

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 16 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592249

研究課題名（和文） In vitro 発がんモデルを用いた口腔がん発生機構の解析

研究課題名（英文） Molecular analysis of oral carcinogenesis with in vitro multistep carcinogenesis model

研究代表者

野口 一馬（NOGUCHI KAZUMA）

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：50309473

研究成果の概要（和文）：

本研究では、口腔発がんにおけるヒトパピローマウイルス(HPV)の関与と可能性について検討した。まず、ヒト正常口腔粘膜ケラチノサイトを樹立し、HPV16 E6/E7や変異型 CDK4、cyclinD1 および TERT を遺伝子導入することで不死化することを確認した。その上でがん遺伝子である HRAS や EGFR、MYC と p53 のノックアウトを組み合わせて遺伝子導入することで正常細胞ががん化することを in vitro で証明した。さらに実際の口腔発がん HPV が関与しているかをがん組織より DNA を抽出し、ジェノタイピングを行ったところ中咽頭がんでは約 30%の関与が確認されたが、口腔がんでは 21 例すべてで確認されなかった。よって口腔発がんの HPV 感染の頻度は低いものの HPV による発がんの可能性は示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we examined the participation and possibility of HPV in oral carcinogenesis. We transduced either HPV16 E6/E7 or a mutant CDK4, cyclinD1, and human telomerase reverse transcriptase (TERT) into primary human tongue keratinocytes. Moreover, additional transduction of oncogenic HRAS or EGFR together with MYC, and dominant negative p53 into immortalized keratinocytes. Furthermore, we examined the incidence of HPV infection and genotype of HPV in oral and cancers in Japanese patients using the biopsy specimens. As results, HPV infection in 21 cases of oral cancer was not detected. Therefore, involvement of HPV infection to oral carcinogenesis was suggested to be less than that in oropharyngeal carcinogenesis in Japan, but HPV infection was caused to oral carcinogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
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：口腔がん、発がん、ヒトパピローマウイルス

1. 研究開始当初の背景

- (1) 口腔癌を含む頭頸部癌は増加傾向にあり、IARC の GLOBOCAN 2002 データベースによると口腔癌の罹患率は全世界で 275,000 人、中咽頭癌は 130,300 人であり、世界では臓器別で第 6 位で、肺・胃・肝臓・大腸・乳房の 5 大癌に次ぐ発生頻度になっている。特に口腔がんは特定の地域で爆発的な急増を見ていると報告され、本邦においても口腔・咽頭癌の罹患者は 1975 年から 2001 年には 3.8 倍に上昇しており、日本も人口あたりの口腔・中咽頭がん発生率が急増している地域であると IARC は指摘している。上部消化管のがんは生活習慣、特に喫煙と飲酒の両方の習慣が相乗的な原因となり、引き起こすことが知られているが、先進国のたばこの消費量は減少しており、単純に喫煙と飲酒のみが癌を形成するとは考え難い。現在まで、口腔癌に関する遺伝子を様々な研究から解明しようと試みられたが、いまだ証明されていない。
- (2) 近年、ヒト C 型肝炎ウイルスや EB ウィルスによるウイルス発癌が注目されるようになってきている。なかでも子宮頸癌は口腔癌と同様の扁平上皮癌を形成し、その原因としてヒトパピローマウイルス (HPV) の感染が原因であることが明らかにされた。HPV は現在まで約 120 種類程度が確認されており、中でも扁平上皮に感染する粘膜型は高リスク型と低リスク型に分けられ、子宮頸癌は HPV 16 型や 18 型に代表される高リスク型の HPV の感染により癌化する事が知られている。最近、子宮頸癌だけでなく、口腔癌や扁桃原発の中咽頭癌などでも、HPV の関与が示唆されるようになった。口腔癌組織から検出されるハイリスク型 HPV は 25%程度であるといわれており、子宮頸癌の約 90%と比較するとかなり低い。

2. 研究の目的

本研究の目的は本学耳鼻咽喉科と協力して口腔癌に HPV が関与するかを検討することである。すなわち、本研究は口腔癌の発生機序に関わる key gene を明確にし、近年報告されている HPV の関与を明らかにすることを目的とする。そのため①口腔および中咽頭癌組織内の HPV の発現とタイピングを行う。さらにそれを検証するために②口腔粘膜由来のケラチノサイトに HPV 感染と同様の状態を作り出し、in vitro における発がん過程を検証し、原因遺伝子の解析を行う。さらに HPV の関与がない口腔がんの in vitro 発がんモデルも同様に作成し、両者を比較検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 口腔および扁桃原発扁平上皮癌における HPV の検出およびジェノタイピング
従来の報告から、扁桃原発扁平上皮癌については HPV 感染が発がんに関与することは明らかであるため、扁桃原発中咽頭がんと口腔がんを比較した。文書による説明の上、同意を得た、患者の病理診断目的に行う組織生検の組織の一部を -80°C で保存し、DNAを抽出した。採取・保存したDNAをmultiplex PCR[®](KURABO Industries) を用いて解析し、ハイリスク HPVである 23 種類の発現を検討した。

(2) 遺伝子導入型モデルにおける HPV 関与型および非関与型口腔がん発癌機構の解析
hTERT, cyclinD1 および human mutant Cdk4 (Cdk4R24C: an inhibitor resistant form of Cdk4) の 3 遺伝子をベクターである CS II -CMV-RfA に挿入し、CS II -CMV-hTERT, -cyclinD1, -hCDK4R24C を作成する。これをヒト口腔粘膜より採取した正常ケラチノサイトにこれらのレンチウイルスを感染させ、hTERT, cyclinD1, CDK4 を遺伝子導入し、ケラチノサイトの不死化を計る。遺伝子の導入をウエスタンブロットで、不死化を TRAP アッセイで確認する。さらに EGFR, H-RAS, c-MYC などいわゆる「癌の形質維持」に関与する遺伝子を導入し、形成された癌細胞についてコロニー形成法、ヌードマウス造腫瘍能の検討、raft culture による 3 次元培養法により、in vitro における癌化を実証した。

4. 研究成果

(1) 口腔および扁桃原発扁平上皮癌における HPV の検出およびジェノタイピング
扁桃原発の中咽頭側壁に発症した扁平上皮癌 10 例のうち 30%で HPV ゲノムが検出され、ジェノタイプはすべて HPV16 型であった。しかし、口腔扁平上皮癌 21 例では HPV ゲノムは検出できなかった。これらの結果を確認するため、株化された口腔扁平上皮癌培養細胞 7 株を検討した結果、HPV ゲノムは検出されなかった。したがって口腔扁平上皮の発がん過程における HPV の関与は中咽頭と比較して明らかに低いことが示された。

(2) 遺伝子導入型モデルにおける HPV 関与型および非関与型口腔がん発癌機構の解析
HPV 陽性および HPV 陰性口腔がんの遺伝子導入型 in vitro 発癌モデルの作成を行った。まず HPV 陽性モデルでは LXS-16E6E7, MSCV-bsd-KrasV12, MSCV-bsd-Hras, MSCV-CLXPpuro-c-myc をさまざまな組み合わせで遺伝子導入を行った。また、HPV 陰性モデルでは hTERT, cyclinD1 および human mutant Cdk4 (Cdk4R24C: an inhibitor

resistant form of Cdk4) の3遺伝子をベクターである CS II-CMV-RfA に挿入し、CS II-CMV-hTERT, -cyclinD1, -hCDK4R24C を作成し、ヒト正常舌角化細胞に hTERT, cyclinD1, CDK4 を遺伝子導入し、がん化する組み合わせを検討した。その結果、HPV 陽性系では HPV16 型の E6 と E7 の変異は必須であり、H-RAS および c-MYC 遺伝子の活性化でがん化することが分かった。HPV 陰性系のがん化では hTERT, cyclinD1, CDK4 に加えて p53 の不活化が必須であることが確認された。樹立された癌細胞はコロニー形成法、ヌードマウス造腫瘍能、raft culture による3次元培養法により、がんとしての性質を獲得したことを確認した。

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9件)

- (1) Yamamura M, Noguchi K, Nakano Y, Segawa E, Takaoka K, Kishimoto H, Hashimoto-Tamaoki T, Urade M. Functional analysis of Zyxin in cell migration and invasive potential of oral squamous cell carcinoma cells. *International Journal of Oncology*. 42(3) 873-80, 2013 (査読: 有)
- (2) 頭司雄介, 野口一馬, 浦出雅裕 「HPV陽性および陰性の口腔扁平上皮がんに対する in vitro 多段階発がんモデル」(二次出版) 日本口外誌 59 (3) 159-171, 2013 (査読: 有)
- (3) Noguchi K, Kishimoto H, Yamanegi K, Moridera K, Takaoka K, Urade M. Unicystic ameloblastoma metastasizing to multiple cervical lymph nodes. *Journal of Surgical Case Reports*. doi:10.1093/jscr/rjt033, in press 2013 (査読: 有)
- (4) 奥井森, 野口一馬, 森寺邦康, 高岡一樹, 岸本裕充, 浦出雅裕. 超選択的動注化学放射線療法が有効であった上顎歯肉小細胞癌の1例. *日本口腔外科学会雑誌* 58 247-51, 2012 (査読: 有)
- (5) Hiromoto T, Noguchi K, Yamamura M, Zushi Y, Segawa E, Takaoka K, Moridera K, Kishimoto H, Urade M. Up-regulation of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in oral squamous cell carcinoma: Relation to cell differentiation. *Oncology Report* 26:1415-21 2011 (査読: 有)
- (6) Fujii M, Noguchi K, Urade M, Muraki Y, Moridera K, Kishimoto H, Hashimoto-Tamaoki T, Nakano Y. Novel PTCH1 mutations in Japanese Nevoid basal cell carcinoma syndrome patients: two familial and three sporadic cases including the first Japanese patient with medulloblastoma. *J Hum Genet* 56(4) 277-83, 2011 (査読: 有)
- (7) Toyohara Y, Hashitani S, Kishimoto H, Noguchi K, Yamamoto N, Urade M. Inhibitory effect of vitamin D-binding protein-derived macrophage activating factor on DMBA-induced hamster cheek pouch carcinogenesis and its derived carcinoma cell line. *Oncology Letters* 2:685-691, 2011 (査読: 有)
- (8) Zushi Y, Narisawa-Saito M, Noguchi K, Yoshimatsu Y, Yugawa T, Egawa N, Fujita M, Urade M, Kiyono T. An in vitro multistep carcinogenesis model for both HPV-positive and -negative human oral squamous cell carcinomas. *Am J Cancer Res* 1(7) 869-881, 2011 (査読: 有)
- (9) 森寺邦康, 野口一馬, 富士原将之, 山本聡, 高岡一樹, 奥井森, 浦出雅裕. 頭頸部扁平上皮癌における超選択的動注化学療法併用放射線療法の治療成績 日本口腔腫瘍学会 23(4) 129-138 2011 (査読: 有)

[学会発表] (計8件)

- (1) Zushi Y, Noguchi K, Yamamura M, Yoshikawa K, Takaoka K, Moridera K, Okui S, Urade M, Kishimoto H. Establishment of oral cancer stem-like cells using normal human tongue keratinocytes. The 54th Congress of Korean Association of Oral & Maxillofacial Surgery. (Apr 25-27, 2013 Daegu Korea)
- (2) Zushi Y, Noguchi K, Yamamura M, Yoshikawa K, Takaoka K, Moridera K, Okui S, Kishimoto H, Urade M. Analysis of carcinogenesis for both HPV-positive and -negative oral squamous cell carcinoma using normal human tongue keratinocytes. 21st Congress of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery (EACMFS 2012) (Sep 11-15, 2012 Dubrovnik, Croatia)
- (3) 頭司雄介, 野口一馬, 吉川恭平, 岸本裕充, 浦出雅裕. 口腔発がんにおける p53, EGFR, Ras 遺伝子発現の関連性について～不死化ヒト正常舌ケラチノサイト (HTK) を用いた解析～. 第66回日本口腔

- 科学会学術集会 2012. 5. 17-18 広島
- (4) 頭司雄介、野口一馬、山村倫世、高岡一樹、瀬川英美、岸本裕充、浦出雅裕 不死化ヒト正常ケラチノサイト(HTK)を用いた口腔癌のHPV陽性、陰性モデルの解析 第48回日本口腔組織培養学会(2011, 11.19 浦安)
- (5) Zushi Y, Noguchi K, Yamamura M, Takaoka K, Moridera K, Segawa E, Okui S, Kishimoto H, Urade M. An in vitro multistep carcinogenesis model for both HPV positive and negative human oral squamous cell carcinoma. 20th International Conference on Oral and Maxillofacial Surgery (Nov 1-4, 2011, Santiago, Chili)
- (6) 頭司雄介、野口一馬、山村倫世、高岡一樹、瀬川英美、岸本裕充、浦出雅裕 不死化ヒト正常ケラチノサイト(HTK)を用いた口腔癌のHPV陽性、陰性モデルの解析 第56回日本口腔外科学会総会・学術大会(2011.10.21-23、大阪)
- (7) Noguchi K, Hiromoto T, Yamamura M, Zushi Y, Segawa E, Takaoka K, Moridera K, Kishimoto H, Urade M. Up-regulation of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in oral squamous cell carcinoma: Relation to cell differentiation. 16th European Cancer Congress. (Sep 23-27, 2011, Stockholm, Sweden)
- (8) Yamamura M, Noguchi K, Segawa E, Zushi Y, Takaoka K, Kishimoto H, Urade M. A functional analysis of zyxin in epithelial-mesenchymal transition of oral squamous cell carcinoma. 16th European Cancer Congress. (Sep 23-27, 2011, Stockholm, Sweden)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野口 一馬 (NOGUCHI KAZUMA)
兵庫医科大学・医学部・講師
研究者番号：50309473

(2) 研究分担者

浦出 雅裕 (URADE MASAHIRO)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号：70104883

(3) 連携研究者

清野 透 (KIYONO TOHRU)
独立行政法人国立がん研究センター・ウイルス部・部長

研究者番号：10186356

瀬川 英美 (SEGAWA EMI)
兵庫医科大学・医学部・研究生 (研究員)
研究者番号：00553778

寺田 友紀 (TERADA TOMONORI)
兵庫医科大学・医学部・講師
研究者番号：00340977