

平成21年03月31日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19791198

研究課題名（和文）MDM2 プロモーター一塩基多型の上咽頭がんに対する関与

研究課題名（英文）Association of single nucleotide polymorphism of MDM2 promoter in nasopharyngeal carcinoma patients

研究代表者

近藤 悟 (KONDO SATORU)

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号：70436822

研究成果の概要：MDM2は癌抑制遺伝子 p53 分解を促進し、この過剰発現は各種の悪性腫瘍において認められる。MDM2 プロモーターに存在する一塩基多型(SNP)が、p53 遺伝子異常を伴う Li-Fraumeni 症候群患者における悪性腫瘍の発症年齢に有意に影響を与えることが近年報告された。本研究では上咽頭癌で先述の SNP は上咽頭がん発症リスクに関与しないか検証し、また上咽頭がんの発症、病態、予後に影響を与えるかについて検証した。更に横断的に他の頭頸部癌患者でも解析を行った。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,100,000	0	1,100,000
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	540,000	3,440,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：ゲノム、癌、ウイルス、ストレス、遺伝子

1. 研究開始当初の背景

p53は癌抑制遺伝子であり、癌の浸潤転移において重要な役割を担う。その変異は多数の頭頸部癌あるいは他癌腫で報告されている。しかし上咽頭癌ではその遺伝子変異は報告されておらず、上咽頭癌における p53 の発現は全て正常体の p53 であるという報告もある。MDM2 蛋白は p53 蛋白の分解を促進することで、上述の p53 の機能に対して抑制的に働く。MDM2 の過剰発現は各種の悪性腫瘍において認められる現象であるがその調節機構は未だ不明である。MDM2 発現を調

節するプロモーター領域に存在する一塩基多型(SNP)が、体細胞 p53 遺伝子異常を伴う Li-Fraumeni 症候群患者における悪性腫瘍の発症年齢に有意に影響を与えることが近年報告された。

他方、上咽頭癌は比較的若年に発症しえる悪性腫瘍疾患でありその病因については長年解析が続けられているが未だ不明な点も多いのが事実である。

我々は p53 遺伝子が正常であり、また比較的若年でも発症する上咽頭癌に着目しこの MDM2 プロモーターの一塩基多型が上咽頭癌の発症に関与しないかまた予後や病期など

の関連性について検討した。

2. 研究の目的

上記の背景から、MDM2 発現を調節する SNP は上咽頭がん発症リスクに関与するという仮説をたてそれを検証した。具体的にはその SNP が上咽頭がんの発症、病態、予後に影響を与えるか検討し、最終的には実際にそれらの遺伝子多型が上咽頭癌細胞内において蛋白発現、細胞機能に寄与するか検証した。

3. 研究の方法

(1) 上咽頭癌および頭頸部癌患者の MDM2 プロモーター-SNP 頻度の検討：

金沢大学医学部附属病院病理部に保管してある上咽頭ガン組織パラフィンブロックより QIAGEN社のDNAミニキットを用いてゲノムDNAを採取した。またすでに当科にて2002年より保存されていた上咽頭ガン患者の全血よりゲノムDNAを採取した。それに加えて対象とするため上咽頭ガンのみならず他の頭頸部癌、喉頭ガン、下咽頭ガンをはじめとした腫瘍パラフィンブロックよりDNA採取が可能であった。

採取されたゲノムDNAは90%以上は分光光度計にて精製度を確認しており次のステップであるpolymerase chain reactionに十分耐えうる精製度であった。

全血からのサンプルでは一部ヘモグロビンの混入があるために精製度の悪いサンプルも認めたがキレート剤の使用によりその精製度をあげることによって解決した。

採取したゲノム DNA は TaqMan PCR 法による SNP タイピングを行った。予備実験段階にて ABI Prism 7700 system ではなく LightCycler システムの方がこの SNP 検出に優れていることが確認できたのでこちらのシステムにて解析することとした。アレル1と2のヘテロ接合体、そのホモ接合体のいずれも検出することが可能であった。上咽頭癌患者からのゲノム DNA 採取に加え、健常人および舌癌、下咽頭癌などのゲノム DNA についても解析を行った。その上で SNP の頻度と、発症年齢、予後、病期進行度を統計学的に SPSS ソフトを用いて解析を行った。

(2) 癌組織での p53, MDM2 蛋白の発現の検討：

また頭頸部癌種ごと、SNP のタイプ毎に分けて p53, MDM2 の免疫染色を行い蛋白レベルでの差異につき検討した。4μm に薄切したパラフィン切片をクエン酸バッファー熱処理

30分後、プロテインブロッカー処理し一次抗体と反応後エンハンサー方式 (DAKO) を用いて DAB 発色にて陽性像を検出した。陽性細胞数は代表的2視野の平均で算出した。

(3) 培養細胞内での MDM2 プロモーター活性の検討：

MDM2 プロモータープラスミドを培養細胞に導入し、ウィルス癌遺伝子をはじめとする外因性刺激を加え検討した。具体的には、培養細胞を播種後24時間でリポフェクションを用いて MDM2 プロモータープラスミドならびに外因性刺激プラスミド、薬剤を添加することで細胞の転写活性を増加させて検討した。プロモータープラスミドはルシフェラーゼ遺伝子が組み込まれており、転写がすすむとルシフェラーゼの発光が起こるためこれをルミノメーターにて検出することでその活性を測定した。ウミシイタク遺伝子も同時に導入しておくことでこれをバックグラウンドの値とした。

4. 研究成果

(1) 上咽頭癌および頭頸部癌患者の MDM2 プロモーター-SNP 頻度の検討：

頭頸部癌患者全体と健常者を比較すると GG ゲノタイプで癌の発症年齢が早まるということが判明し統計学的に有意差を認めた。しかしながらその他のパラメーターとの比較について行ったが有意な差は認めることはできなかった。また上咽頭癌患者例単独では有意差となる結果は認めなかった。上咽頭癌患者数は母集団が十分に集まらず総数が少なかった可能性があるが母集団を増やし今後更に検討予定である。全体的な頭頸部癌患者全体の結果については欧文雑誌に報告した (Acta Otolaryngol 2008)。

(2) 癌組織での p53, MDM2 蛋白の発現の検討：

頭頸部がん組織においてMDM2, p53にSNPゲノタイプごとの免疫染色の結果については、p53, MDM2ともに癌組織での発現は認めたが有意な差を認めることはできなかった。おそらく生体内ではp53とMDM2のみならず複雑にクロストークがなされておりそれにより有意な相関が見られない可能性が示唆された。具体的にはp53には変異のない野生型と変異のある変異型があり、変異型もいくつかのサブタイプが知られており今回は全体的なp53の発現をみたため有意差を認めなかった可能性があった。

(3) 培養細胞内での MDM2 プロモーター活

性能の検討：

MDM2プロモータープラスミドをウイルス癌遺伝子をはじめとするプラスミドとともに正常上皮細胞はトランスフェクションを解析したが有意な差異は認められなかった。今回は施行しなかったが転写後のMDM2はプロテアソームユビキチン系による分解系の影響を受けることからそれらが関与したこと可能性があるのかもしれない。MDM2は各種悪性疾患で蓄積することからその癌原性を示す事もあり、今後はMDM2の培養細胞内での蛋白発現維持に関する検討を予定したい。具体的にはシクロヘキシミドを投与した上でのウェスタンブロットやMG132を代表するプロテアソーム阻害剤投与下でのウェスタンブロットなどによる解析を予定している。

結論として、MDM2プロモーターの一塩基多型は頭頸部癌でもその早期発症リスクに関与していることは事実であるが、単一遺伝子だけではなく他の因子なども加わって早期発症リスクを高める可能性が示唆された。今後は大規模な多変量解析を含めた解析も必要とする。

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 9件)

①Muro S, Hirota K, Kondo S, (他 3名, 3番目) An extremely rare case of large Delphian node metastasis preceding primary laryngeal cancer.

Auris Nasus Larynx. 2009 (In Press)

②Endo K, Kondo S, (他 7名, 2番目) Phosphorylated ezrin is associated with EBV latent membrane protein 1 in nasopharyngeal carcinoma and induces cell migration

Oncogene. 28: 1725-1735 2009

③Tsuji A, Wakisaka N, Kondo S. (他 2名, 3番目) Induction of receptor for advanced glycation end products by EBV latent membrane protein 1 and its correlation with angiogenesis and cervical lymph node metastasis in nasopharyngeal carcinoma.

Clin Cancer Res. 14:5368-75 2008

④Wakisaka N, Kondo S. (他 3名, 2番目) A solitary fibrous tumor arising in the parapharyngeal space, with MRI and FDG-PET finding.

Auris Nasus Larynx 2008 (In Press)

⑤Nakashima M, Kondo S. (他 5名, 2番目) Impact of MDM2 single nucleotide polymorphism on tumor onset in head and neck squamous cell carcinoma.

Acta Otolaryngologica 128: 808-13, 2008

⑥Shimizu Y, Kondo S, Shirai A, Furukawa M, Yoshizaki T. (2番目) A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 and interleukin-8 gene promoter predicts poor prognosis in tongue cancer.

Auris Nasus Larynx 35:381-9 2008.

⑦Yoshizaki T, Wakisaka N, Kondo S (他 5名, 3番目) Treatment of locally recurrent Epstein-Barr virus associated nasopharyngeal carcinoma using anti-viral agent cidfovir.

J Med Virol. 80:879-82, 2008

⑧Wakisaka N, Muro S, Kondo S, Furukawa M, Yoshizaki T. (3番目) Post-operative pharyngocutaneous fistula after laryngectomy

Auris Nasus Larynx 35:203-8 2008.

⑨Yoshizaki T, Wakisaka N, Muro S, Kondo S (他 6名, 4番目) Intra-arterial chemotherapy less intensive than RADPLAT with concurrent radiotherapy for resectable advanced head and neck squamous cell carcinoma: a prospective study.

Ann Otol Rhinol Laryngol. 116:754-61, 2007

[学会発表] (計 2件)

①近藤悟・脇坂尚宏ら
Epstein Barr Virus癌蛋白LMP1によるSiah 1を介した低酸素誘導因子1 α の安定化
第32回日本頭頸部癌学会 2008年6月12日
東京

②近藤悟・脇坂尚宏ら
上咽頭細胞におけるEBV-LMP1によるMUC1および抗接着作用の誘導
第31回日本頭頸部癌学会 2007年6月15日
横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤 悟 (KONDO SATORU)
金沢大学・附属病院・助教
研究者番号: 70436822