

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 10日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23792321

研究課題名（和文） 11q13.3領域遺伝子増幅と口腔がんストレス応答骨破壊機構

研究課題名（英文） The 11q13.3 amplicon and mechanisms of bone invasion in oral cancer

研究代表者

森田 圭一（MORITA KEIICHI）

東京医科歯科大学・硬組織疾患ゲノムセンター・特任講師

研究者番号：10396971

研究成果の概要（和文）：

FADDを中心とした11q13.3領域遺伝子の機能解析を、口腔がん由来培養細胞における遺伝子組み換え変異型分子強制発現系を用いてがん発生機序を明らかにし、また、網羅的にゲノム構造異常を解析することにより、FADDのみならず11q13.3領域遺伝子の中で新たに重要であると予測される遺伝子についても検討することを目的とした。

【11q13.3領域遺伝子の強制発現系における生と死への影響】

11q13.3領域遺伝子の一つであるFADDの全長cDNAをクローニングし、発現ベクターにサブクローニングを行った。しかし、このベクターでのタンパク発現が非常に弱く、ウエスタンブロットで確認できない程度であったため、あらたにアデノウイルスベクターを導入し、サブクローニングを再度行った。現在、ウイルスベクターへのサブクローニングは終了し、発現の確認まで行っている。

【マイクロアレイデータを用いた11q13.3領域遺伝子解析】口腔がん切除標本のホルマリン固定パラフィン包埋ブロックからDNAを抽出し、CGHマイクロアレイ解析を実施し、11q13.3領域の増幅を確認している。CGHマイクロアレイ解析の症例を増やすことで、11q13.3領域中の詳細な増幅範囲が絞り込まれ、11q13.3領域中でがんの発生、性質に関与する遺伝子候補が示された。

研究成果の概要（英文）：

With the functional analysis of 11q13.3 domain gene centered around FADD, by clarifying the cancer outbreak mechanism using genetically modified mutational molecular forced expression system in the cultured cell derived from oral cancer and also by a comprehensive analysis of the genome structure abnormality the aim was to examine also the gene which was predicted to be of new importance in not only the FADD but in the 11q13.3 domain gene.

【The influence on the life and death of the forced expression system in the 11q13.3 domain gene】

We cloned the full length cDNA of FADD which is one of the 11q13.3 domain gene and sub cloned it to the expression vector. However the protein expression in these vectors was very weak that it could not be confirmed by western blotting so we introduced an adenovirus and carried out sub cloning again. At present the sub cloning to the virus vector has ceased and we are up to confirming the expression.

【Gene analysis of 11q13.3 domain using the microarray data】

We are confirming the amplification of the 11q13.3 domain by extracting DNA from a formalin fixation paraffin embedded block of the oral cancer excision specimen and carried out a CGH microarray analysis. By increasing the case of CGH microarray analysis the detailed amplification range within the 11q13.3 domain is narrowed down and the

occurrence of cancer and the gene candidate which participated in the property in the 11q13.3 domain was identified.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：外科系歯学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：口腔がん 骨破壊 ゲノム増幅 ストレス応答 11番染色体

1. 研究開始当初の背景

口腔がんの特徴の一つは、骨浸潤による顎骨の破壊により咀嚼、嚥下、発音といった重篤な顎口腔機能の喪失を伴うことである。従って、“Quality of life”の観点から、この骨破壊の分子機構を解明することは、口腔がん克服のために必要不可欠な課題である。

これまでの研究の結果、臨床的に歯肉がんの顎骨浸潤には比較的骨破壊が緩徐で辺縁が平滑な「圧迫型」と、激しい骨破壊像を呈する「虫食い型」の2つのタイプが存在しており、「虫食い型」の浸潤像を示す場合の方がリンパ節転移を伴い、予後不良となるケースが多いことが知られている。しかし、この「圧迫型」と「虫食い型」の違いが、がん細胞そのものが持つ性質に由来するものであるのか、または受け手である生体側、つまり顎骨側の性質に由来するものであるのかは、明らかにされてこなかった。しかし、現在までにわれわれは、マウス頭蓋骨浸潤モデルを作成し、骨膜の物理的破壊が骨浸潤に必要であることを見いだした (Tachasuttirut K, et al.: Effect of irradiation on malignant tumor invasion into bone. *Asian J Oral Maxillofac Surg.* 20:117-123, 2008.)。さらに、放射線照射で骨膜に炎症反応を引き起こすことによって、骨膜の物理的破壊と同様に骨浸潤がおこることが示された。われわれは、口腔がん顎骨浸潤における骨破壊分子メカニズムの解明をすすめてきた結果、癌細胞ではなく間質細胞が生産する炎症性サイトカイン IL-6 によって骨浸潤が引き起こされることを明らかにしてきた (Kayamori K, et al.: Roles of IL-6 and PTHrP in osteoclast formation associated with oral cancers: The significance of IL-6 synthesized by stromal cells in response to cancer cells. *Am J Pathol.* 2010)。これらの研究成果から、骨浸潤が起こる場においては、炎症性ストレス応答シグナル伝達が深く関与していることが推測される。

さらに、われわれは口腔がんの網羅的遺伝

子解析(Tomioka H, Morita K, et al. *J Oral Pathol Med* 35(4):206-211, 2006.)を通じて、11q13.3領域に座位する分子 FADD に着目し、口腔がんにおけるゲノム増幅、タンパク発現亢進を明らかにし、さらにはリンパ節転移との関連についても明らかにした (Prapinjumrune C, Morita K, et al.: DNA amplification and expression of FADD in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2010.)。その過程で、11q13.3領域には他にも複数の遺伝子が座位していること、切除標本上 FADD ゲノムの増幅とタンパクの高発現が必ずしも一致しないこと、FADD は本来アポトーシスシグナルを促進する分子でありながら、がんを高発現していること、などの事実から、FADD 分子の細胞内での反アポトーシス作用発現機構について詳細な解析が必要であると考えられる。現在までにいくつかのグループから FADD のリン酸化と核内移行がサバイバルシグナルに関与しているとの報告があるが、FADD の過剰発現での細胞増殖、あるいはノックダウンによる細胞死といった、直接的な証拠を明らかにした報告はない。

2. 研究の目的

本研究においては、FADD を中心とした 11q13.3 領域遺伝子の機能解析を、口腔がん由来培養細胞における遺伝子組み換え変異型分子強制発現系を用いてシグナル伝達経路を明らかにし、FADD のみならず 11q13.3 領域遺伝子の中で新たに重要であると予測される遺伝子についても口腔がん切除標本におけるマイクロアレイ解析を行うことによって明らかにすることを目的とする。結果として、口腔がんにおける骨浸潤およびリンパ節転移の予測、さらには、放射線・化学療法感受性予測につながれば、最終的には口腔がんに対して適切な加療が可能となり、がん患者の QOL の向上が期待できる。

3. 研究の方法

【11q13.3 領域遺伝子の強制発現系における生と死への影響】

11q13.3 領域遺伝子としては、CPT1A, MRPL21, IGHMBP2, MRGPRD, MRGPRF, TPCN2, MYEOV, LOC390218, LOC399919, CCND1, FLJ42258, ORAOV1, FGF19, FGF4, FGF3, LOC399920, TMEM16A, FADD, PPF1A1, CTTN, SHANK2 の遺伝子が座位している。そこで最初に我々が着目している FADD の遺伝子の全長 cDNA をクローニングし、培養細胞における強制発現系を用いて増殖、あるいは細胞死への関与、さらには MAP キナーゼ経路、特に ERK、p38、JNK についてリン酸化抗体を用いて検討する。この際、これまでの研究

(Prapinjumrune C, Morita K, et al., 2010.) ですでに 11q13.3 領域の増幅がないことが判明している細胞 SKN3, ZA などを用いることによって、より生理的な遺伝子増幅の影響を検討できる。

【マイクロアレイデータを用いた 11q13.3 領域遺伝子解析】 口腔がん切除標本のホルマリン固定パラフィン包埋ブロックから DNA を抽出し、アジレント社 SurePrint G3 Human CGH 8X60K を用いてゲノムコピー数異常の頻度、程度、S/N 比などを検討する。その際、断片化あるいはホルマリン架橋が存在しているとされる FFPE 組織から抽出した DNA を用いた場合の最適な DNA 抽出法、増幅法、蛍光色素標識法を検討する。最適条件決定後、口腔がんの切除、生検あるいはリンパ節転移の FFPE 組織から DNA を抽出して CGH アレイ解析を行う。これまでの研究でリンパ節転移を生じさせる原発巣の遺伝子発現プロファイルと顎骨浸潤で虫食い様骨浸潤を示すタイプの歯肉がんの遺伝子発現プロファイルが相似している知見が得られているため、リンパ節転移を生じた舌がんなどの口腔がんも対象とする。また、化学療法や放射線療法などの補助療法の奏効性や予後などの臨床データと比較し、がんの悪性度や予後を予測する遺伝子を抽出する。

4. 研究成果

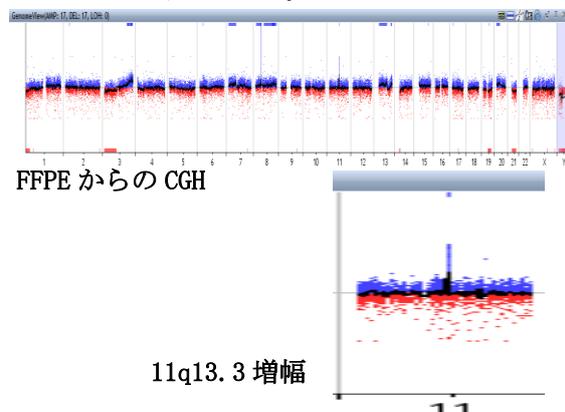
【11q13.3 領域遺伝子の強制発現系における生と死への影響】

11q13.3 領域遺伝子の一つである FADD の全長 cDNA をクローニングし、発現ベクターにサブクローニングを行った。しかし、このベクターでのタンパク発現が非常に弱く、ウエスタンブロットで確認できない程度であったため、あらたにアデノウイルスベクターを導入し、サブクローニングを再度行った。FADD の遺伝子自体が PCR による増幅がしがた

い GC リッチな領域を含むようで、PCR 反応の際には DMSO を加えないと PCR 増幅が行えないことが判明した。この際、タグとして flag を 5 末端に付加し、さらに FADD のリン酸化部位や核移行シグナルなどに変異を加えた変異体も作製し、同時にウイルスベクターへの導入を行っている。完成したウイルスベクターは 293 細胞にトランスフェクションし、組み換えが生じたウイルスを細胞から抽出した。得られたウイルス液は再度 293 細胞に感染させて、より高力価のウイルスを作製した。この操作を繰り返し、4 次ウイルスにおいて 3×10^8 PFU/ml 程度のウイルスが作製された。これを口腔がん細胞株に感染させ、ウエスタンブロットにより目的タンパクの発現確認まで行っている。

【マイクロアレイデータを用いた 11q13.3 領域遺伝子解析】

口腔がん切除、生検、リンパ節転移巣標本の FFPE ブロックから DNA を抽出し、アジレント社 SurePrint G3 Human CGH 8X60K を用いてゲノムコピー数異常の頻度、程度、S/N 比などを検討した。FFPE 組織から抽出した DNA では、酵素法による蛍光色素ラベルを用いると、S/N 比が高くなり良好なマイクロアレイデータが得られないことが判明した。一方、化学標識法では、投入 DNA 量が 250ug と比較的多く必要であるが、FFPE 組織由来 DNA でも、S/N 比が低く比較的良好的なマイクロアレイデータが得られることが明らかとなった。そこで、微量の DNA を全ゲノム増幅後に化学標識法を用いてラベルした DNA を用いたところ、酵素法ほどではないが、S/N 比が高くなり良好なマイクロアレイデータが得られないことが判明した。これらの結果は、酵素法のラベル化のステップで PCR 反応が必須となることが原因と考えられ、全ゲノム増幅においても同様であるが、FFPE 組織から抽出した DNA に PCR 反応を加えるとバイアスのかかった増幅がおり、コピー数変化が維持されないと考えられた。



CGH マイクロアレイにて検出されたゲノム

は下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計6件)

1. 森田圭一、ルシヤタムカヤヌント・プラ
ディット、松川 祥、小村 健: 口腔が
んにおける FADD ゲノム増幅. 第35回
日本頭頸部癌学会 2011年6月9-10日
名古屋市
2. 中島雄介、花畑泰子、森田圭一、柏森 高、
小村 健: 口腔扁平上皮癌における
EGFR および SGLT1 の発現解析. 第35
回日本頭頸部癌学会 2011年6月9-10
日 名古屋市
3. 森田圭一、吉本光洋、松川 祥、小村 健:
口腔白板症における FADD ゲノム増幅.
第49回日本癌治療学会総会 2011年
10月27-29日 名古屋市
4. 吉本光洋、森田圭一、小村 健: 口腔白
板症における FADD ゲノム増幅検出法.
第76回口腔病学会学術大会 2011年12
月9-10日 東京
5. 森田圭一、プラディット ルシヤタムカ
ヤヌント、松川 祥、林 深、小崎健一、
稲澤譲治、小村 健: 口腔扁平上皮癌の
FFPE 組織を用いたゲノムコピー数異常
解析. 第36回日本頭頸部癌学会 2012
年6月7-8日 松江市
6. 森田圭一、プラディット ルシヤタムカ
ヤヌント、松川 祥、林 深、小崎健一、
稲澤譲治、小村 健: 舌扁平上皮癌後発
頸部リンパ節転移症例の FFPE 組織を用
いたゲノムコピー数異常解析. 第50回日
本癌治療学会学術集会 2012年10月
25-27日 横浜市

〔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〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森田圭一 (MORITA KEIICHI)

東京医科歯科大学・硬組織疾患ゲノムセンタ
ー・特任講師

研究者番号: 10396971

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: