

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24592766

研究課題名(和文) 口腔扁平上皮癌における新規癌抑制遺伝子 RIZ の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of candidate tumor suppressor gene, RIZ in oral squamous cell carcinoma.

研究代表者

玉村 亮 (TAMAMURA, Ryo)

日本大学・松戸歯学部・助教

研究者番号：00403494

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では口腔扁平上皮癌におけるRIZ遺伝子の機能解明を行った。RIZ遺伝子解析では、フレームシフト変異は見つからず、2種類の遺伝子多型が認められたものの臨床データとの相関はみられなかった。また、前癌病変および口腔扁平上皮癌においてRIZ蛋白の発現が認められた。蛋白の局在からRIZ蛋白は口腔扁平上皮癌の発生や進展に関与し、特に癌化の後期に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the present research, we investigated the function of candidate tumor suppressor gene, RIZ in oral squamous cell carcinoma (OSCC). According to our gene analysis, no frameshift mutation but two polymorphisms were detected. There was no significant relation between any of the two polymorphisms and clinicopathological data or patient's survival for OSCC. According to the immunohistochemistry by using anti-RIZ antibody, RIZ protein were expressed in not only OSCC but also precancerous lesion. It was suggested that RIZ protein played an important role in the carcinogenesis of OSCC, especially related at late stage.

研究分野：口腔病理学、口腔組織学

キーワード：口腔癌 扁平上皮癌 癌抑制遺伝子 RIZ

1. 研究開始当初の背景

癌は複数の癌関連遺伝子に生じた多段階的な遺伝子異常が蓄積した結果生じる。特に癌抑制遺伝子は細胞増殖を抑制する機能を持つ遺伝子であり、その遺伝子の欠失または不活性化により癌化と深く関与している。

LOH 解析は癌研究における新規癌抑制遺伝子を同定する優れた研究手法である。申請者のグループはこれまで本手法により、口腔癌における多数の新規癌抑制遺伝子を同定、報告してきた。

申請者は、「口腔扁平上皮癌における染色体 1p36 領域の新規癌抑制遺伝子の同定」(若手研究(B)、H20-22)の研究に従事し、LOH 解析により口腔扁平上皮癌に関与する新規癌抑制遺伝子候補として p73、DFFB、UBE4B、RIZ、Rap1GAP、EphB2、Runx3 を同定した。

これら候補遺伝子の中でも RIZ 遺伝子は最も高頻度に LOH を認めた領域に存在し、LOH 状態を詳細に検討した結果から癌発生の初期に関与する可能性が示唆された。

RIZ 遺伝子は、癌抑制機能を有する蛋白である RIZ をコードする。これまで全身の腺癌においてメチル化による RIZ 遺伝子の抑制や遺伝子変異による RIZ 遺伝子の機能不全、RIZ 蛋白発現の減少などが報告されている。

これまで国内外において口腔扁平上皮癌における RIZ に関する報告はみられない。

2. 研究の目的

RIZ 遺伝子は口腔扁平上皮癌の発生や進展に密接に関わる遺伝子である可能性が高く、その機能解析が必要であると考えた。

口腔扁平上皮癌組織における RIZ 遺伝子の解析 (mRNA 発現、mutation 解析、遺伝子多型解析) により status の検索を行う。また、ヒト口腔扁平上皮癌における RIZ 蛋白発現の解析を行う。

以上により口腔扁平上皮癌の発生や進展における RIZ の役割の解明を図る。

3. 研究の方法

(1) RIZ 遺伝子の遺伝子変異解析

①材料

岡山大学腫瘍バンク (清水憲二教授) に保存されている口腔扁平上皮癌 51 例を用いた。

②方法

Mutation 解析

SDS/ProK 処理後、フェノール/クロロホルムにてゲノム DNA を抽出、mutation の hot spot をターゲットとした PCR を行い、Big Dye R terminator sequencing kit で標識後、シーケンサー (ABI prism 3100 R) にて遺伝子変異の有無を検索した。

遺伝子多型解析

RIZ 遺伝子の遺伝子多型についても検索を行った。RIZ 遺伝子の多型として報告されている P704 polymorphism と Asp283Glu polymorphism の 2 種類の多型を中心に解析を行った。

(2) ヒト口腔扁平上皮癌における RIZ 蛋白発現の解析

①材料

岡山大学病院病理部 (口腔病理部門) に保存されている口腔扁平上皮癌 40 例および前癌病変 (上皮異形成 (軽度・中等度・高度) 各 10 例、上皮内癌 10 例) を用いた。

②方法

抗 RIZ 抗体を用い、免疫組織化学的染色を行った。結果は光学顕微鏡下、染色範囲・強度により解析した。対照として正常口腔粘膜上皮を用いた。

また、RIZ 遺伝子が存在する領域とは別の高頻度に LOH を認めた領域に存在する新規癌抑制遺伝子候補である Rap1GAP 遺伝子がコードする Rap1GAP 蛋白の発現についても抗 Rap1GAP 抗体を用い検討を行った。

4. 研究成果

(1) RIZ 遺伝子の遺伝子変異解析

これまでに報告されている mutation の hot spot である poly(A)8 track, poly(A)9 track をターゲットとした RIZ 遺伝子の mutation 解析を行ったが、フレームシフト変異は見つからなかった。次に、これまでに報告されている 2 種類の RIZ 遺伝子の多型である P704 polymorphism と Asp283Glu polymorphism について遺伝子多型解析を行った。その結果、exon8 での P704 deletion を 51 症例中 4 症例 (7.8%)、Asp283Glu polymorphism を 51 症例中 16 症例 (31.4%) に認めた。(図 1)

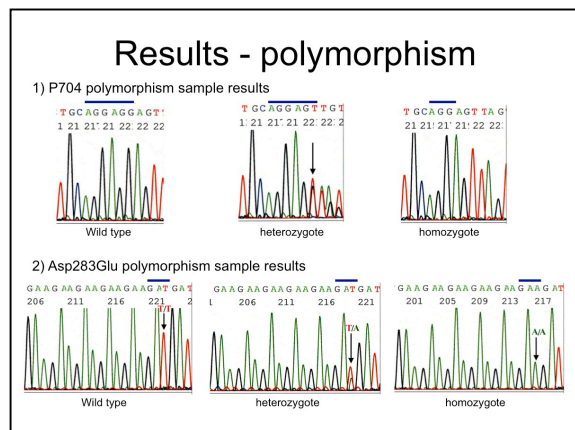


図 1 遺伝子多型解析

二つの SNP の有無と臨床データとの相関を検討した結果、年齢や性別、過去の癌の既往などの臨床的項目、分化度などの病理組織学的特徴と SNP の関連は認められなかった。(図 2)

生存分析においては、いずれも統計学的な有意差は認められなかったものの、P704polymorphism を有する群は、wild type 群よりも無疾患生存率、期間生存率ともに長い傾向を示した。また、Asp283Glu polymorphism 群は、wild type 群に比較して、無疾患生存率、期間生存率ともに短い傾向を示した。(図 3)

H, Tamamura R, Nishibori M, Nagatsuka H, Nishizaki K, Yoshino T, Does HMGB1 predict occult neck lymph node metastasis in early tongue carcinoma? A case-control study of 26 patients, J Laryngol Otol, 査読有、Vol.128、No.10、2014、pp.926-931、doi: 10.1017/S0022215114001819.

⑤Katase N, Lefeuvre M, Tsujiigiwa H, Fujii M, Ito S, Tamamura R, Buery RR, Gunduz M, Nagatsuka H, Knockdown of Dkk-3 decreases cancer cell migration and invasion independently of the Wnt pathways in oral squamous cell carcinoma-derived cells, Oncol Rep, 査読有、Vol.29、No.4、2013、pp.1349-1355、doi: 10.3892/or.2013.2251.

⑥Tamamura R, Nagatsuka H, Siar CH, Katase N, Naito I, Sado Y, Nagai N, Comparative analysis of basal lamina type IV collagen α chains, matrix metalloproteinases-2 and -9 expressions in oral dysplasia and invasive carcinoma, Acta Histochem, 査読有、Vol.115、No.2、2013、pp.113-119、doi: 10.1016/j.acthis.2012.05.001.

⑦ Nagatsuka H, Siar CH, Tsujiigiwa H, Naomoto Y, Han PP, Gunduz M, Sugahara T, Sasaki A, Nakajima M, Heparanase and cyclooxygenase-2 gene and protein expressions during progression of oral epithelial dysplasia to carcinoma, Ann Diagn Pathol, 査読有、Vol.16、No.5、2012、pp.354-361、doi: 10.1016/j.anndiagpath.2012.02.004.

[学会発表] (計9件)

①河合 穂高、玉村 亮 他、腫瘍微小環境における骨髄由来細胞の組織学的検討、岡山歯学会、2015年9月27日、岡山大学歯学部 (岡山県・岡山市)

②河合穂高、玉村 亮 他、腫瘍の微小環境形成における骨髄由来細胞の動態、日本病理学会、2015年4月30日、名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市)

③Tamamura R 他、LOH analysis in 1p36 region and the immunohistochemical analysis of RIZ1 expression in oral squamous cell carcinoma、23rd Annual Meeting of the Society for Hard Tissue Regenerative Biology、2014年8月21日、台中 (台湾)

④玉村 亮 他、口腔扁平上皮癌における1p36領域のLOH解析およびRIZ1発現の検討、日本病理学会、2014年4月24日、広島国際会議場 (広島県・広島市)

⑤玉村 亮 他、腺様嚢胞癌における ABCG2 および CD133 の免疫組織学的検索、歯科基礎医学会、2013年9月22日、岡山コンベンションセンター (岡山県・岡山市)

⑥李 海婷 他、口腔癌細胞株に対する5-FU・BCG生菌併用療法の検討、硬組織再生生物学会、2013年8月22日、鶴見大学歯学部 (神奈川県・横浜市)

⑦玉村 亮 他、腫瘍の微小環境形成に関与する骨髄由来細胞の動態について、日本病理学会、2013年6月7日、ロイトン札幌 (北海道・札幌市)

⑧片瀬 直樹 他、siRNAによるDkk-3遺伝子ノックダウンが口腔扁平上皮癌由来細胞に及ぼす影響、日本臨床口腔病理学会、2012年8月31日、東京医科歯科大学 (東京都・文京区)

⑨片瀬 直樹 他、口腔扁平上皮癌由来細胞におけるDkk3遺伝子の機能解析、日本病理学会、2012年4月26日、京王プラザホテル (東京都・新宿区)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

玉村 亮 (TAMAMURA, Ryo)
日本大学・松戸歯学部・助教
研究者番号：00403494

(2) 研究分担者

長塚 仁 (NAGATSUKA, Hitoshi)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：70237535

辻極 秀次 (TSUJIGIWA, Hidetsugu)
岡山理科大学・理学部・教授
研究者番号：70335628

片瀬 直樹 (KATASE, Naoki)
川崎大学・医学部・助教
研究者番号：30566071
(平成24年度から平成26年度まで分担者)