胞を共培養し、増殖、浸潤、転移などの能力の変化を明らかにする。
- (6) 形質転換細胞と正常線維細胞を共培養し、増殖、浸潤、転移などの能力の変化を調べる。
- (7) 共培養による invasion assay により、浸潤、転移などの能力の変化を明らかにする。

4. 研究成果

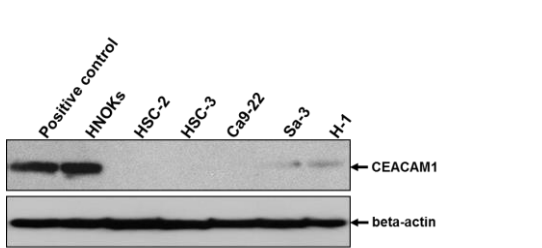
まず、正常口腔扁平上皮由来初代培養細胞株 (HNOKs) と口腔扁平上皮癌由来細胞株を用いて Affymetrix 社製 GeneChip によるマイクロアレイ解析を行った。結果、CEA 遺伝子ファミリーのうち CEACAM1, CEACAM3, CEACAM4, CEACAM5, CEACAM6, CEACAM7, CEACAM8 が、比較的多くの口腔扁平上皮癌由来細胞株において発現が减弱していることが分かった。さらに、上記 CEA 遺伝子ファミリーのプライマーを作成し、口腔扁平上皮癌由来細胞株 5 種類 (HSC-2, HSC-3, HSC-4, Ca9-22, Sa3, H1) について RT-PCR を行い、mRNA 発現解析を行ったところ、CEACAM1 遺伝子のみ全ての口腔扁平上皮癌由来細胞株において HNOKs と比べて明らかな発現减弱を認めた。



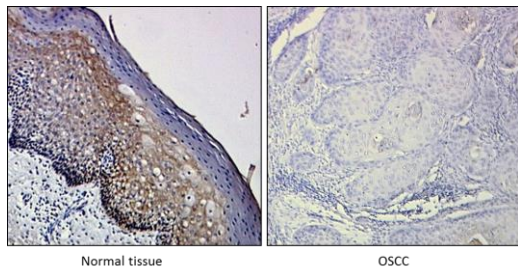
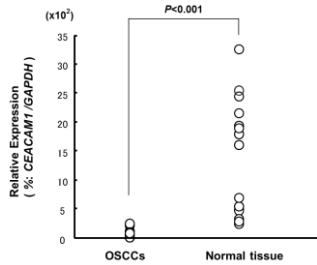
さらに、それらのデータでパスウェイ解析を行い、下記の図と表に示す 17 遺伝子と関連性が深いことが示唆された。



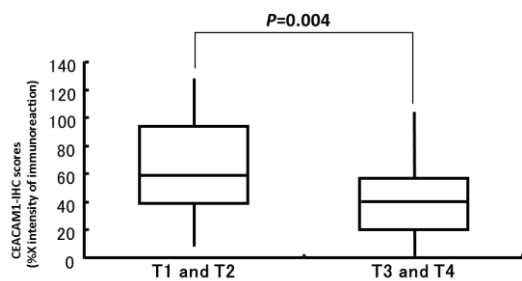
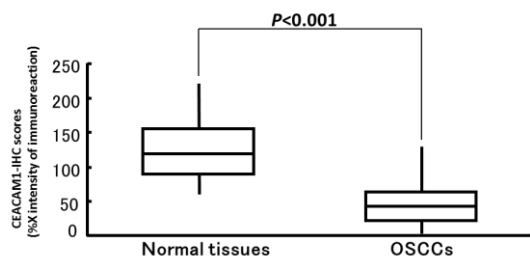
また、CEACAM1 遺伝子のタンパク発現状態についても確認した。その結果、全ての口腔扁平上皮癌細胞株において HNOKs と比べて発現低下を認めた。



さらに口腔扁平上皮癌患者の臨床検体を使用し、癌部および健常部の mRNA を RT-PCR、タンパクを免疫化学染色法にて検証した。結果、CEACAM1 は正常組織と比較して腫瘍において著明な発現減弱していることを認めた。



さらに、臨床指標と CEACAM1 遺伝子の発現状態の相関を調べたところ、腫瘍径において有意な相関を認めた。

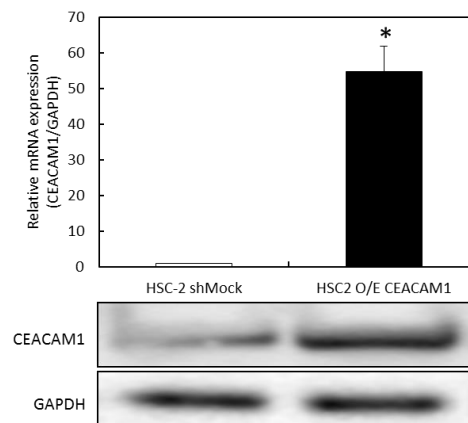


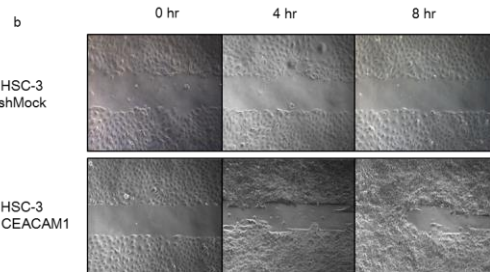
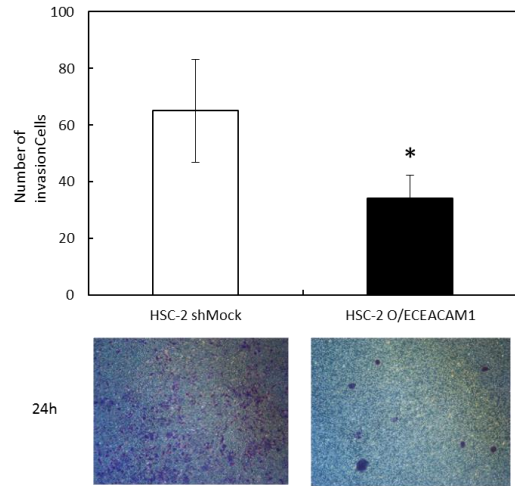
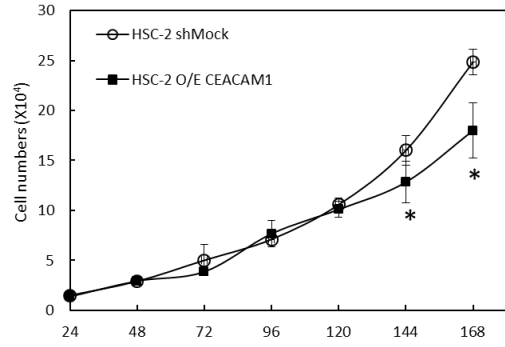
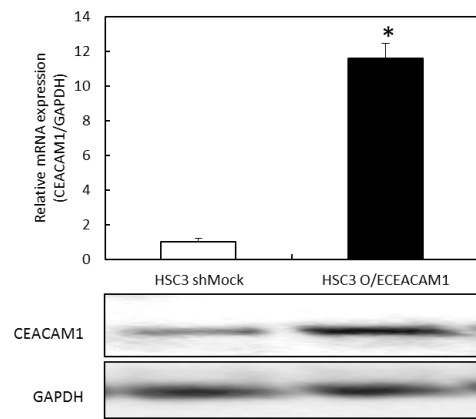
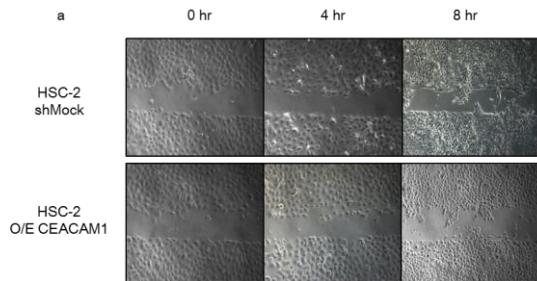
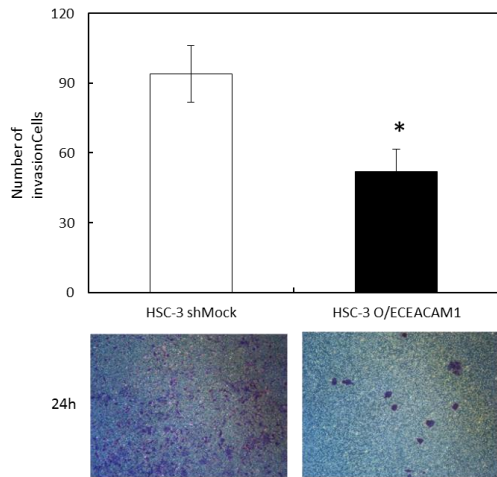
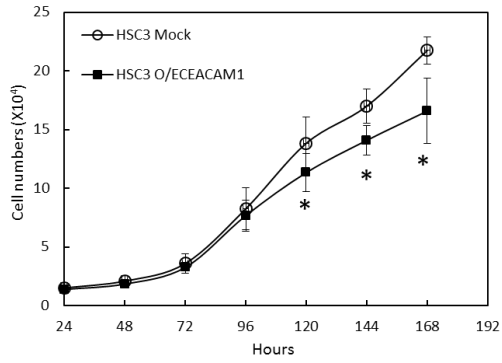
Correlation between CEACAM1 expression and clinical classification in OSCCs

Clinical classification	Total	Results of immunostaining: No. patients (%)		P value ^a
		CEACAM1 (-)	CEACAM1 (+)	
Age at surgery (years)				
<60	33	25 (76)	8 (24)	0.16659
≥60, <70	24	15 (63)	9 (37)	
≥70	21	12 (57)	9 (43)	
Gender				
Male	52	33 (63)	19 (37)	0.39576
Female	26	19 (73)	7 (27)	
T-primary tumor				
T1	6	4 (67)	2 (33)	0.02251
T2	32	16 (50)	16 (50)	
T3	18	14 (78)	4 (22)	
T4	22	18 (82)	4 (18)	
T1+T2	38	20 (53)	18 (47)	0.00974
T3+T4	40	32 (80)	8 (20)	
N-regional lymph node				
N(-)	50	34 (68)	16 (32)	0.73852
N(+)	28	18 (64)	10 (36)	
Stage				
I	4	3 (75)	1 (25)	0.03678
II	14	5 (36)	9 (64)	
III	16	10 (62)	6 (38)	
IV	44	34 (77)	10 (23)	
I + II	18	8 (44)	10 (56)	0.02258
III + IV	60	44 (73)	16 (27)	
Histopathologic type				
Well differentiated	45	28 (62)	17 (28)	0.47431
Moderately	28	21 (75)	7 (25)	
Poorly differentiated	5	3 (60)	2 (40)	
Tumor site				
Tongue	38	27 (71)	11 (29)	0.42663
Gingiva	24	14 (58)	10 (42)	
Oral floor	8	5 (62)	3 (38)	
Buccal mucosa	8	6 (75)	2 (25)	

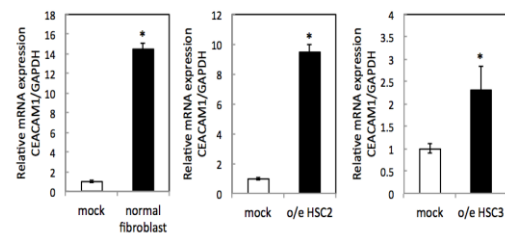
^aP<0.05 was considered significant.

次に CEACAM1 遺伝子発現ベクターを構築し、その発現ベクターを、CEACAM1 の発現が減弱していた口腔扁平上皮癌由来細胞株である HSC-2、HSC-3 に導入し、CEACAM1 遺伝子の強制発現細胞株を作製した。作製した形質転換細胞に関し、proliferation assay, invasion assay を行ったところ、CEACAM1 強制発現細胞株はコントロール細胞と比較して明らかな増殖能および浸潤能の低下を認めた。



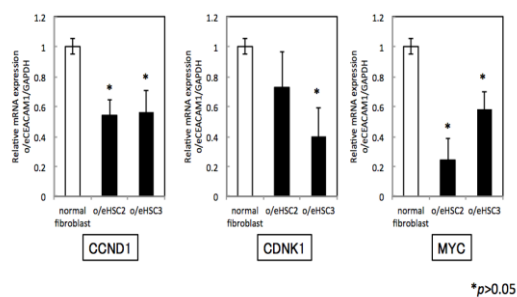


次に、CEACAM1 遺伝子発現ベクターを用いて強制発現させた HSC-2、HSC-3 細胞を使用し、アテロコラーゲン膜にて正常線維芽細胞と共培養を行ったところ、CEACAM1 強制発現細胞株と共培養させた正常線維芽細胞はコントロール細胞と比較して CEACAM1 の明らかな発現増強を認めた。



*p>0.05

次にアテロコラーゲン膜にて共培養を行った正常線維芽細胞の発現を調べたところ、CEACAM1 強制発現細胞株と共培養させた線維芽細胞では Wnt 経路と深く関与する遺伝子の発現低下が確認できた。



CEACAM1 が Wnt 経路を阻害することで癌に対して抑制的に働く可能性が示唆された。

以上の結果から癌細胞では CEACAM1 遺伝子の発現が減弱しており、細胞増殖能と浸に発現変化が生じた癌細胞が周囲正常細胞に対して作用して、周囲正常細胞は癌細胞に対して抑制的に作用していることが示唆された。

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)

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]
 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小池 博文 (KOIKE HIROFUMI)
 千葉大学・医学部附属病院・助教
 研究者番号：10595995

(2) 研究分担者

鶴沢 一弘 (UZAWA KATSUHIRO)
 千葉大学・大学院医学研究院・准教授
 研究者番号：30302558

坂本 洋右 (SAKAMOTO YOUSUKE)
 千葉大学・医学部附属病院・講師
 研究者番号：50451745

(3) 連携研究者

()

研究者番号：