

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24792239

研究課題名(和文) MUC1 遺伝子スプライシング異常が口腔癌に及ぼす影響

研究課題名(英文) Alternative splicing of MUC1 mucin in oral squamous cell carcinoma

## 研究代表者

浜田 倫史 (Tomofumi, Hamada)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・助教

研究者番号：00444894

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：われわれはまず、口腔癌症例の組織を用いてMUC1ムチンの発現を検索し、MUC1の過剰発現は、口腔扁平上皮癌の予後予測因子であることを明らかにした。次に細胞株や切除組織を用いて、MUC1のスプライシングバリエーションに対し個別の検討を開始した。その結果、それぞれの細胞株や症例により、発現バリエーションの種類およびその比率は大きな相違があることが明らかになった。今後は症例数を増やしたのち統計解析を行い、口腔癌の予後不良因子である膜型ムチンの選択的スプライシングバリエーションのうち、予後に関連し治療の標的となりうるものを見いだしていく予定である。

研究成果の概要(英文)：The goal of this study was to detect alternative splicing of MUC1 mucin in oral squamous cell carcinoma and to evaluate its relationship with clinicopathological factors. First, we investigate the expression level of membranous mucin in the resected tumor samples by immunohistochemistry and found that aberrant expression MUC1 was an independent prognostic factor indicating poor prognosis in patients with OSCC. Next, we have started to evaluate the expression level of each splicing variant of MUC1, using the specimen from surgically resected oral squamous cell carcinoma. The expression level and proportion of MUC1 splicing variants showed a huge variety in each specimen. The specific splicing variants may play a critical role for progression of OSCC and these might be the target of OSCC therapy in the future.

研究分野：口腔外科

キーワード：口腔癌 ムチン スプライシング MUC1

## 1. 研究開始当初の背景

2001年のヒトゲノムプロジェクトの概要の発表により、十数万程度と予測されていたヒトの遺伝子の総数は25,000~35,000に過ぎないことが明らかになり、予想以上に少ない遺伝子が多数の多様なタンパク質を生み出していることが判明した。また2001年、全遺伝子の約7割が選択的スプライシングを受けており、この機構がヒトのタンパク質の多様性を生み出す原因の一つであることが明らかになった。また近年、ヒト癌において、転写因子や細胞接着、シグナル伝達などに関わる多数の重要な蛋白質がスプライシング異常を起こしていることが報告され、スプライシング異常の結果産生された異常バリエーションは治療のターゲットとなりうる可能性が示唆されている。われわれは既に、口腔癌において、MUC1を含む膜型ムチンの異常高発現がリンパ節転移の危険因子になり、さらに予後不良と相関する傾向にあることを見いだしている。

さらにわれわれはMUC1遺伝子のスプライシングバリエーションの発現を、RT-PCRや独自開発したスプライシング特異的マイクロアレイを用いて検出する方法を開発し、ヒト消化器癌においてこれらが異常発現することを確認した。しかし、口腔癌において癌関連遺伝子のスプライシング異常を検討した報告は少なく、特にMUC1遺伝子に関する報告は行われていない。これらのことから、MUC1遺伝子スプライシング異常と口腔癌の発癌・転移・予後などの関連性の検討が今後の推進すべき重要な研究課題と思われ、今回の着想に至った。

## 2. 研究の目的

口腔顎顔面領域の悪性腫瘍は、その解剖学的位置から比較的発見しやすい部位に発症する。しかし早期の口腔癌などはしばしば自覚症状が乏しく、大きくなるまで放置される傾向があり、早期発見・治療という点では必ずしも満足できる現状にあるとは言えない。また口腔癌は、比較的早い時期から顎骨などの隣接組織に浸潤拡大しリンパ節転移をきたすことがあり、これらは予後不良の原因となる。このような背景から、口腔癌の病態に直接関与し、早期発見や治療方針の決定に有用であり、かつ治療のターゲットとなる強力な分子マーカーの登場が待たれている。真核生物において、mRNA前駆体からイントロンを除去しエキソン同士をつなぎ合わせるスプライシングは、遺伝子発現に必須な過程で

ある。高等真核生物では、多くの遺伝子が多数のエキソンから構成され、その組み合わせにより複数種類の遺伝子産物を産生する(=選択的スプライシング)。また近年、悪性腫瘍を含むヒト疾患において、いくつかの蛋白質は異常な選択的スプライシング(=スプライシング異常)によってその機能が変化しているとの報告が増えつつある。MUC1は数種類存在する膜型ムチンのひとつで、細胞表面に発現し細胞接着や細胞増殖に関与する。消化器系を中心としてヒトの多くの悪性腫瘍に異常発現し、予後不良因子として広く認識されており、また治療のターゲットとして多くの臨床試験が進められている。さらにMUC1遺伝子には数十種類のスプライシングバリエーションが確認されており、特にそのうちのいくつかのバリエーションは膀胱癌などのヒト悪性腫瘍において異常に高発現していることが報告されている。そこで今回我々は、口腔癌におけるMUC1遺伝子のスプライシング異常の検出を行い、浸潤・転移・予後などの臨床病理学的事項との関連について検討し、その結果を早期発見および治療方針の決定へ反映し、また分子標的治療のターゲットを見いだすことで、治療成績の向上に寄与することを目的とした。

## 3. 研究の方法

まず、1992年から2008年までに当科を受診した口腔扁平上皮癌206例を対象とし、これらの症例の臨床病理学的事項を検索するとともに予後を追跡調査し生存率を算出した。MUC1およびMUC4の発現は免疫組織化学的に検討した。抗体はそれぞれモノクローナル抗体を使用し、通法通り行った。その後、陽性であった腫瘍細胞の腫瘍全体に占める割合をカウントし、5%以上の発現を発現陽性群とした。その後膜型ムチンの発現と臨床病理学的事項、特に予後との関連性を統計学的に解析した。

口腔癌細胞株におけるMUC1スプライシングバリエーションの発現状況を検討した。細胞からmRNAを抽出し、独自に設計したプライマーを用いて、RT-PCRまたはリアルタイムRT-PCRにて発現状況を検索した。良好な結果が得られたため、この予備実験で得られたプロトコルを臨床検体にも使用することとした。

次に、インフォームドコンセントを得られた患者の摘出腫瘍および口腔含嗽液を採取し、RT-PCRにてMUC1スプライシング異常の検出を行った。実験の至適条

件を決定以後、( )原発腫瘍における MUC1 遺伝子のスプライシング異常と再発・予後などを含む臨床病理学的パラメータとの関連を評価し、実際に腫瘍マーカーや治療方針決定の指標となり得るか否かを明らかにする。さらに、( )転移との関連性を検討するために《原発腫瘍vs 転移巣》において MUC1 スプライシング異常の相違を検討する。また、( )発癌のリスクファクターや早期発見のための腫瘍マーカーとして使用できる異常バリエーションを見つけるために《正常歯肉vs 前癌病変vs 口腔癌》での比較も行う。

#### 4. 研究成果

われわれはまず、口腔癌症例の組織を用いて MUC1 および MUC4 ムチンの発現を検索し、臨床病理学的事項との関連性を検討することで、これらの膜型ムチンの多くのバリエーションを含む包括的なタンパクレベルでの発現が口腔扁平上皮癌の予後予測因子になりうるか 200 例以上の切除組織を用いて検討した。その結果、膜型ムチンである MUC1 および MUC4 の過剰発現は、口腔扁平上皮癌の新しい有意な予後予測因子であることを明らかにした (Int J Cancer. 2012, Cancer. 2012.)。また、MUC1 と MUC4 を組み合わせた指標はそれぞれを単独で分析するよりも鋭敏に OSCC 症例の予後を予測しうるということが明らかになった (Int J clin oncol 2015)。また MUC1 の発現は抗癌剤耐性とも関連することが明らかになった (未発表)。その後、口腔癌細胞株や切除組織を用いて、MUC1 ムチンの数多く存在するスプライシングバリエーションに対し個別の検討を開始した。その結果、それぞれの細胞株や症例により、MUC1 発現バリエーションの種類およびその比率は大きな相違があることが明らかになった。今後は症例数を増やしたのち統計解析を行い、口腔癌の予後不良因子である MUC1 のうち、直接的に予後に関連し治療の標的となりうるバリエーションを見いだしていく予定である。

#### 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 件)

Kamkawa Y, Kanmura Y, Hamada T, Yamada N, Macha MA, Batra SK, Higashi M, Yonezawa S, Sugihara K. Combination of MUC1 and MUC4 expression predicts clinical outcome in patients with oral squamous cell carcinoma *Int J Clin Oncol* 2014. 査読あり

浜田倫史、野村昌弘、上川善昭、杉原一正 口腔扁平上皮癌における MUC1 ムチン上の DF3 エピトープの発現は腫瘍悪性度、後発リンパ節転移および予後不良と関連する 日本口腔外科学会雑誌 60 巻 4 号、2014

Tomofumi Hamada, Tsunenobu Wakamatsu, Mayumi Miyahara, Satoshi Nagata, Masahiro Nomura, Yoshiaki Kamikawa, Norishige Yamada, Surinder K. Batra, Suguru Yonezawa, Kazumasa Sugihara. MUC4: a novel prognostic factor of oral squamous cell carcinoma. *International Journal of Cancer*. 5;130(8):1768-76. 2012. 査読有り

Tomofumi Hamada, Masahiro Nomura, Yoshiaki Kamikawa, Norishige Yamada, Surinder K. Batra, Suguru Yonezawa, Kazumasa Sugihara. DF3 epitope expression on MUC1 Mucin is Associated with Tumor Aggressiveness, Subsequent Lymph Node Metastasis and Poor Prognosis in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Cancer* 118: 5251-64, 2012. 査読有り

Satoshi Nagata, Tomofumi Hamada, Norishige Yamada, Seiya Yokoyama, Sho Kitamoto, Yuji Kanmura, Masahiro Nomura, Yoshiaki Kamikawa, Suguru Yonezawa, Kazumasa Sugihara. Aberrant DNA methylation of tumor-related genes in oral rinse: A noninvasive method for detection of oral squamous cell carcinoma. *Cancer* 118: 4298-4308 2012 査読有り

Takanobu Kusumoto, Tomofumi Hamada, Norishige Yamada, Satoshi Nagata, Yuji Kanmura, Izumi Houjou, Yoshiaki Kamikawa, Suguru Yonezawa, Kazumasa Sugihara. Comprehensive Epigenetic Analysis Using Oral Rinse Samples: A Pilot Study. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2012. 査読有り Jun;70(6):1486-94.

[学会発表](計 3 件)

浜田倫史 前癌病変症例の含嗽液におけ

る癌抑制遺伝子群DNAメチル化の検討 第58  
回(公社)日本口腔外科学会総会学術大会・  
2013.10.13 (福岡市)

Hamada T., et al. Aberrant DNA  
Methylation of Tumor-Related Genes In Oral  
Rinse: A Noninvasive Method for  
Detection/Screening of Oral Squamous Cell  
Carcinoma 10th Asian Congress on Oral and  
Maxillofacial Surgeons, 2012.11.17  
(Bali)

浜田倫史 シンポジウム2・口腔癌の診断  
と治療戦略 基礎そして臨床から - 口腔癌の  
先端研究に基づいた近未来的治療戦略につ  
いて - 「口腔外科の立場から」第67回(NPO法人  
)日本口腔科学会学術集会 2012.5.24 宇都宮  
市

#### 6 . 研究組織

##### ( 1 ) 研究代表者

浜田 倫史 (HAMADA Tomofumi)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・

助教

研究者番号 : 00444894