

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 28 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463108

研究課題名(和文) 臨床癌組織の遺伝子発現解析により口腔扁平上皮癌の遠隔転移の分子機構を解明する

研究課題名(英文) Identification of molecular mechanisms of distant metastasis of oral squamous cell carcinoma using the gene expression analysis of clinical cancer tissues

研究代表者

永田 昌毅 (Nagata, Masaki)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：10242439

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：遠隔転移する悪性度の高い口腔扁平上皮癌(DM)と頸部局所転移性の同癌(LM)についてマイクロアレイ解析を行った。クラスター解析ではDMとLMが比較的明瞭に区別され、主成分分析では第2主成分でDMとLM群の間に分散が見られた。GO解析でDMの遺伝子上昇側ではDNAメチレーション、染色体、核などに関連するTermが数多く、発現低下側ではepidermal cell、skinおよびkeratinocyteなど上皮分化のTermが多く抽出された。

研究成果の概要(英文)：High malignancy oral squamous cell carcinomas with distance metastasis (DM) and carcinomas with localized cervical lymph node metastasis (LLM) were subjected to microarray analysis. DM and LLM were relatively clearly discriminated by cluster analysis, and the both groups demonstrated wide distribution on the second component in primary component analysis. Much number of genes related to DNA methylation, chromosomal function, and nuclear showed upregulation with DM, and many of genes related to the epithelial differentiation are mainly found in the down regulated gene group with DM.

研究分野：口腔外科

キーワード：口腔扁平上皮癌 マイクロアレイ 遺伝子発現解析 遠隔転移

1. 研究開始当初の背景

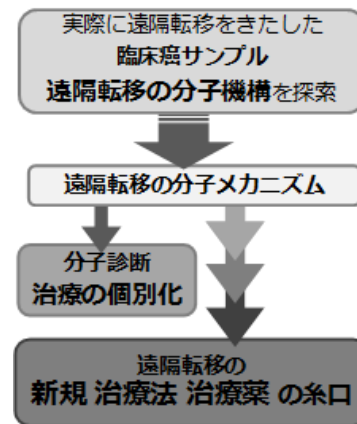
遠隔転移のメカニズム：多様な癌腫において、循環血流に放出された癌細胞 (circulating tumor cells) は機械的、酸化作用、接着喪失依存性、および免疫作用によって即座に細胞死に至る。口腔扁平上皮癌 (OSCC) の遠隔転移は口腔の癌病巣から放出された癌細胞がこの細胞死 Anokis に陥らず、着床した遠隔組織内で生存・増殖することにより成立する。そのためには癌細胞が固有の細胞間質との結合を失った状態でなおも生存 (不死化) し、増殖を繰り返す新たな能力の獲得が必須の条件である。

癌細胞が不死化 (Anokis resistance) して遠隔転移する過程にはエネルギー代謝、自己溶解、酸化ストレス、成長因子受容体や細胞接着の制御、上皮間葉移行など多様な細胞生物学的機構の関与があげられている。それぞれの機構に関する実験系の研究が多数出版され、多様な知見が提示されている。一方で、実際の臨床癌からの細胞の不死化や遠隔転移の分子機構に関する、統合的な解析は進んでいないのが現状である。これが遠隔転移に対する効果的な治療の臨床応用が進まない所以である。口腔扁平上皮癌において遠隔転移は孤発性と局所再発続発性を含めるとその頻度は約 10% 近くに達し、制御不能状態の OSCC の概ね 60% に見られ、制御不能による死亡の直接的原因である。したがって、遠隔転移の生物学的原因解明と有効な制御法や薬の新規開発は、OSCC の生存率改善において大きな意義がある。

私たちは過去 10 年以上におよび、マイクロアレイとリアルタイム PCR による OSCC の遺伝子発現解析をおこない、インテグリン 3 と 4 遺伝子の発現レベルが遠隔転移を高い確度 (4 人に一人) で予測することを見出した。この結果は、臨床的な有用性だけでなく、既知の癌細胞生物学的な知見と多くの整合性を示している。しかし、これは 2001 年当時のマイクロアレイ解析から得られた癌関連遺伝子 mRNA の発現情報によるものであった。現行の miRNA、lincRNA など non-coding RNA を含めたトランスクリプトームの解析が、遠隔転移の生物学的メカニズムの統合的解明にはやはり必須である。

2. 研究の目的

遠隔転移をきたしたまとまった数の口腔扁平上皮癌の臨床サンプルを用いて、non-coding RNA を含むトランスクリプトームレベルのマイクロアレイ遺伝子発現解析を行う。それにより抽出される遠隔転移と共に動く遺伝子発現、加えて、接着依存性細胞死耐性 (Anokis) と上皮間葉移行 (EMT) に関わる分子機能の分析を癌組織に対し行う。これらを糸口とする遠隔転移の生物学的メカニズムの解明から、高精度の分子診断法の構築、同時に遠隔転移阻止に有効な分子標的など、新しい治療法のシーズ探索を意図する。



臨床の場で最も苦慮する OSCC が示す 2 種類の転移様式：リンパ行性転移と血行性転移のリスクを鑑別する技術は存在しない。マイクロアレイ解析による網羅的探索に加え、Anokis 耐性や EMT に関与する E-カドヘリン、Snail、Twist、ピメンチン、カドヘリン-11、N-カドヘリン、CD146、TGF、EGF、VEGF とともに、自研究で悪性化に関与することが示されたインテグリン-3-4、カテニン、カテニンと共に、実際の臨床癌転移の背景において、遺伝子発現様相を解析し、Anokis 耐性と EMT が遠隔転移にいかに関わるかを検討する。

化学療法や癌ワクチン療法は転移巣が臨床的に顕在化する以前の微小転移に対するとき最も効果的といわれている。近年の化学療法にせよ、癌免疫療法にせよ、効果は限定的であり、臨床的に顕在する転移癌を形成してからでは根治的制御は極めて困難である。本研究は顕在化以前の血行性微小転移の正確な診断を可能にし、抗癌剤、分子標的治療、免疫療法のいづれにおいても、早期の潜在的微小転移を予測した遠隔転移の早期予防的制御を実現することを目的にした。同時に、遠隔転移に関わる分子メカニズムの同定は診断精度の向上にとどまらず、新規治療標的の同定の糸口とすることも目的とした。

3. 研究の方法

マイクロアレイ発現解析：

【DM 群】遠隔転移を生じた口腔扁平上皮癌 (OSCC) 組織 と 【LM 群】頸部リンパ節転移を生じたが遠隔転移を生じなかった OSCC 組織 について 網羅的遺伝子発現解析を行った。

口腔扁平上皮癌の癌組織 mRNA 発現のマイクロアレイ解析

- ・ 保有する扁平上皮癌試料ライブラリーから、遠隔転移群 15 症例と非遠隔転移群 18 例を選定し、キャピラリー電気泳動で RNA のクオリティチェックを行った。その結果 DM 群 11 症例、LM 群 13 症例がマイクロアレイ解析に進むクオリティであることが判定された。
- ・ 分析受託企業に検体 totalRNA を送付、マイクロアレイ発現解析 (SurePrint G3 Human GE 8x60K Microarray (一色法)) を実施した。
- ・ マイクロアレイ解析のデータのセットアップ

プと素分析：マイクロアレイ解析の全データ 13 症例からなる基礎データを作成した。マイクロアレイの素データのフィルタリング：無効な遺伝子データを除外した（低検出もしくは低発現）。

・マイクロアレイデータの解析：全データの正規化を実施し、75 パーセントシルフトでアレイ間のゆらぎを補正した。素分析：有効データを示したすべての遺伝子について、DM 群と LM 群の間の Fold Change (FC) が 2.5 倍までのものを選出した。

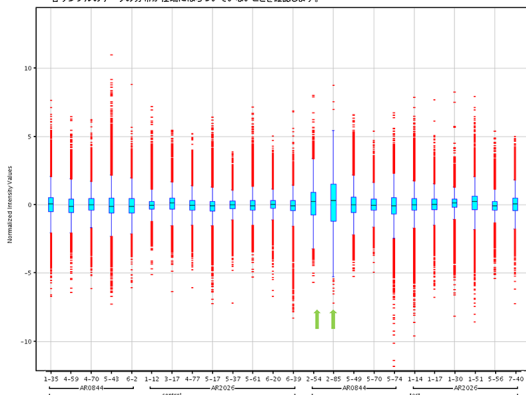
・網羅的遺伝子発現情報の統計解析（探索的解析） U-test、群間比較解析（t 検定）、クラスター解析、主成分分析、Significance Analysis of Microarrays (SAM)、gene ontology 解析（Biological Process / Molecular Function / Cellular Component）を実施した。

4. 研究成果

素データのフィルタリング、全データの正規化を実施し、75 パーセントシルフトでアレイ間のゆらぎを補正した、比較可能なデー

解析データ

BoxPlot
有効プロブの遺伝子発現データ分布
マイクロアレイデータの分布を視覚的に表現したグラフです。
各サンプルのデータの分布が横軸にはらついていないことを確認します。



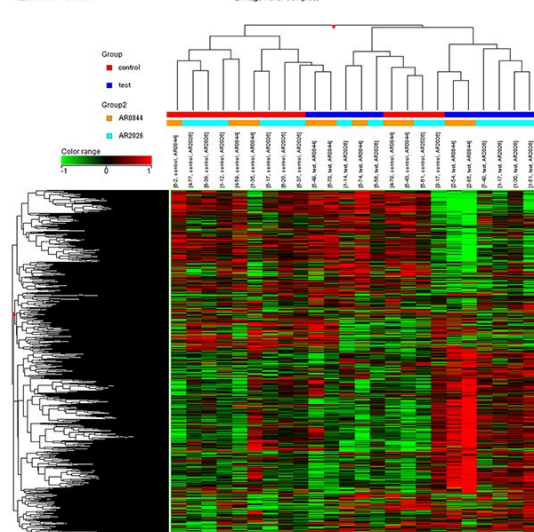
タを形成した。概ね良好なデータセットが得られた。

クラスター解析の結果においては DM 群と LM 群がある程度の法則性で分別されている。

解析データ

階層的クラスタリング(クラスター解析)
距離法の条件
実行日の違いによるデータのずれをparmlにて補正したデータセット

有効プロブのデータセットを使ったサンプル方向の階層的クラスタリング結果
クラスタ解析の条件
Similarity Measure: Pearson-Centered
Linkage Rule: Complete

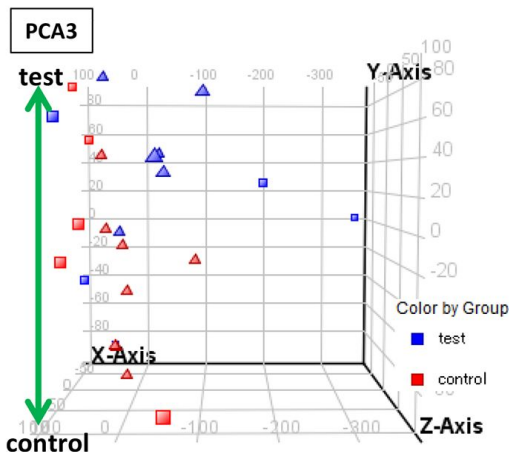


これは遠隔転移の有無が大まかであるがながしかの遺伝子発現パターンを示すこと素示している。適切が遺伝子セットの絞りこみができる可能性がある。

主成分分析の結果、第四主成分までを考慮すると test 群と control 群に分かれる傾向がみられた。第一主成分(X 軸)でデータが幾分外れてしまう傾向のある # 2-54 と # 2-85 も基本的には他の test 群と同じ傾向を示した。

寄与率は全般に高いものでは無かったが、第 2 主成分において DM 群と LM 群の間で傾向が

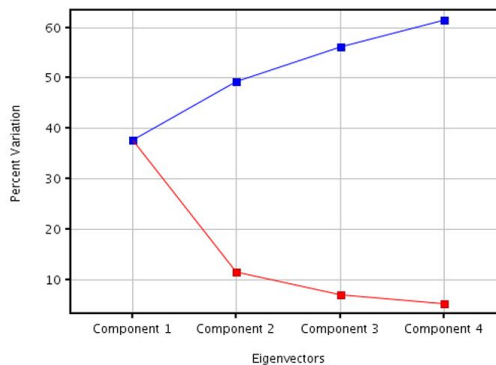
X軸: 第一主成分
Y軸: 第二主成分
Z軸: 第四主成分



寄与率

Color by Variation
■ actual
■ cumulative

Component 1 (37.74%)
Component 2 (11.5%)
Component 3 (7.01%)
Component 4 (5.34%)



みられており、予測因子として有効な遺伝子の発現傾向が存在することを示している。

GO 解析では多くの示唆が得られた。検定実施後、WAD の順位順にデータをソートし、SAM および WAD と順位が 2000 位以内のデータを統計的に有意なデータセットとして抽出した。さらに、そのデータセットの発現比を算出し、発現比が 1.5 倍以上 up または down した遺伝子リストに対し GO 解析を行った。GO 解析の結果、遠隔転移に伴う up 側では DNA メチレーション、染色体、核などに関連する Term が数多く多様性がみられた。また、遠隔転移に伴う down 側では epidermal cell、skin および keratinocyte 関連の Term が多く

抽出された。

これらの結果をベースにして、今後は各要素をさらに深く掘り下げていくことによって遠隔転移に関係する多様な分子機構を抽出していくことができる。

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 3 件)

1. Nagata M, Kurita H, Uematsu K, Ogawa S, Takahashi K, Hoshina H, Takagi R. Diagnostic value of CDK/CDK inhibitor expression ratios as biomarkers of locoregional and hematogenous dissemination risks in oral squamous cell carcinoma. Mol Clin Oncol. 3: 1007-1013, 2015 PMID: 26623041 Published online 2015 Jun 10. doi: 10.3892/mco.2015.578

2. Miyota S, Kobayashi T, Abé T, Miyajima H, Nagata M, Hoshina H, Kobayashi T, Takagi R, Saku T. Intraoperative assessment of surgical margins of oral squamous cell carcinoma using frozen sections: a practical clinicopathological management for recurrences. Biomed Res Int. 2014;2014:823968. doi: 10.1155/2014/823968. PMID: 25050372

3. Nagata M, Noman AA, Suzuki K, Kurita H, Ohnishi M, Ohyama T, Kitamura N, Kobayashi T, Uematsu K, Takahashi K, Kodama N, Kawase T, Hoshina H, Ikeda N, Shingaki S, Takagi R. ITGA3 and ITGB4 expression biomarkers estimate the risks of locoregional and hematogenous dissemination of oral squamous cell carcinoma. BMC Cancer. 2013 ;13(1):410. doi: 10.1186/1471-2407-13-410. PMID: 24006899

【学会発表】(計 3 件)

1. 近藤英司, 栗田 浩, 山田慎一, 永田昌毅, 柴原孝彦. GCP に準拠した多施設共同 Randomized control trial の実際 ~ 臨床研究支援センターとの連携 ~. 第 34 回一般社団法人日本口腔腫瘍学会総会・学術大会, ワークショップ 2 共同研究に向けて横浜市開港記念会館(横浜市) 2016 年 1 月 21 日

2. 永田昌毅, 柴原孝彦, 栗田 浩, 高木律男, 口腔癌個別化研究会 「高播種性口腔扁平上皮癌の個別化補助化学療法のランダム化比較試験」. 第 33 回日本口腔腫瘍学会. 奈良県新公会堂(奈良市) 2015 年 1 月 29 日.

3. 永田昌毅, 栗田 浩, 高木律男, 小泉知展, 西條康夫. 高播種性口腔扁平上皮癌の個別化補助化学療法のランダム化比較試験. 新潟癌治療研究会 チサンホテル(新潟市) 2014 年 7 月 26 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕ホームページ等
特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永田 昌毅

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号: 10242439

(2) 研究分担者

星名 秀行

新潟大学・医歯学総合病院・講師

研究者番号: 30173587

(3) 連携研究者

北村 信隆

新潟大学・医歯学総合病院・特任教授

研究者番号: 90224972