

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861950

研究課題名(和文) 口腔癌における染色体領域増幅の分子細胞学的意義に関する検討

研究課題名(英文) Molecular cytogenetic study of chromosomal amplification in oral cancer

研究代表者

内田 堅一郎 (UCHIDA, Kenichiro)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20379986

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：染色体の増幅が生じる領域に位置する遺伝子の中で口腔扁平上皮癌に高発現している遺伝子を検索し、8番染色体および11番染色体における増幅の生物学的役割を明らかにすることを目的として行った。11q13領域に位置する16遺伝子および8q24.3領域に位置する8遺伝子の発現を網羅的にスクリーニングした。11q13領域では3遺伝子を候補遺伝子として選定したが、8q24.3領域では候補遺伝子を選定できなかった。遺伝子の増幅と発現の関係を検討したところ、1遺伝子が相関関係を認めた。同遺伝子の増幅は口腔扁平上皮癌症例50例中13例に生じており、同遺伝子は口腔扁平上皮癌の進展に関わっていると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to investigate the biological role of chromosomal amplification in chromosome 8, and 11 and to clarify the genes canditating with amplification of these chromosomal region with over-expression in oral squamous cell carcinoma (OSCC). We comprehensively screened gene expression of 16 genes in 11q13 and 8 genes in 8q24.3. Three genes were identified as candidate gene in 11q13 and no gene associated in 8q24.3. The gene amplification correlated with the over-expression in 1 of 3 genes in 11q13. Amplification of this gene was observed in 13 of 50 OSCC cases. This result suggests that the gene relates with the development of OSCC.

研究分野：外科系歯科学

キーワード：癌 ゲノム 細胞・組織

1. 研究開始当初の背景

口腔扁平上皮癌のみならず多くの悪性腫瘍は、ゲノムに生じる様々な異常の積み重ねにより生じる。染色体領域の増幅は、遺伝子の発現上昇に密接に関わる異常であり、乳癌では HER2 遺伝子の増幅が乳癌の増殖に寄与しており、それを標的とした治療薬が臨床応用されている。また、HER2 遺伝子のコピー数を検討することで、がん細胞の HER2 依存性増殖の有無を検討することができる。口腔扁平上皮癌では以前より 11q13.3 領域に増幅が生じることが知られており、同領域に位置する CCND1 や FGF4 といった遺伝子が関連遺伝子として検討されてきた。また、最近の報告では、同領域に位置する TMEM16A が頭頸部癌で高発現しており、その発現抑制が頭頸部癌の制御に役立つ可能性が示唆されている。しかしながら、同領域に位置する遺伝子の口腔扁平上皮癌における役割や抑制効果を検討した報告は数が限られている。さらに、11q13.3 領域の増幅が、直接その発現上昇に関与する遺伝子は明らかではない。

われわれは口腔癌の遺伝学的解析を研究テーマの一つとして行っており、その結果を報告してきた。また、口腔扁平上皮癌症例 50 例の Array-CGH 法による DNA コピー数異常のスクリーニングと、その結果に基づいて口腔扁平上皮癌の新規予後マーカーの検索を行った。その結果の一つとして、約 20% の症例に 8q24.3 領域に位置する約 100kb の領域で増幅が生じることを発見し、免疫染色による検討で同領域にコードされている RECQL4 が癌組織で高発現していることを確認した。同領域に位置する遺伝子に関して、口腔扁平上皮癌を用いて解析を行った報告は、渉猟し得た限りでは認められない。

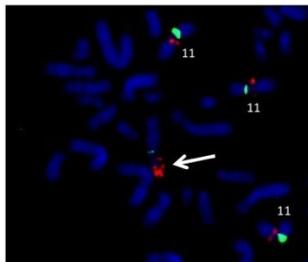


図1 11q13プローブを用いたFISH法による口腔扁平上皮癌細胞の解析
3本の正常11番染色体と、11q13の増幅を持った派生染色体が認められる(矢印)。

2. 研究の目的

本研究では、8q24.3 領域および 11q13 領域に位置する遺伝子の中から、口腔扁平上皮癌で高発現している可能性がある遺伝子を、我々が有するデータおよび文献検索の結果に基づいて選択する。選択した遺伝子に関して、細胞株および臨床検体を用いて、分子細胞遺伝学的手法を用いて検討を行い、口腔扁平上皮癌で高発現している遺伝子を

明らかにする。最終的には、データを統合することにより、8q24.3 領域および 11q13 領域の増幅の生物学的役割および口腔扁平上皮癌の新規分子標的なり得る遺伝子を明らかにすることを目的としている。

3. 研究の方法

(1)口腔扁平上皮癌細胞における 8q24.3 領域および 11q13.3 領域に位置する遺伝子の Real-time qPCR 法を用いて網羅的にスクリーニングした。われわれが以前報告した Array-CGH 法による解析結果より、遺伝子増幅が高頻度に生じている 8q24.3 領域の 8 遺伝子 (RECQL4, CYHR1, LRRC14, FOXH1, MFSD3, KIFC2, PPP1R16A, GPT) および 11q13.3 領域の 16 遺伝子 (MRPL21, FGF3, FGF4, ANO1, GAL, MRGPRF, FGF19, MIR3164, MYEOV, MTL5, ORAOV1, MRGPRD, IGHMBP2, CPT1A, TPCN2, CCND1) を検討の対象とした。また、内部標準として 3 遺伝子 (GUSB, GAPDH, ACTB) を用いた。先述の遺伝子に対する PCR プライマーセットを Integrated Genome Technology 社より購入し、実験に供した。Stratagene qPCR Standard RNA を Random Primer を用いて逆転写して得られた cDNA を用いて、PCR プライマーの定量性を検討した。すなわち、先述の cDNA を用いて連続希釈系を作成し、SYBR Green 法を用いて qPCR を行った。検量線を作成し、定量性を検証した。また、同時に解離曲線を作成し、シングルピーク (PCR 産物が単一である) であることを確認した。

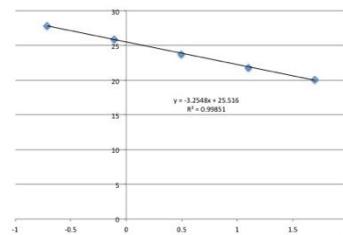


図2 連続希釈系を用いたGUSB遺伝子のPCR効率の検討
縦軸：Ct (PCRサイクル数)、横軸：テンプレート濃度
PCR効率はほぼ100%であり、相関係数0.99851と非常に高い相関を示している。

ヒト正常ケラチノサイト由来細胞株 HaCaT、口腔上皮異形成症由来細胞株 DOK、口腔扁平上皮癌由来細胞株 CA9-22, SAS, HSC2, HSC3, HSC4 を培養し、増殖期に Trizol を用いて細胞を採取し Direct-zol RNA MiniPrep kit を用いて RNA を抽出した。逆転写を行い cDNA を作成後、定量性が確認できたプライマーを用いて qPCR を行い、網羅的に 8q24.3 領域および 11q13 領域に位置する遺伝子の m-

RNA の発現レベルを検討した。
 (2)MYEOV および FGF のコピー数を Real-time PCR 法を用いて検討した。プライマーの塩基配列は、Sugahara らの報告 (Int. J. Oncol) と同じものを用いた。対象として NAGK を用いた。Promega 社の Human reference DNA を用いて、遺伝子発現の検討と同様に、連続希釈系および解離曲線を用いて、各プライマー PCR 効率および PCR 産物が単一であることを確認した。各細胞株から、DNeasy Blood and Tissue kit (QIAGEN 社) を用いて DNA を抽出した。同サンプルと口腔扁平上皮癌症例 50 例の組織から、Microdissection 法にて選択的に癌細胞を回収し抽出した DNA を用いて、qPCR を施行し上記 3 遺伝子のコピー数を検討した。各遺伝子のコピーレベルは、(Sample の NAGK の Ct-Sample の標的遺伝子の Ct) - (Human reference DNA の NAGK の Ct-Human reference DNA の標的遺伝子の Ct) を算出して決定した。0.59 を上回った場合を、標的遺伝子の増幅があると判定した。

4. 研究成果

(1)今回検討の対象とした、8q24.3 領域の中で 1 遺伝子(GPT), 11q13.3 領域の中で 4 遺伝子 (FGF3, MRGPRF, MIR3164, MRGPRD) が Stratagene qPCR Standard RNA から得られた CDNA では発現が確認できなかった。従い、8q24.3 領域は 7 遺伝子、11q13.3 領域は 12 遺伝子に関して検討を行った。

口腔扁平上皮癌由来細胞株 CA9-22, SAS, HSC2, HSC3, HSC4 および口腔上皮異形成症由来細胞株 DOK の相対的遺伝子発現レベルを、HaCaT 細胞と比較することにより相対定量した。内部標準は、細胞株間で発現レベルが一定であった GUSB を用いることとした。以降に、検討結果を Heat Map 表示して示す (10 倍以上の発現レベルを示した遺伝子は赤色で示す)。

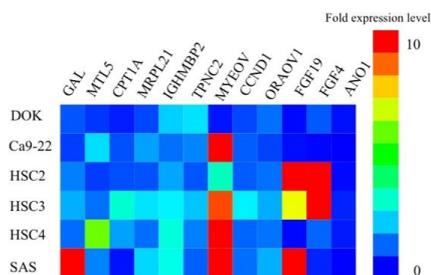


図3 11q13.3領域に位置する遺伝子の発現レベル

8q24.3 領域では、RECQL4 や FOXH1 が比較的高発現をしている細胞株を認めたが、いずれも HaCaT 細胞に対する相対的発現レベルは 3 倍以内であり、今回の検討では口腔扁平上皮癌に特異的に高発現している遺伝子をスクリーニングすることはできなかった。この結果より、8q24.3 の増幅は口腔扁平上皮癌では高頻度に認めるものの、同領域に位置する遺

伝子は Epigenetic な変化等によりサイレンシングされている可能性が考えられた。

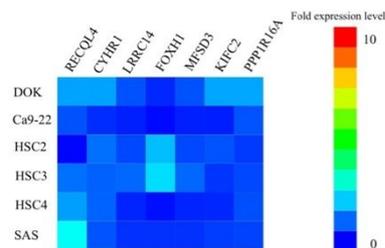


図4 8q24.3に位置する遺伝子の発現レベル

11q13.3 領域では、ANO1, MRPL21, CCND1 および CPT1A が口腔扁平上皮癌由来細胞株で高い発現レベルを示していたが、HaCaT 細胞も同様に高いレベルで発現しており、両者の相対的レベルは図 4 の様に差が無かった。ANO1 と CCND1 は口腔扁平上皮癌で高発現することが報告されているが、これは癌細胞に特異的な変化では無く、細胞の増殖能を反映していると考えられた。HaCaT 細胞との相対的定量では、MYEOV, FGF19, FGF4 が口腔扁平上皮癌由来細胞株で発現上昇していた。さらに、同 3 遺伝子は DOK 細胞で発現が HaCaT 細胞と比較して同程度または低下していた。従い、同 3 遺伝子を 11q13.3 領域の増幅に関連した候補遺伝子として検討を行うこととした。

(2)MYEOV, FGF4 および NAGK に対するプライマーはいずれも PCR 効率はほぼ 100% であり、解離曲線はシングルピークであった。細胞株における検討では、MYEOV, FGF4 とともに HaCaT, DOK, HSC2 および SAS では増幅は認めなかったが、CA9-22, HSC3 および HSC4 では増幅を認めた。各遺伝子の増幅と発現レベルの関係を検討するために、両者の直接相関を Spearman の順位相関係数を用いて検討したが、統計学的有意に相関する遺伝子は認めなかった。しかしながら、MYEOV では CA9-22 で 118.6 倍、HSC3 で 9.3 倍、HSC4 で 95.2 倍と増幅を検出したすべての細胞株において、HaCaT 細胞よりも高発現していた。FGF4 では CA9-22 で 0.1 倍、HSC3 で 10.7 倍、HSC4 で等倍と増幅を検出した細胞株で、FGF4 の高発現を検出した細胞株は HSC3 のみであった。FGF19 では CA9-22 で 0.1 倍、HSC3 で 7.3 倍、HSC4 で 0.1 倍と増幅を検出した細胞株で、FGF19 の高発現を検出した細胞株は HSC3 のみであった。MYEOV の遺伝子増幅有する細胞株で、発現上昇を検出したため、臨床検体を用いてさらなる検討を行うこととした。

図5 MYEOV遺伝子の発現レベルと遺伝子増幅の関係の検討

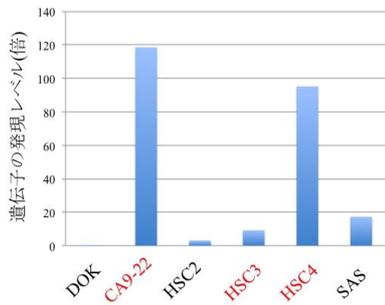


図6 FGF4遺伝子の発現レベルと遺伝子増幅の関係の検討

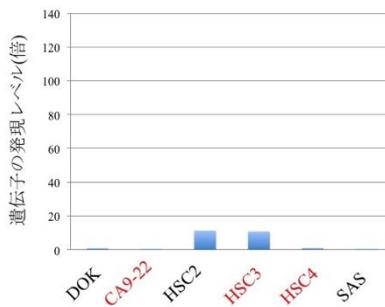
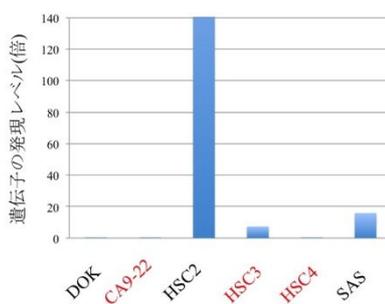
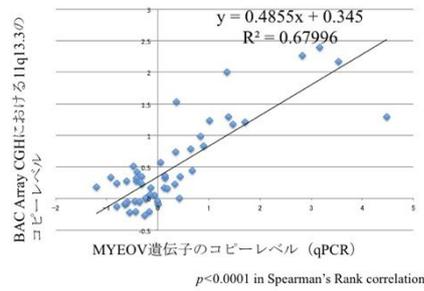


図7 FGF19遺伝子の発現レベルと遺伝子増幅の関係の検討



口腔扁平上皮癌症例 50 例に対して MYEOV のコピー数を qPCR を用いて検討した。増幅を有する症例は 13 例であった。さらに、BAC array CGH の解析結果と、MYEOV 遺伝子のコピーレベルの関係を比較した。BAC array CGH の解析結果は Oncol rep. 2011 に報告済みであり、4000 個の BAC chip が搭載された Array による解析結果である。そのうち、今回の検討の対象となった 11q13.3 の遺伝子が搭載されているプローブ Plate No. 124 の信号強度を各サンプルにおける 11q13.3 領域のコピーレベルとして検討に用いた。11q13.3 領域のコピー数と MYEOV のコピー数は $R^2 = 0.67996$ と高い相関関係を示した。従い、MYEOV のコピー数は口腔扁平上皮癌において 11q 領域に高頻度に生じる HSR 型の染色体再構成に付随してコピー数が変化していると考えられる。

図8 BAC Array CGHにおける解析結果とMYEOV遺伝子のコピーレベルの関係



MYEOV のコピーレベルと臨床病理学的因子の関係を検討した。TNM 分類および Stage において高値を示す傾向にあったが、Wilcoxon の順位検定では、有意差は無かった。この結果は、MYEOV の増幅が発生初期から関与している Subgroup が口腔扁平上皮癌において存在する可能性を示唆していると考えられた。

表1 MYEOV遺伝子のコピーレベルと臨床病理学的因子の関係について

	MYEOV $\Delta\Delta CT$ Mean	Statistical test	
T	1, 2	0.09	N.S
	3, 4	0.71	
N	(-)	0.09	N.S
	(+)	0.51	
Stage	I, II	0.12	N.S
	III, IV	0.46	
Age	70>	0.13	N.S
	71<	0.45	
Sex	Female	0.24	N.S
	Male	0.36	

MYEOV は多発性骨髄腫で関連遺伝子として同定された。その後、神経芽細胞腫や大腸癌で関与が報告されている。しかしながら、MYEOV の機能は全く明らかになっていない。今後、口腔扁平上皮癌における MYEOV の役割を明らかにすることにより、悪性腫瘍における同遺伝子の機能解析を検討する予定である。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 1 件)

内田堅一郎, 竹縄隆徳, 堀永大樹, 原田耕志, 上山吉哉, 口腔扁平上皮癌における Genomic Instability と HOXA9 遺伝子のメチル化レベルの関係に対する検討, 第59回日本口腔外科学会総会・学術大会, 2014年10月17日, 幕張メッセ(千葉県千葉市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内田 堅一郎 (UCHIDA, Kenichiro)

研究者番号: 20379986