

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：32710

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659905

研究課題名(和文)カルシウム感知受容体に着目した口腔白板症の病因・病態解明と悪性化確率推定法の開発

研究課題名(英文) Analysis of pathogenesis and pathophysiological distinction of leukoplakia and development a new method of estimation of malignant alteration focused on calcium sensing receptor

研究代表者

里村 一人 (Satomura, Kazuhito)

鶴見大学・歯学部・教授

研究者番号：80243715

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：白板症における角化異常(すなわち角化亢進)が、細胞外カルシウム感知受容体(CaSR)における遺伝子変異の蓄積に起因している可能性に着目し、口腔白板症にて切除された28例についてPCR法およびダイレクトシーケンス法を用いて上皮細胞のCaSR遺伝子の遺伝子配列を解析し、変異の有無を正常粘膜21例と比較した。口腔白板症症例にてコドン990等に変異を認めたと、正常粘膜に認める割合との有意差は認めず、特異的な変異も認めなかった。CaSRは上皮細胞の分化を制御していることが明らかとなっており、大腸癌の分化に重要な役割を果たしているとの報告もあることから、今後検討をさらに重ねていく必要があると思われる。

研究成果の概要(英文)：In the aim of finding possible correlations on CaSR gene mutation about oral mucosal leukoplakia, we analyzed gene arrangement and genetic mutation of CaSR on oral mucosal leukoplakia with/without abnormal keratosis of epithelium compared with the normal oral mucosa. 28 cases diagnosed as leukoplakia and 21 cases with normal oral mucosa (as controls) were selected. DNAs extracted from epithelial cells were analyzed about CaSR gene mutation. As a result, the nonsynonymous common polymorphisms R990G, A986S, Q11011E in exon7 were identified and another novel mutation was not observed. In this study, unfortunately, we couldn't reveal the association between genetic mutation of CaSR and development of leukoplakia. However, the CaSR had a complex role for differentiation of colon cancer was reported. Further investigation is necessary to evaluate the correlation between CaSR gene mutation and oral mucosal leukoplakia.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系歯学

キーワード：口腔白板症 CaSR 悪性化確率

### 1. 研究開始当初の背景

口腔白板症は口腔粘膜疾患の中でも発症頻度が比較的高く、7~11%の頻度で悪性化することから、口腔粘膜疾患の中でもとくに留意すべき角化性病変であるが、今日までその病態や癌化の原因などについては十分に解明されておらず、外科的切除以外に有効な治療法が確立されていないのが現状である。

細胞外カルシウム感知受容体 (calcium-sensing receptor:CaSR) は、細胞外カルシウム (Ca) による副甲状腺ホルモンの分泌調節に必須の役割を果たす分子として同定された7回膜貫通型のGタンパク質共役受容体であり、細胞外Caの結合により細胞内Ca濃度の上昇やphospholipase C (PLC)、protein kinase B (AKT)、mitogen-activated protein kinases (MAPKs) など複数の情報伝達系が活性化される。このCaSRは副甲状腺に加え、腎臓や甲状腺、骨組織にも発現しており、細胞外Ca濃度上昇に対するCa排泄の促進やカルシトニン分泌の抑制、骨のリモデリング制御に関与していることが明らかとなっている。

CaSRは、1,078個のアミノ酸からなり、その配列は6個のエクソン(3234bp)によりコードされている。この翻訳領域の中には、現在までに判明しているだけで210カ所の変異や遺伝子多型が確認されており、さらにそのうちのいくつかは機能獲得型変異や機能喪失型変異であり、実際の細胞機能に異常を来すことが知られている。このようにCaSRは非常に変異を受けやすい遺伝子と考えられる。さらに最近、この受容体が皮膚のkeratinocyteや食道の粘膜上皮細胞にも発現していることが確認され、上皮細胞の分化を制御していることが明らかとなった(J Biol Chem 276 41079-41085 2001, J Cell Physiol 192 45-54 2002, J Invest Dermatol 127 1074-1083 2007)。事実、keratinocyteの培養系において培養液中のCa濃度が0.03 mM以下では、keratinocyteは分化することなく増殖するが、Ca濃度が高くなると増殖を停止し、角化することが知られており、現在この現象は現在、CaSRを介した現象と考えられている。このような事実から、口腔粘膜の上皮細胞において、CaSR遺伝子に変異が起こると、細胞外Ca濃度への反応が異常となり、口腔粘膜の分化(角化)に異常が起こることが推測される。

### 2. 研究の目的

口腔粘膜上皮細胞の分化(角化)を制御している機構の一つと考えられる細胞外カルシウム感知受容体 (calcium-sensing receptor:CaSR) における変異の蓄積に着目し、口腔粘膜の角化異常を主徴とする前癌病変である口腔白板症の病因および病態の解明を行うとともに、CaSR遺伝子における変異蓄積度を指標とした口腔白板症の悪性化確率を推定し得る診断法の開発を行う。さらに本研究により、口腔を含む上部消化管における発がんの特徴の一つとして捉えられているfield cancerizationのメカニズムについての知見を得ることを目指す。

### 3. 研究の方法

口腔白板症症例および非白板症症例の切除組織から、上皮細胞のDNAを抽出し、CaSR遺伝子のうち翻訳領域をコードしている6個のエクソンそれぞれをPCR法により増幅、遺伝子配列を決定し、(1)口腔白板症病変の上皮細胞と非口腔白板症病変(正常口腔粘膜を含む)の上皮細胞のCaSR遺伝子における変異の蓄積状態の比較、(2)白板症長期安定症例および悪性化症例におけるCaSR遺伝子における変異の比較、さらに(3)白板症からの悪性化症例と白板症を経過せずに発症した口腔癌におけるCaSR遺伝子における変異の比較を行う。この結果をもとに、口腔白板症およびfield cancerizationの病態の解明を行うとともに、白板症の悪性化確率推定法の確立を目指す。

(1)口腔白板症病変と非口腔白板症病変(正常口腔粘膜を含む)における上皮細胞のCaSR遺伝子変異の蓄積状態の比較

口腔白板症症例および非白板症症例(正常口腔粘膜を含む)の生検もしくは切除組織をDispase酵素を用いて上皮組織と間葉組織に分ける(J.Biosci.Bioeng 110(3):345-50 2010)。Fast Pure DNA Kit (TAKARA社製)を使用してDNAを抽出する。抽出したDNAを鋳型としてCaSR遺伝子の増幅を行う。この際、CaSR遺伝子のうち翻訳領域をコードしている6個のエクソンのそれぞれの全領域を別々に増幅できるよう設計されたプライマーを用いる。PCRにより増幅された遺伝子断片から通法により遺伝子配列を決定する(Curr Pharm Biotechnol 10(3):311-6 2009, Am J. Hum Genet 56 880-886 1995)。

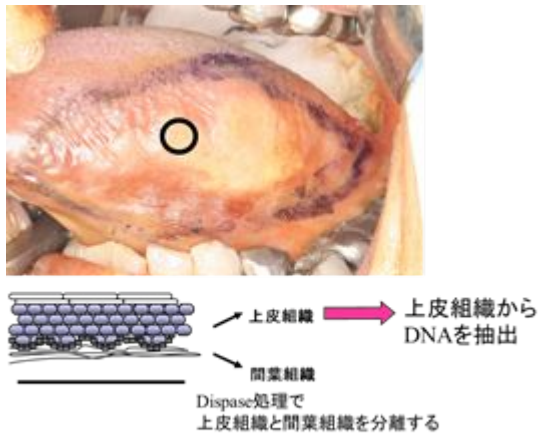


Fig.1 検体採取方法

こうして得られた結果から、白板症病変および非白板症病変における CaSR 遺伝子における変異状態の比較を行い、白板症における角化異常（角化亢進）と CaSR 遺伝子における変異との相関を明らかにする。

(2) 口腔白板症長期安定症例と悪性化した口腔白板症症例における CaSR 遺伝子における変異状態の比較

口腔白板症の長期安定症例と経過観察中に悪性化がみられた口腔白板症症例の生検もしくは切除組織より、前述と同様の方法で DNA を抽出し、CaSR 遺伝子の増幅を行う。この遺伝子における変異を解析し、長期安定症例と悪性化症例における遺伝子異常の変化および蓄積状態につき検討するとともに、口腔白板症の悪性化メカニズムを明らかにすることを旨とする。

(3) 白板症が先行していない口腔癌( de novo carcinoma ) における CaSR 遺伝子における変異状態の検討

口腔白板症等の角化異常を伴わず発症した口腔癌における CaSR 遺伝子における変異を検索する。この結果を、口腔白板症から発生した口腔癌における遺伝子異常と比較することにより、角化異常を伴わない、いわゆる de novo carcinoma の発生メカニズムに関する知見を得ることを試みる。

#### 4. 研究成果

白板症における角化異常（すなわち角化亢進）が、上皮細胞の分化（角化）を制御している主要なメカニズムの一つと考えられている細胞外カルシウム感知受容体（calcium-sensing receptor:CaSR）における変異の蓄積に起因している可能性に着目することにより、口腔粘膜の角化異常を主徴とする前癌病変である口腔白板症の病因および病態の解明を行うことを目的に、口腔白

板症と臨床診断され、生検および切除された検体のうち軽度から高度の上皮異形成を認めた 28 例について CaSR 遺伝子変異の有無を検討し、非白板症症例（正常口腔粘膜を含む）21 例と比較した。口腔白板症症例および非白板症症例の切除組織から、Dispase 酵素を用いて切除組織を上皮組織と間葉組織に分けた（J.Biosci.Bioeng 110(3):345-50 2010）。Fast Pure DNA Kit（TAKARA 社製）を使用して上皮細胞の DNA を抽出し、抽出した DNA を鋳型として CaSR 遺伝子のうち翻訳領域をコードしている 6 個のエクソンそれぞれを PCR 法により増幅後、ダイレクトシーケンス法にて遺伝子配列を決定した。

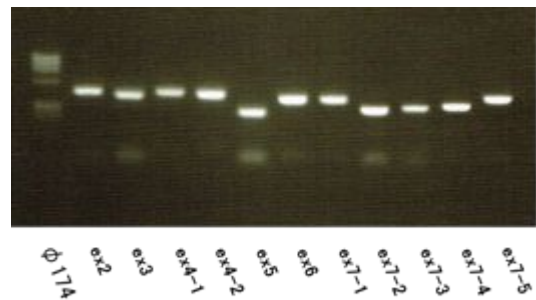


Fig.2 CaSR PCR産物

こうして得られた結果から、口腔白板症病変の上皮細胞と非白板症症例の上皮細胞の CaSR 遺伝子における変異の状態を確認した。

口腔白板症症例においてエクソン 7 のコドン 990 にアルギニンがグリシンに変化する変異を 15 例で、エクソン 7 のコドン 1011 にグルタミンがグルタミン酸に変化する変異を 1 例で、エクソン 7 のコドン 986 にアラニンがセリンに変化する変異を 1 例で認めた。エクソン 7 のコドン 990 の変異はタンパク質機能の低下や機能欠如、異常タンパク質の出現などにつながる場合もある非同義変異であるが、一般的な一塩基多型であり、他の疾患でも変異を認める報告が多く、正常粘膜における変異の発生率との有意差は認めなかった。また、新たな遺伝子配列の変異も認めなかった。

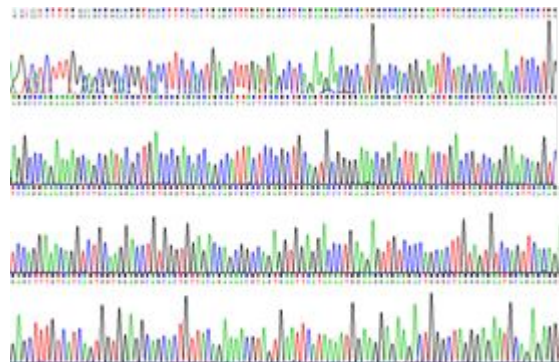


Fig.3 exon7のダイレクトシーケンス結果クロマトグラム

CaSR は皮膚の keratinocyte や食道の粘膜上皮細胞にも発現していることが確認され、上皮細胞の分化を制御していることが明らかとなっている。また、大腸癌の分化において CaSR が重要な役割を果たしているとの報告もあり、遺伝子座の対立遺伝子検索や悪性化症例における遺伝子異常の変化および蓄積状態についての検討との比較など今後検討をさらに重ねていく必要があると思われる。

## 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)

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

里村 一人 (SATOMURA Kazuhito)

鶴見大学・歯学部・教授

研究者番号：80243715

### (2)研究分担者

徳山 麗子 (TOKUYAMA Reiko)

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号：20380090

佐藤 徹 (SATO Toru)

鶴見大学・歯学部・講師

研究者番号：30170765

寺田 知加 (TERADA Chika)

鶴見大学・歯学部・学部助手

研究者番号：40460216

井出 信次 (IDE Shinji)

鶴見大学・歯学部・学部助手

研究者番号：00611998

### (3)連携研究者

なし