

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：82713

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659958

研究課題名(和文) ING遺伝子発現を用いた口腔扁平上皮癌患者の予後予測方程式の作成

研究課題名(英文) Establishment of predictive equation for the prognosis of oral squamous cell carcinoma patients on the basis of the expression of ING gene family

研究代表者

高野 康雄 (TAKANO, Yasuo)

地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立がんセンター(臨床研究所)・その他部局等・その他

研究者番号：60142022

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円、(間接経費) 810,000円

研究成果の概要(和文)：口腔扁平上皮癌の予後予測分子マーカーの探索のために、ING1bの癌細胞での結合タンパクであるSIRT1発現を免疫組織化学を用いて頭頸部扁平上皮癌症例で検討した。その結果、SIRT1発現は、年齢が高いほど高率で、口腔症例で高率で、リンパ節転移、病理学的病期とは負の相関を示した。即ち、癌の進展に比例して低率となった。また、SIRT1発現は、頭頸部扁平上皮癌症例にとって有意な予後良好因子であった。口腔癌症例では特に有意であった。多変量解析でもSIRT1発現は独立した予後良好因子であった。

研究成果の概要(英文)：We examined SIRT1, a binding protein to ING1b and Class III HDAC (histone deacetylase), expression of head and neck squamous cell carcinoma patients to investigate the bio-marker for prediction of their prognosis by the immunohistochemical study. The results were, 1) The SIRT1 expression related to higher age, 2) higher in oral cancer patients, 3) lower in lymph nodes' metastasis cases, 4) lower in advanced cases in patho-clinical stages. Thus, the SIRT1 expression inversely correlated in proportion to cancer progression. SIRT1 expression was good indicator for good prognosis of HNSCC patients, especially in oral cancer patients. And also it was independent good prognostic factor in multivariate analyses.

研究分野：外科系歯学

科研費の分科・細目：臨床腫瘍学

キーワード：脱アセチル化酵素 SIRT1 癌抑制遺伝子 頭頸部扁平上皮癌

1.【研究開始当初の背景】口腔の扁平上皮癌の予後予測は非常に難しい。他の扁平上皮癌では、組織学的悪性度に比例して、腫瘍の大きさに比例して、予後が悪くなることが多い。しかし、口腔の扁平上皮癌では、予後予測因子として所属リンパ節転移、血管侵襲、結節病変の被膜外浸潤と手術断端陽性とが挙げられるのみである。また、予後予測の分子マーカーも見出されていない。

ING1 遺伝子は乳癌細胞株と正常乳腺上皮との mRNA 発現を比較することにより、癌抑制遺伝子として同定された(Garkavtsev I, et al. Nat. Genet. 1996, 14:415-420)。ING family は ING1-ING5 まで 5 種類の遺伝子があるが、共通した基本的な構造に PHD (plant homeo domain finger) があり、ING の機能を特徴づける。PHD は zinc finger を有し、N 末端から 4 番目のリジンがトリメチル化したヒストン H3 (H3K4me3) に結合して、クロマチンのリモデリングに関与し、細胞増殖を制御する。ING は細胞増殖のエピジェネティック制御に係る重要な遺伝子として認識されている。われわれの富山大学病院の 172 例の癌症例、60 例の異形成症例と 48 例の正常扁平上皮を用いた ING family の研究結果では、ING は正常扁平上皮では核内に発現し、悪性度に比例して核内から細胞質へと移行した。(Li XH, Takano Y, et al, Histol Histopathol. in press. Li XH, Takano Y, et al. J Cancer Res Clin Oncol. 2010, 136:1573-83)。われわれは、扁平上皮癌ほどではないが胃癌・大腸癌でも同様の研究結果を得ている (Zheng HC, Takano Y, et al. Hum Pathol. in press)。ING family の中でも ING1b が特にこの傾向が強かった。

2.【研究の目的】口腔の扁平上皮癌の予後予測は、予後予測因子としてリンパ節転移、血管侵襲と手術断端陽性が挙げられるのみであり、非常に困難である。また、予後予測の分子マーカーも見出されていない。ING (Inhibitor of growth) 遺伝子 family は癌抑制遺伝子と癌遺伝子の両者の側面を持つ遺伝子である。われわれの口腔の扁平上皮癌症例を用いた研究結果から、ING family は癌細胞の核内では癌抑制遺伝子の役割を、細胞質では癌遺伝子の役割を果たしていると推定された。今回は、ING1b に標的を絞って、この推論を分子病理学的に証明する。予後調査が正確な多数の症例を用い、ING1b が予後予測分子マーカーであることを証明し、多変量解析により ING1b を含めた予後予測因子を変数にした予後予測方程式を作成する。

3.【研究の方法】正常細胞では、ING1b が HDAC 複合体と結合し、癌抑制遺伝子としての役割をするのを免疫沈降、siRNA、ルシフェラーゼ活性などを使用して証明する。wt p53 の癌細胞では、ING1b と HDAC 複合体が SIRT1 と結合することにより ING1b は癌

遺伝子の役割をし、その時、SIRT1 は RBP1 を抑制することを証明する。また、mut p53 の癌細胞で同様の実験を行い、ING1b の癌遺伝子の役割は、p53 依存性か非依存性かを検討する。ING1b は、細胞質内でリジン 119 がリン酸化され、14-3-3 と結合し、核と細胞質を相互に移行しているが、その機構を解明する。予後調査が正確な口腔の扁平上皮癌症例 400 例の TMA を作成し、ING1b の免疫組織化学を施行し、ING1b 核発現と細胞質発現と臨床病理学的事項、生存期間との関係を統計学的に解析する。それらの成果をもとに多変量解析により予後予測方程式を作成する。

4.【研究の成果】口腔扁平上皮癌の予後予測分子マーカーの探索のために、ING1b 発現の検討を行った。しかし、ING1b の発現が頭頸部扁平上皮癌(HNSCC)症例では弱く、分子生物学的な検討には不都合が多かった。そこで、ING1b の癌細胞での結合タンパクである SIRT1 発現を HNSCC 症例で検討した。症例は、神奈川県立がんセンター病院・頭頸科で手術あるいは化学療法・放射線療法(CRT)が施行された HNSCC 437 症例の内訳は、男女比 356 :81 平均年齢 63.7 ± 11.0 才、咽頭 101 例、喉頭 143 例、口腔 193 例であった。組織型は、高分化型 184 例、中分化型 162 例、低分化型 90 例であった。病理学的病期は、stage I が 68 例、stage II が 114 例、stage III が 55 例、stage IV が 200 例であった。治療は、手術単独が 91 例、手術と CRT109 例、CRT 単独が 230 例であった。SIRT1 は、class III の脱アセチル化酵素であるが、その発現は、免疫組織化学(IHC)で行い、その他に p53, H3K9 アセチル化(Ac)、H4K16 アセチル化(Ac)に対する抗体を使用し、SIRT1 発現との相関を検討した。また、HNSCC 症例の臨床病理学的事項との検討も加えた。その結果、SIRT1 発現は、年齢が高いほど高率で、口腔症例で高率で、リンパ節転移、病理学的病期とは負の相関を示した。即ち、癌の進展に比例して低率となった。p53 発現とは相関が見出せず、H3K9Ac, H4K16Ac とは正の相関を示した。即ち、SIRT1 発現は、p53 変異とは関係なく、H3K9 と H4K16 のアセチル化を脱アセチル化していないと考えられた。また、SIRT1 発現は、HNSCC 症例にとって有意な予後良好因子であった。特に、口腔癌症例では特に有意であった。多変量解析でも SIRT1 発現は独立した予後良好因子であった。

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 3 件)

Noguchi A, Kikuchi K, Ohtsu T, Yoshiwara M, Nakamura Y, Miyagi Y,

Zheng H, **Takano Y.** Pulmonary tumors associated with the JC virus T-antigen in a transgenic mouse model. *Oncology Reports* 査読有 30 2013, 2603-8

DOI: 10.3892/or.2013.2782

Zheng H, Nakamura T, Noguchi A, Kikuchi K, Ando T, **Takano Y.** Gene profile analyses of lens tumor, liver and spleen in α -crystallin/SV40 T antigen transgenic mice treated with Juzentaihoto, a Chinese medicine. *Molecular Medicine Reports* 査読有 9 2014, 547-52

DOI: 10.3892/mmr.2013.1854

Noguchi A, Li X, Kubota A, Kikuchi K, Kameda, Y, Zheng H, Miyagi Y, Aoki I, **Takano Y.** SIRT1 expression is associated with good prognosis for head and neck squamous cell carcinoma patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 査読有 115 2013, 385-92

DOI: 10.1016/j.oooo.2012.12.013

〔学会発表〕(計 13件)

高野康雄 JC virus と癌 日本病理学会総会 2011 横浜

Koizume S, Miyagi E, Hirahara F, Nakamura Y, Takano Y, Miyagi Y HIF2 /Sp1/mTOR interplay a deacetylation dependent transcription in ovarian clear cell carcinoma. 癌学会総会 2011 名古屋

Noguchi A, Takano Y, Kikuchi K. Subnuclear localization and degradation of ING4 is correlated with tumorigenesis and progression of HNSCC. 癌学会総会 2011 名古屋

Kikuchi K, Noguchi A, Takano Y. SIRT1 overexpression is an independent poor prognostic indicator of colorectal cancer patients. 癌学会総会 2011 名古屋

Ito S, Koizume S, Nakamura Y, Takano Y, Miyagi Y. Aberrant expression of tissue factor pathway inhibitor-1 in hepatocellular carcinoma. 癌学会総会 2011 名古屋

野口映、菊地慶司、高野康雄 SIRT1 核発現は頭頸部扁平上皮癌の進展・予後のバイオマーカーである 日本病理学会総会 2012 東京

Miyagi Y, Yoshida A, Matsukuma S, Sakuma S, Koizume S, Yoshihara M, Okamoto N, Yokose T, Kondo T, Takano Y. RAS gene mutation in follicular thyroid tumors: frequency and the clinical significance. 癌学会総会 2012 札幌

Noguchi A, Kikuchi K, Takano Y. High expression is associated with poorer survival in patients with gastric cancer.

癌学会総会 2012 札幌

Kikuchi K, Noguchi A, Takano Y. SIRT1 high-expression and low expression of SIRT1 inhibitor DBC1 correlates poor prognosis of colon cancer patients. 癌学会総会 2012 札幌

Ito S, Koizume S, Takano Y, Miyagi Y. Inhibitor of hepatocellular carcinoma cell adhesion by ectopic synthesis of TFPI1. 癌学会総会 2012 札幌

Koizume S, Miyagi E, Hirahara F, Yoshihara M, Takano Y, Miyagi Y. Survival of ovarian cancer cells mediated by ICMA1 expression induced by HIF1/Sp1/mTOR interplay under ischemic condition. 癌学会総会 2012 札幌

高橋博之、梶田咲美乃、鶴田智子、亀田陽一、高野康雄、三枝信 子宮ポリープ上異型腺筋腫における カテニン遺伝子異常の意義 日本病理学会総会 2013 札幌

野口映、高野康雄 JCV T 抗原 TG マウスに発生した肺腫瘍の病理学的検討 日本病理学会総会 2013 札幌

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高野康雄 (TAKANO Yasuo)

地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立がんセンター臨床研究所・所長

研究者番号：60142022

(2)研究分担者

野口誠 (NOGUCHI Makoto)

富山大学・教授

研究者番号：50208328

(2)研究分担者

野口映 (NOGUCHI Akira)

地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈

川県立がんセンター病院・任期付医員

研究者番号：10456395

(2)研究分担者

片山 佳代子 (KATAYAMA Kayoko)

地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈

川県立がんセンター臨床研究所・主任研究員

研究者番号：70456395

(2)研究分担者

菊地慶司 (KIKUCHI keiji)

地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈

川県立がんセンター臨床研究所・主任研究員

研究者番号：90372094