

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 7 日現在

機関番号：33703

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592850

研究課題名(和文) 口腔の前癌病変を規定する遺伝子の検索と診断用抗体の作成：ラットからヒトへ

研究課題名(英文) Creating a diagnostic antibody and the search of the genes that define the pre-cancerous lesions of the oral cavity: from rats to humans

研究代表者

田沼 順一 (Tanuma, Junichi)

朝日大学・歯学部・教授

研究者番号：20305139

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：舌癌(口腔癌)の前癌病変および境界病変における遺伝子変異と組織型との相関を明らかにし、病理組織診断の診断基準や予後の指標となる新たなマーカーを見出して、上皮異形成や上皮内癌など、病理医が日常苦慮する症例(組織診や細胞診)の客観的な診断基準を確立した。(1)舌がんモデル動物による、前癌病変を規定する遺伝子の選抜や確立および機能解析をできた。選抜出来た遺伝子における、ヒト前癌病変の病理組織での評価や血清の腫瘍マーカーになる抗体を完成。(2)確立できた口腔の前癌病変マーカーを細胞診用の免疫染色に応用ができた。

研究成果の概要(英文)：Tongue cancer is to clarify the correlation between the gene mutation and tissue type in pre-cancerous lesions and borderline lesions of (oral cancer), and have found a new marker, which is an indicator of the diagnostic criteria and prognosis of pathological tissue diagnosis, epithelial dysplasia and epithelial lesion such as squamous cell carcinoma, we have established the objective diagnostic criteria of everyday struggling to cases.

According to tongue cancer model animal, we were able to the selection and establishment and functional analysis of genes that before defining the cancer lesion. To complete the antibody of the tumor marker of evaluation and serum in the pathological tissue of human precancerous lesions. A pre-cancerous lesion marker of establishment can be oral could be applied to immunostaining for cytology.

研究分野：発がん

キーワード：舌癌 発がん 前癌病変 診断基準 上皮異形成 モデル動物

1. 研究開始当初の背景

舌癌（口腔癌；扁平上皮癌）の前癌病変および境界病変の病理組織診断は、主に細胞異型度を中心に診断されているが、これは度重なる WHO 分類による指針の改訂と共にその項目が増やされるだけで、組織的になされてきたとはいえない。さらに、口腔粘膜の部位特異性を考慮したものではなく、子宮頸部癌の基準を流用したものでしかない。これらの基準が曖昧なままであるため、病理医の病理診断基準に大きな差異が見られるだけでなく、患者の治療方針などに大きな違いが出ていることは各国の調査でも明らかである。

このような現状を打開するため、日本臨床口腔病理学会や口腔腫瘍学会が口腔の前癌病変の病理組織診断基準策定の気運が高まり、さらに日本臨床細胞学会でも口腔細胞診のガイドラインが作成中である。しかし、これら前癌状態を規定する有力な候補遺伝子・マーカー・抗体に関する報告はほとんどされていない。また、ただやみくもにヒトの材料を用いる研究は数多くあるが、焦点がぼけてしまい、明確で新たな結果が得られていない。これに対し、きっちりと動物実験を基本にヒトへ応用させるアプローチは一見遠回りのようだが、この様な基本を行えば確実に且つ容易に実現化できることは、我々を含め他の研究の結果からも明らかであり、同時に我々が確立したラット舌癌モデルが大変有用になるはずである。

我々は5つの舌癌感受性遺伝子座のマッピングに成功し、これらがヒトの発がん機構にどのような役割を果たしているのかを、従来の分子生物学的手法だけでなく、マイクロアレイ法の技術を用いて、大量の遺伝子解析を行ってきた。その結果、この遺伝子座はヒトの癌関連タンパクを大きく解明する1つの指標になるという研究も継続中である。さらに癌の診断用マーカーの指標になる遺伝子や抗体は、これらの実験結果を踏まえて応

用させた、前癌病変の研究は組織診断だけでなく口腔細胞診の診断に対しても大いにブレイクスルーが期待できる。

2. 研究の目的

舌癌（口腔癌）の前癌病変および境界病変における遺伝子変異と組織型との相関を明らかにし、病理組織診断の診断基準や予後の指標となる新たなマーカーを見出して、上皮異形成や上皮内癌など、病理医が日常苦慮する症例（組織診や細胞診）の客観的な診断基準を確立したい。

(1) 舌がんモデル動物による、前癌病変を規定する遺伝子の選抜や確立および機能解析を行う。

(2) 選抜出来た遺伝子（我々の研究で見出した細胞増殖に関連する RANA 結合タンパク hnRNP K）における、ヒト前癌病変の病理組織での評価や血清の腫瘍マーカーになる抗体の開発。

(3) 確立できた口腔の前癌病変マーカーを細胞診用の免疫染色に応用させる。

3. 研究の方法

次世代シーケンス、miRNA および糖鎖構造など多くの解析により、前癌病変に関連する遺伝子を検索する。次に前癌病変の状態にあるラットや培養細胞を用いて CRISPR/Cas 法により、ノックイン・ノックアウトさせた遺伝子改変ラットを作製して評価するスクリーニングと同時に、ヒト病理組織に対する有用性も確認することで、腫瘍マーカーの確立と抗体作成を実現化する。研究は3年間継続して、優れた前癌病変に関連する遺伝子の検索を行う。特に我々が見出した前癌病変の候補遺伝子の細胞増殖に関連する RNA 結合タンパク質 hnRNP K に絞った研究を優先して、組織診や細胞診に容易に利用できる腫瘍マーカーや抗体の作製を目指す。

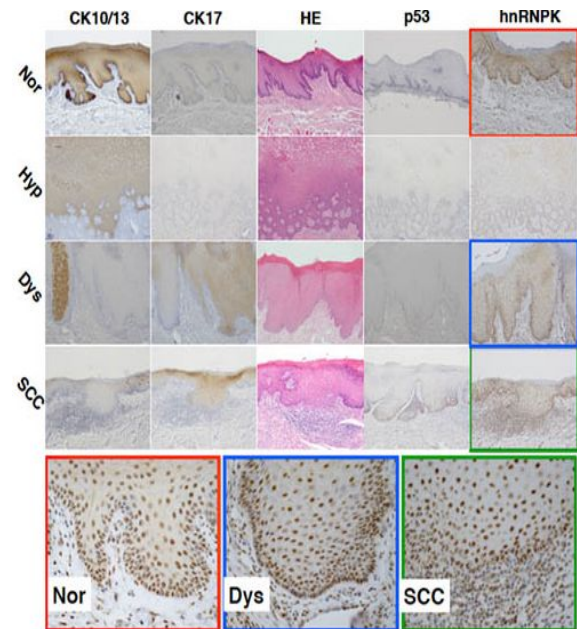
4. 研究成果

舌癌（口腔癌）の前癌病変および境界病変における遺伝子変異と組織型との相関を明らかにし、病理組織診断の診断基準や予後の指標となる新たなマーカーを見出して、上皮異形成や上皮内癌など、病理医が日常苦慮する症例（組織診や細胞診）の客観的な診断基準を確立した。(1) 舌がんモデル動物による、前癌病変を規定する遺伝子の選抜や確立および機能解析をできた。選抜出来た遺伝子における、ヒト前癌病変の病理組織での評価や血清の腫瘍マーカーになる抗体を完成。(2) 確立できた口腔の前癌病変マーカーを細胞診用の免疫染色に応用ができた。

ヒト口腔前癌組織と正常組織とのタンパク質メチル化レベル（リジンメチル化、アルギニンメチル化）を比較すると、前癌部は特定の分子のリジンメチル化・全体的なアルギニンメチル化が亢進しており、癌化に伴いタンパク質のメチル化の亢進が特定のタンパク質で起こり、hnRNPK メチル化タンパク質の検出が腫瘍マーカーとなる。つまり抗 hnRNPK 抗体を用いてその複合体を免疫沈降し抗メチルリジン抗体 (MeK)、又は抗メチルアルギニン抗体 (MeR) でウェスタンブロッティングを行うことで、複数 hnRNPK が細胞内で分子複合体として存在しており、MeR 化されたタンパク質及び MeK 化された複数のタンパク質が hnRNPK であることを検出することが可能である。

次世代シーケンスにて選抜された遺伝子の抗体を作製して、ヒトの病理組織標本や培養細胞を用いて、免疫染色や ISH によるタンパク質の発現解析を行い、遺伝子の有用性を病理組織学的に検討していく。前癌病変において日常病理診断で使用されている抗体マーカーと、我々が作製した免疫染色用抗体である hnRNPK 遺伝子と対比させて検討する。なお細胞増殖・周期に関連

するマーカー (Ki67 & p53 と扁平上皮細胞の分化マーカーとしてサイトケラチン (CK17 & CK10/13) を併せて検討し、発現の強度、細胞質や核への分布状態を HE 染色における形態学的特徴を観察する。



2014 年日本病理学会・日本癌学会の講演発表

図 (上): HE, CK10/13, CK17, p53 および hnRNPK による免疫染色の動態が明瞭である。

図 (下): hnRNPK は、悪性度が増すと陽性部位が細胞質から核へ移動することから細胞診に応用も可能。

p53	hnRNPK cytoplasm	Hyp	Dys	SCC
+	+	0	24(48%)	6(12%)
+	-	0	8(16%)	39(78%)
-	+	16(80%)	13(26%)	3(6%)
-	-	4(20%)	5(10%)	2(4%)
p<0.01				

p53	hnRNPK nucleus	Hyp	Dys	SCC
+	+	0	26(52%)	43(86%)
+	-	0	1(2%)	3(6%)
-	+	0	22(44%)	3(6%)
-	-	20(100%)	1(2%)	1(2%)
p<0.001				

図: hnRNPK の細胞質と核における陽性像と病理組織程度との比較および p53 に有為な相関がある。

糖鎖解析: レクチンマイクロアレイ

1) レクチンマイクロアレイのプロファイリング

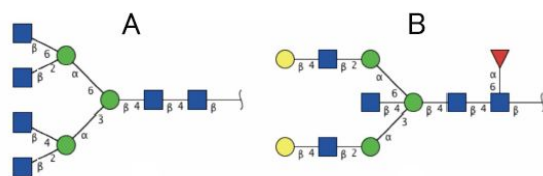
糖鎖比較解析ソフト GlycoStation™ Tools により数値化/グラフ化することができ、糖鎖

プロファイル比較解析を行うことで、上皮細胞のdysplastic な変化に特徴的なレクチンを選び出し、前癌病変で変化している糖鎖構造が推定できる。正常部と病変部で優位な変化がみられたレクチンについて組織化学的染色を施し、病理組織標本における発現解析を行う。予備実験では、レクチン14種類の中で癌化に伴い染色性が変化する9種類のレクチンが確認されている。

2) 候補糖鎖構造に関する糖転移酵素

や糖ヌクレオチドトランスポーター同定再現性が高くかつ診断精度が良い新規診断マーカーとなるためには、血中もしくは組織標本で再現できなければ臨床応用し難い。そのため発現するレクチンの組み合わせによっては、修飾されている候補糖鎖が多数上げられることが予測できるが、その中でも臓器特異性が高いものが有利であると考え。そこで、糖鎖構造あるいは関連する転移酵素や輸送体など横断的な検索が可能である、Consortium for Functional Glycomics、日本糖鎖科学統合データベース、EUROCarbDBなどの各種データベースを利用し、バイオインフォマティクスにより、候補となる糖タンパク質の発現量、臓器特異性、癌化関連性を基準として、候補遺伝子の選定および優先順位を決定した。

なお予備実験で解明できた糖鎖の構造を示すと、A:上皮異形成の糖鎖、B:上皮内癌の糖鎖である。



したがって、これらの本研究計画から前癌病変の基礎研究から臨床応用までの一貫した研究基盤を確立できたら、診断・治療に大きく寄与する情報を提供するに違いないと考える。つまり A)と B)による候補遺伝子は、病理組織診や細胞診の診断に対して確実に応用できるはずである。

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 7 件)

1) Tanaka M, Watanabe M, Yokomi I, Matsumoto N, Sudo K, Satoh H, Igarashi T, Seki A, Amano H, Ohura K, Kakei R, Shibata S, Nagayama M, Tanuma J. Establishment of a novel dwarf rat strain: cartilage calcification insufficient (CCI) rats. *Experimental Animals*, 2015 (*in press*).

2) Muraki T, Hirano M, Kawarada K, Nagayama M, Ehara M, Shisa H, Sugimoto M, Hiai H, Kitano M, Tanuma J. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K as a new marker of early detection for tongue carcinogenesis. *Cancer*, 2015 (*in press*).

3) Suwa H, Hirano M, Kawarada K, Nagayama M, Ehara M, Muraki T, Shisa H, Sugiyama A, Sugimoto M, Hiai H, Kitano M, Tanuma J. *Pthlh*, a promising cancer modifier gene in rat tongue carcinogenesis. *Oncology Reports*, 31: 3-12, 2014.

4) Ihara A, Nagayama M, Matsubara M, Kawarada K, Suwa H, Ehara M, Skimori M, Tanuma J. Epithelial-mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma of the gingiva: An immunohistochemical and ultrastructural case study. *J. Gifu Dent. Soc*, 40(3); 258-263, 2014.

5) Yamada M, Nagayama M, Katsumata A, Kawano S, Gen K, Ehara M, Nakao J, Tanuma J, Yoshida T. Hypomineralized Enamel of Dens Invaginatus. Its distinct images and pathogenesis of the Type III invagination using micro-focusing computed tomography.

J. Hard tissue Biology, 23(4); 449-453, 2014.

6) Ohta K, Sumitomo S, Nagyama M, Tanuma J, Shikimori M. A case of sinonasal undifferentiated carcinoma treated without radical resection. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology*, 25 November 2013

7) Hirano M, Muraki M, Nagayama M, Ehara M, Kawarada K, Suwa H, Kitano M, Tanuma J. Intraneural perineurioma arising in the lateral border of the tongue. *Pathology International*, 63(12); 619-621, 2013.

〔学会発表〕(計 23 件)

1) 諏訪宏彦、平野真人、永山元彦、江原道子、志佐湊、日合弘、北野元生、田沼順一. *Pthlh*, a cancer modifier gene in rat tongue carcinogenesis. 第102回日本病理学会総会 2013年6月7日、札幌 口演

2) 永山元彦、江原道子、平野真人、田沼順一. 軟骨石灰化不全ラット(CCIラット)における頭蓋底成長の形態学的観察. 第24回日本臨床口腔病理学会総会 2013年8月29日、東京 示説

3) 安部雅世、渡邊昌弘、安田忠司、永山元彦、田沼順一、渋谷俊昭. インディアンヘッジホッグシグナル阻害による歯周組織への影響. 第56回日本歯周病学会総会 2013年9月22日、前橋 口演

4) 永山元彦、太田貴久、江原道子、式守道夫、田沼順一. 頬粘膜に生じた粘表皮癌の1例. 第23回日本口腔内科学会総会 2013年9月13・14日、東京 示説

5) 永山元彦、松原 誠、江原道子、村松泰徳、式守道夫、田沼順一. 広範な下顎骨吸収を伴うオトガイ下部のリンパ管腫の1例 第23回日本口腔内科学会総会 2013年9月13・14日、東京 示説

6) 門中貴義、江原道子、中島宗則、田沼順一、永原國央. FGF2 と骨代用材としてリン酸カルシウムを基材とした生体内における相乗効果. 第43日本口腔インプラント学会学術総会 2013年9月15日、博多 口演

7) 竹内 綾、永山元彦、葛島康平、渡部博之、江原道子、天野 均、田中政巳、渡辺 実、田沼順一、北井則行. 軟骨石灰化不全ラット(CCIラット)に置ける頭蓋底軟骨結合部の形態学的解析. 第55回歯科基礎医学会総会・学術大会 2013年9月21日 岡山 口演

8) 村木智則、平野真人、式守道夫、江原道子、永山元彦、志佐湊、日合弘、北野元生、田沼順一. Analyzed the expression of *hnRNP K* in the human oral carcinogenesis. 第72回日本癌学会総会 2013年10月3日、横浜

9) 江原道子、永山元彦、村木智則、田沼順一. Implications for the diagnostic markers for oral precancerous lesions using sugar chains expression. 第72回日本癌学会総会 2013年10月5日、横浜

10) 村木智則、平野真人、永山元彦、田沼順一、笠井唯克、式守道夫. ヒト口腔前癌病変における *hnRNP K* 発現解析. 第58回日本口腔外科学会総会 2013年10月11日、博多

11) 太田貴久、長繩鋼亮、鷺見成紀、本橋征之、松原 誠、永山元彦、田沼順一、住友伸一郎、村松泰徳、式守道夫. 基底細胞母斑症

候群を疑った一例. 第 58 回日本口腔外科学会
総会 2013 年 10 月 12 日、博多

12) 江原道子、永山元彦、田沼順一. 口腔領
域の細胞診における診断精度向上の試み.
第 52 回日本臨床細胞学会総会 2013 年 11 月
2 日、大阪

13) 松原 誠、式守道夫、村木智則、江原道
子、永山元彦、田沼順一、住友伸一郎. 顎囊
胞が疑われた上顎洞内貯留嚢胞の 1 例. 第
52 回日本臨床細胞学会総会 2013 年 11 月 2
日、大阪

14) 伊藤友理、長縄鋼亮、藤本雅子、松原 誠、
永山元彦、住友伸一郎、村松泰徳、田沼順一、
式守道夫. 頬粘膜に生じた顆粒細胞腫の 1 例
第 32 回日本口腔腫瘍学会総会 2014 年 1 月
23 日、札幌

15) 竹内綾、永山元彦、江原道子、田沼順一.
軟骨石灰化不全ラット (CCI ラット) における
頭蓋底軟骨結合の変化. 第 103 回日本病理学
会総会 2014 年 4 月 26 日、広島

16) 酒々井夏子、久松憲治、齊郷智恵美、小
林一博、永山元彦、田沼順一、宮崎龍彦. 小
唾液腺に発生した紡錘形細胞成分を伴う
mucoepidermoid carcinoma の 1 例. 第 103 回
日本病理学会総会 2014 年 4 月 26 日、広島

17) 田沼順一、中尾寿奈、江原道子、永山元
彦、志佐湍、日合弘、北野元生. hnRNP K is
a new prospective marker of early
detection for tongue carcinogenesis. 第
103 回日本病理学会総会 2014 年 4 月 26 日、
広島

18) 永山元彦、江原道子、住友伸一郎、川原
田幸司、田沼順一. 上唇正中部に生じた

Glomus tumor の 1 例. 第 55 回日本臨床細胞
学会総会 2014 年 6 月 6 日、横浜

19) 中尾寿奈、永山元彦、江原道子、田沼順
一. 軟部腫瘍 2 例. 第 25 回日本臨床口腔病理
学会総会 2014 年 8 月 28 日、新潟・口演

20) 江原道子、中尾寿奈、永山元彦、田沼順
一. 口腔病変における糖鎖の役割. 第 25 回
日本臨床口腔病理学会総会 2014 年 8 月 28
日、新潟・示説

21) 江原道子、中尾寿奈、永山元彦、田沼順
一. 口腔前癌病変診断マーカーとしての糖
鎖の可能性. 第 56 回日本歯科基礎学会総会
2014 年 9 月 27 日、博多・示説

22) 伊藤友理、長縄鋼亮、藤本雅子、永山元
彦、住友伸一郎、村松泰徳、田沼順一、式守
道夫. 顆粒細胞腫の 2 例. 第 59 回日本口腔外
科学会総会 2014 年 10 月 18 日、千葉・口演

23) 江原道子、永山元彦、住友伸一郎、川原
田幸司、田沼順一. 口腔粘膜上皮擦過細胞診
における従来法と LBC 法との比較. 第 53 回
日本臨床細胞学会秋期総会 2014 年 11 月 8
日、下関・示説

〔その他〕
ホームページ等
<http://scw.asahi-u.ac.jp/~patho/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
田沼 順一 (JUNICHI TANUMA)
朝日大学・歯学部・教授
研究者番号：20305139

(2) 研究分担者
永山 元彦 (MOTOHIKO NAGAYAMA)
朝日大学・歯学部・准教授
研究者番号：50298436