

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24792255

研究課題名(和文) 口腔癌の上皮間葉移行に伴うエピジェネティックな変化を指標とした新規治標的の検索

研究課題名(英文) New therapeutic target associated with epigenetic changes with epithelial-mesenchymal transition of oral cancer

研究代表者

葭葉 清香 (Yoshihara, Sayaka)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：60555358

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)：口腔扁平上皮癌細胞に、TGF- β 刺激により上皮間葉移行(EMT)を誘導することに成功した。TGF- β 刺激によりEMTを誘導し、上皮型マーカーであるE-cadherinと、間葉型マーカーの指標であるN-cadherinの発現をRNAレベルにてreal time PCR法を用いて解析したところ、E-cadherinの減弱と、N-cadherinの増強が確認できた。また、網羅的なDNAメチル化解析からEMTによる形質変化によってメチル化が誘導される遺伝子としてGPR-37を、脱メチル化が誘発されるLOM2、PALLDを同定した。

研究成果の概要(英文)：We were able to induce the epithelial-mesenchymal transition and (EMT) by TGF- β stimulation in oral squamous cell carcinoma cells. It induces EMT by TGF- β stimulation, and the attenuation of E-cadherin, enhancement of N-cadherin could be confirmed. From exhaustive DNA methylation analysis, we identified GPR-37 as a gene that is induced methylation, and LOM2 and PALLD as genes that are induced hypomethylation by transfoemation change by EMT.

研究分野：腫瘍分子生物学

キーワード：口腔扁平上皮癌 上皮間葉移行 DNAメチル化

1. 研究開始当初の背景

Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT; 上皮間葉移行)とは、上皮細胞が間葉系細胞に形態変化する現象である。癌細胞が EMT を獲得すると未分化性を維持し、幹細胞様の性質を有するようになる。さらに運動性が増し、周囲の間質に浸潤しやすくなる。その結果、血管内やリンパ管内へ浸潤し全身に広がっていくと推測されている。申請者は口腔扁平上皮癌の EMT にエピジェネティックな変化が関与しているとの仮説を立てた。すなわち、EMT に伴い、メチル化の異常などによって発現が変化する分子を明らかにすることで、悪性度のマーカーになるとともに、浸潤・転移ならびに治療抵抗性の克服につながる新たな治療標的分子の検索を行う事を目的とする。

2. 研究の目的

本研究では、EMT のモデルシステムを構築し、網羅的な DNA メチル化の解析を行い間葉系形質の獲得に伴うエピジェネティックな変化の推移を明かにする。すなわち、上皮間葉移行に伴うエピジェネティックな異常からみた浸潤・転移・治療抵抗性の分子標的の検索を行う。同定された標的分子に関しては臨床組織においてもその遺伝子の発現レベルを確認し、実際の臨床情報との相関を検討する。さらに同定した候補遺伝子は機能解析を行い、分子生物学的な癌制御についても検討することを目的とした。

3. 研究の方法

今回我々は癌の背景粘膜の段階から蓄積される口腔癌のエピジェネティックな異常に着目し、分子レベルでの口腔癌の超早期診断マーカーを確立する事を目的とした。つまり、種々の外部環境刺激に誘発される異常メチル化遺伝子の比較、担癌患者と非担癌患者の口腔粘膜におけるメチル化の比較、候補遺伝子の機能解析、候補遺伝子の超早期診断マーカーとしての有用性の検討を行うこととした。

[平成 24 年度]

1) 口腔扁平上皮癌細胞株を用いた EMT モデルシステムの構築

口腔扁平上皮癌細胞株として、SCC4, SCC9, SCC66, UM1, 1483, NA, HSC-2, HSC-3, HSC-4, SAS, CA19-9 を用い TGF- β を 5ng/ml の濃度で 3 週間添加する (post-EMT 細胞)。経時的な細胞形態を観察する。TGF- β にて EMT を誘導後 3 週間後の細胞の細胞増殖能について観察する。また、浸潤能については Invasion chamber (BD 社) を用いて検討する。比較対象としては TGF- β によって EMT を誘導する前の細胞を用いる (pre-EMT 細胞)。

2) EMT 誘導後の口腔扁平上皮癌細胞の形質

の検討

pre-EMT 細胞、post-EMT 細胞より RNA を抽出し、cDNA を合成する。上皮型マーカーの指標である E-cadherin と、間葉型マーカーの指標である N-cadherin の発現を RNA レベルにて real time PCR 法を用いて解析する。

pre-EMT 細胞、post-EMT 細胞よりタンパクを抽出する。E-cadherin と、N-cadherin の発現をタンパクレベルにて Western blot 法を用いて解析する。

BALB/c nu/nu マウス側腹部に、pre-EMT 細胞、post-EMT 細胞を (1 × 10⁵/body) 局注し、移植腫瘍モデルを作る。2 つの細胞における腫瘍形成能、転移の有無について検討する。

[平成 25 年度]

1) 上皮間葉移行誘導前、後における網羅的メチル化の解析

、pre-EMT 細胞、post-EMT 細胞より、DNA を抽出する。抽出した DNA はバイサルファイト処理を行う。その後、HumanMethylation27 BeadChip (Illumina 社)を用いて網羅的な DNA メチル化の解析を行う。

、BeadStudio Methylation Module (Illumina 社)を用いて、得られたデータを解析し EMT 誘導に伴う DNA メチル化の異常が存在するかを明らかにする。

2) 上皮間葉移行誘導前、後における遺伝子発現解析

、pre-EMT 細胞、post-EMT 細胞より、RNA を抽出する。Reverse transcription して cDNA を合成し、Human Gene 1.0 ST Array を用いて遺伝子発現を解析する。

、1) における結果と統合し、遺伝子発現と相関するメチル化候補遺伝子に着目する。3) 癌幹細胞にて高頻度に異常メチル化に制御を受ける遺伝子群の検索

1)、2) から得られた結果を解析し、上皮間葉誘導に伴い高頻度にメチル化の変化を受ける遺伝子の同定を行う。DAVID website

(<http://niaid.abcc.ncifcrf.gov/summary.jsp>) を用いて異常メチル化候補遺伝子の分子生物学的機能について解析する。

[平成 26 年度]

1) 候補遺伝子のバリデーション

候補遺伝子のメチル化について Bisulfite-sequencing 法を用いて結果の検証を行う。解析結果が HumanMethylation27 BeadChip における解析結果を反映するものであるかを確認する。

2) 候補遺伝子の機能解析

同定された候補遺伝子を口腔扁平上皮癌細胞株にレトロウイルスベクターを用いて強制発現

させる。細胞増殖、抗癌剤 (5-FU、CDDP、タキソテール) に対する影響を MTT アッセイを用いて検討する。転移能については、Migration assay を用いて検討する。候補遺伝子の生物学的機能について意味付けする。

3) 研究の総括

得られた結果を学会にて成果発表し、論文作成を行う。

4 . 研究成果

1) 口腔扁平上皮癌細胞株を用いた EMT モデルシステムの構築

口腔扁平上皮癌細胞である、HSC3、HSC4、SCC111 を用いて TGF- 添加により EMT 誘導を試みたところ、細胞形態の変化が観察された。また、細胞増殖能については、TGF- 添加群、非添加群のどちらにおいても変化がなかったが、浸潤能については TGF- 添加により亢進することが確認できた。

2) EMT 誘導後の口腔扁平上皮癌細胞の形質の変化の検討

口腔扁平上皮癌細胞に TGF- 刺激により EMT を誘導し、上皮型マーカーである E-cadherin と、間葉型マーカーの指標である N-cadherin の発現を RNA レベルにて real time PCR 法を用いて解析したところ、E-cadherin の減弱と、N-cadherin の増強が確認できた。

3) 上皮間葉移行誘導前、後における網羅的メチル化の解析

TGF- 刺激により EMT を誘導した口腔扁平上皮癌細胞より、DNA を抽出しバイサルファイト処理を行った後、HumanMethylation27 BeadChip (Illumina 社) を用いて網羅的な DNA メチル化の解析を行った。BeadStudio Methylation Module (Illumina 社) を用いて、得られたデータを解析したところ、EMT による形質変化によってメチル化が誘導される遺伝子として GPR-37 を、脱メチル化が誘発される LOM2、PALLD を同定した。

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 2 件)

A case of odontogenic infection involves infratemporal and temporal fossa due to apical periodontitis of upper left second molar

Sayaka Yoshiba, Takaaki Kamatani, Tatsuo Shiota

Indian Journal of Dentistry 2015 年 [査読有り]

Primary minor salivary gland salivary duct carcinoma at palate: A radiological investigation and review of the literature
Sayaka Yoshiba, Takaaki Kamatani, Daisuke Soga, Sunao Shioyama, Tomohiko Kutsuna, Satoru Shintani

Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology 26(3) 356-358
2014 年 7 月 [査読有り]

[学会発表](計 2 件)

口腔内転移を認めた乳腺悪性葉状肉腫の 1 例

葭葉 清香、渡辺 仁資、代田 達夫

第 33 回 日本口腔腫瘍学会 奈良 2015 年 1 月 29 日

昭和大学横浜市北部病院歯科・歯科口腔外科開設後 3 年間における患者の臨床統計学的観察

葭葉清香、宮久保あや子、湯浅研、木村有子、正司めい、渡辺一葉、鈴木麻衣子、渡辺仁資、代田達夫

第 59 回 日本口腔外科学会 千葉 2014 年 10 月 17 日

[図書](計 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：
出願年月日：
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

葭葉 清香 (YOSHIBA SAYAKA)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：60555358

(2)研究分担者 ()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：