

平成 21 年 4 月 16 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007 ～ 2008

課題番号：19592332

研究課題名 (和文) ホメオボックス遺伝子を指標とした新しい口腔癌診断システムの開発

研究課題名 (英文) Development of novel diagnostic system of oral cancer by HOX gene expression profiles

研究代表者 柏崎 晴彦 (KASHIWAZAKI HARUHIKO)

北海道大学・北海道大学病院・助教

研究者番号：10344516

## 研究成果の概要：

リンパ節転移のあるヒト口腔扁平上皮癌組織で発現の高い HOXC5, HOXC6 および HOXC8 が、リンパ節転移に関与しているのかどうかを調べるために、各 HOX 遺伝子の発現プラスミドベクターを構築した。各々の HOX 遺伝子発現ベクターをヒト口腔扁平上皮癌細胞株にリポフェクション法で導入し、各 HOX mRNA および蛋白の発現を RT-PCR 法およびウエスタンブロット法で確認した。リンパ節転移に重要と考えられる癌細胞とリンパ管内皮細胞との相互作用を解析するために、ヒト皮膚から樹立されたリンパ管内皮細胞の同定を行った。現在、HOX 遺伝子を強制発現させた癌細胞のリンパ管内皮細胞への接着性ならびにリンパ管内皮細胞の培養上清に対する運動性などを検討している。

## 交付額

(金額単位：円)

|         | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2007 年度 | 1,800,000 | 540,000   | 2,340,000 |
| 2008 年度 | 1,600,000 | 480,000   | 2,080,000 |
| 年度      |           |           |           |
| 年度      |           |           |           |
| 年度      |           |           |           |
| 総計      | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：臨床腫瘍学，遺伝子診断

## 1. 研究開始当初の背景

口腔癌の分子生物学的な解析が進み、遺伝子発現プロファイルにより特徴的な遺伝子発現パターンが発癌や悪性進展に関連することが解明しつつある。なかでもわれわれは発生過程において細胞に位置情報を与えるホメオボックス遺伝子群に注目し、その発現異

常と癌化あるいは浸潤・転移との関連性を解析してきた。その結果、そのひとつのファミリーで形態形成のマスター因子として知られている HOX 遺伝子群 (39 個の HOX 遺伝子からなる) の発現パターンが、口腔扁平上皮癌および前癌病変である白板症などの異形性組織では異常であることを見出し、世界にさがり発表した。

また、異形性組織と扁平上皮癌組織とは発現異常を示すHOX遺伝子が異なること、ならびに扁平上皮癌の中でもリンパ節転移を有するものとそうでないものとの間では特定のHOX遺伝子の発現が異なることも見出ししている。これらの発現解析は、RNAレベルで行ってきたが、現在、患者血清中に存在するであろうHOX蛋白および抗HOX蛋白抗体の検出システムの開発を進めている。血清レベルでのHOX蛋白の検出が可能になれば、簡便かつ迅速な口腔癌およびその悪性度診断への貢献が期待できる。

一方、われわれは口腔癌の多発国の1つであるバングラデシュの歯科大学と癌制御を目的とした共同研究を進めている。70%以上のバングラデシュ人に噛みタバコの習慣があり、それが口腔癌の大きな原因となっている。昨年われわれはバングラデシュを訪問し、ダッカ歯科大学およびその関連病院において遺伝子解析を目的とした口腔癌検体採取法、保存および運搬法を伝授し、現在検体を蓄積している。日本人とバングラデシュ人の口腔癌の遺伝子発現プロファイルを解析することにより噛みタバコによる発癌メカニズムに迫ることができるのみならず、癌の治療法の開発や癌予防の啓蒙活動に貢献できると考える。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、口腔癌において発現異常のみられたHOX遺伝子の発現ベクターを作製し、HOX遺伝子導入癌細胞の細胞生物学的性質を解析し、口腔癌におけるHOX遺伝子の役割を見出し、これらを指標とした口腔癌およびその悪性度診断システムの構築を試みることである。

## 3. 研究の方法

### 1. 口腔癌で発現異常のみられたHOX遺伝子の発現ベクターの作製

口腔扁平上皮癌において高発現のみられたHOX遺伝子について、TAクローニング法を用いて発現ベクターを作製する。それらの発現ベクターを培養口腔癌細胞に遺伝子導入し、強制発現系およびRNA干渉を利用した発現抑制系を樹立する。

### 2. HOX遺伝子導入癌細胞の細胞生物学的解析

口腔扁平上皮癌において発現異常のみられたHOX遺伝子の細胞生物学的性質を培養口腔癌細胞において調べる。HOX遺伝子の発現が低い場合、その遺伝子の発現ベクター

を作製し、過剰発現させる。逆に高い場合にはRNA干渉を利用して発現を抑制する。それらの細胞を用いて、以下の口腔癌の悪性度に深く関与する浸潤・転移性を調べる。

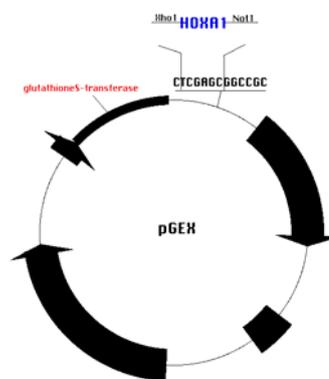
### 3. 口腔癌患者血清中のHOX遺伝子産物および自己抗体の検出

正常口腔粘膜に比べ口腔扁平上皮癌組織において著しく高い発現を示したHOXA1遺伝子について、その発現ベクターにGST遺伝子を組み込むことによりHOXA1-GST融合蛋白を構築する。口腔癌患者の血清中においてそのHOX遺伝子産物およびそれらに対する自己抗体の検出をELISA法にて試みる。

## 4. 研究成果

### 1. 口腔癌で発現異常のみられたHOX遺伝子の発現ベクターの作製

リンパ節転移のあった口腔癌組織でHOXC6の発現が高いことがわかった。そこでHOXC6がリンパ節転移に関与しているのかどうかを調べるためにTAクローニング法を用いてヒトHOXC6発現プラスミドベクターを作製した。HOXC6にはアイソフォームがあるので2種類のベクターを作った(アイソフォーム1と2)。



### 2. HOX遺伝子導入癌細胞の細胞生物学的解析

口腔癌において発現異常のみられたHOXC6遺伝子の細胞生物学的性質を培養口腔癌細胞において調べた。ヒトHOXC6発現プラスミドベクター(アイソフォーム1と2)をHEK293細胞にトランスフェクショ

ンして各々の HOX 蛋白を発現することをウエスタンブロットで確かめた。

リンパ節転移のあるヒト口腔扁平上皮癌組織で発現の高い HOXC5, HOXC6 および HOXC8 が、リンパ節転移に関与しているのかどうかを調べるために、各 HOX 遺伝子の発現プラスミドベクターを構築した。各々の HOX 遺伝子発現ベクターをヒト口腔扁平上皮癌細胞株にリポフェクション法で導入し、各 HOX mRNA および蛋白の発現を RT-PCR 法およびウエスタンブロット法で確認した。リンパ節転移に重要と考えられる癌細胞とリンパ管内皮細胞との相互作用を解析するために、ヒト皮膚から樹立されたリンパ管内皮細胞の同定を行った。現在、HOX 遺伝子を強制発現させた癌細胞のリンパ管内皮細胞への接着性ならびにリンパ管内皮細胞の培養上清に対する運動性などを検討している。

#### 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 7 件)

1. Saito, N., Hamada, J., Furukawa, H., Tsutsumida, A., Oyama, A., Funayama, E., Saito, A., Tsuji, T., Tada, M., Moriuchi, T. and Yamamoto, Y. Laminin-421 produced by lymphatic endothelial cells induces chemotaxis for human melanoma cells. *Pig. Cell Melanoma Res.*, in press. 査読有り。

2. Azumi, K., Ikeda, Y., Takeuchi, T., Nomura, T., Sabau, S.V., Hamada, J., Okada, F., Hosokawa, M. and Yokosawa, H. Localization and characterization of g-glutamyl cyclotransferase in cancer cells. *Molecular Medicine Reports*, 2: 385-391, 2009. 査読有り。

3. Hata, S., Hamada, J., Maeda, K., Murai, T., Tada, M., Furukawa, H., Tsutsumida, A., Saito, A., Yamamoto Y. and Moriuchi, T. *PAX4* has the potential to function as a tumor suppressor in human melanoma. *Int. J. Oncol.*, 33: 1065-1071, 2008. 査読有り。

4. Nakajima, J., Ishikawa S., Hamada, J., Yanagihara, M., Koike, T. and Hatakeyama, M. Anti-tumor activity of ESX1 on cancer cells harboring oncogenic K-ras mutation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 370: 189-194, 2008. 査読有り。

5. Kashiwazaki H., Hassan NMM, Hamada J, Moriuchi T, Yamazaki Y, Tei K, Totsuka Y, Inoue N. Gene Expression Profile Changes Correlated with Lymph Node Metastasis in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Odontology*, 96: 38-43, 2008. 査読有り。

6. Hassan NMM, Tada M, Hamada J, Kashiwazaki H., Kameyama T, Akhter R, Yamazaki Y, Yano M, Inoue N, Moriuchi T. Presence of dominant negative mutation of TP53 is a risk of early recurrence in oral cancer. *Cancer Lett.*, 270(1): 108-19, 2008. 査読有り。

7. Akhter R, Hassan NMM, Moriya S, Kashiwazaki H., Inoue N, Morita M. Relationship between periodontal status and physical fitness in an elderly population of nonsmokers in Bangladesh. *J Am Geriatr Soc*, 56(12): 2368-70, 2008. 査読有り。

[学会発表] (計 3 件)

1. Haruhiko Kashiwazaki, Nur Mohammad Monsur Hassan, Yutaka Yamazaki, Kanchu Tei, Yoshimasa Kitagawa, Yasunori Totsuka, and Nobuo Inoue  
Presence of dominant-negative p53 mutation is a risk of early recurrence in oral squamous cell carcinoma  
AAOMS/JSOMS/KAOMS 89th Annual meeting (2007.10.12, Honolulu, Hawaii)

2. 柏崎晴彦, ハッサン・ヌル・モハマド・モンズル, 山崎 裕, 鄭 漢忠, 北川善政, 戸塚靖則, 井上農夫男  
p53 遺伝子の優性阻害性変異は口腔扁平上皮癌の早期再発を予測しうる  
第 52 回日本口腔外科学会総会 (2007. 9. 29, 名古屋)

3. Rahena Akhter, Nur Mohammad Monsur Hassan, Jun Aida, Haruhiko Kashiwazaki, Manabu Morita.  
Relationship between betel-quid chewing and established periodontitis.  
第 18 回日本老年歯科医学会. (2007.6.20-22 札幌)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柏崎 晴彦 (KASHIWAZAKI HARUHIKO)  
北海道大学・北海道大学病院・助教  
研究者番号：10344516

(2) 研究分担者

浜田 淳一 (HAMADA JUNICHI)  
北海道大学・遺伝子病制御研究所・准教授  
研究者番号：50192703

(3) 連携研究者

なし