

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：32650

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11278

研究課題名(和文) 口腔癌および前癌病変のマッピングアレイを用いた発癌関連遺伝子の解明

研究課題名(英文) Explication of carcinogenesis related gene using mapping array of oral cancer and precancerous region

研究代表者

山本 信治 (Yamamoto, Nobuharu)

東京歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：60385185

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：病理組織学的に所属リンパ節転移陽性例pN(+)と陰性例pN(-)の口腔扁平上皮癌組織から採取したDNAをMapping Arrayにより解析し、pN(-)例と比較してpN(+)例に共通して認められるゲノムコピー数異常を検出し、同座位に存在する転移関連遺伝子候補をリストアップした。Real-time PCRの結果、切除断端付近の正常口腔組織と比較して47.1%の口腔扁平上皮癌組織においてSirt1mRNAの発現低下が認められた。Sirt1はpN(+)例に高頻度に発現低下を示す傾向が認められた。Sirt1が口腔扁平上皮癌の進行やリンパ節転移において重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Were histopathological, and analyzed the DNA which we obtained from an oral squamous cell carcinoma tissue of regional node-positive case pN(+) and negative case pN(-) by Mapping Array, and detected genome copy number abnormality to be common to a pN(+) case as compared with a pN(-) case, and to be found, and listed candidate metastasis-related gene which was present in theatrical company rank. As a result of Real-time PCR, an expression of Sirt1 mRNA decrease was found in 47.1% of oral squamous cell carcinoma tissue as compared with a normal oral tissue of the resection stump neighborhood.

Sirt1 had the tendency indicating the expression decrease in a pN(+) case frequently. The likelihood that Sirt1 played an important role in in progress and lymph node metastases of oral squamous cell carcinoma was suggested.

研究分野：口腔外科学

キーワード：口腔癌 白板症 DNAマッピングアレイ 癌抑制遺伝子 ヘテロ接合性消失

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまで、平成 20~21 年度の 2 年間、口腔扁平上皮癌患者から抽出した DNA を用い、DNA マッピングアレイ解析を用いた全ゲノム上の LOH とコピー数異常の有無を検索し、その結果、数百~数千の口腔癌に関与する新規未知癌抑制遺伝子座位が一度に同定することが可能となった。この研究はこれまで行われてきたゲノム解析とは想像を遥かに超えるほどの情報量が得られ、新探索方法として確実に実績が上げられ、大きな成果をあげた。

さらに、平成 22~23 年度の 2 年間、口腔癌のマッピングアレイを用いた全染色体上の構造異常を LOH の有無を検索し、新規未知癌抑制遺伝子座位を同定することを明らかにした。

さらに、平成 24~26 年度の 3 年間はさらに発展させ、口腔扁平上皮癌患者から抽出した DNA を用い、全ゲノム上のマッピングアレイの解析ならびに同座位に存在する再発・転移関連遺伝子候補を明らかにした。

本研究は、これまでに蓄積した実績の集大成として、口腔扁平上皮癌のみならず非上皮系悪性腫瘍や前癌病変(白板症)と診断された患者からの抽出した DNA ならびに mRNA を用い、全ゲノム上のゲノムコピー数異常の解析ならびに同座位に存在する再発・転移関連遺伝子候補をリストアップし、候補遺伝子の mRNA 発現状況を定量的 Real-time PCR 法により検証する。この新探索方法が確実に実績が上げられ、体内に潜む再発転移細胞の早期発見に結びつけられれば、世界初の口腔癌の再発・転移関連遺伝子の同定に成功し、口腔癌の診断・治療の向上に大きく貢献することが期待される。

2. 研究の目的

本研究は、これまで当講座において LOH に関する研究から、多くのマイクロサテライト領域を特定してきた。これらは、海外論文でも発表し高い評価を得ている。今回はさらに発展させ、31 億個の分子からなるヒトゲノムを篩いに分け、ほんの一握り変異した遺伝子、欠損遺伝子や過剰コピーされた遺伝子を特定することが必要となる。これは気の遠くなる解析で、その進行はこれまで遅々としていた。

そこで、本研究は Affymetrix 社製の GeneChip DNA マッピングアレイ解析を行い全ゲノム上のマイクロサテライト領域を一度に解析し、数百~数千の口腔癌に関与する新規未知癌抑制遺伝子座位を一度に同定する。これはこれまで行われてきたゲノム解析とは想像を遥かに超えるほどの情報量が得られる。さらに、同座位に存在する転移関連遺伝子候補をリストアップした。さらに候補遺伝子の mRNA 発現状況を定量的 Real-time PCR 法により検証する。

この新探索法により、体内に潜む微小転移細胞や再発の早期発見に結びつけ、世界初の口腔癌の再発・転移関連遺伝子の同定を計ることを目的とした。

3. 研究の方法

1) 患者検体:東京歯科大学口腔外科を受診し、診断および加療を行った口腔扁平上皮癌症例から採取した検体を試料とした。試料は生検時または手術時に採取し凍結保存しておいた(採血も同時に行う)。

2) DNA の抽出:腫瘍ならびに正常 DNA は通法に従いフェノール・クロロフォルム抽出法により抽出・加工・調整した。採血しておいた全血液は遠心分離し白血球から正常 DNA を抽出した。

3) GeneChip® Mapping 10K Array による解析:Affymetrix 社製の GeneChip DNA マッピングアレイ解析を行い全ゲノム上のマイクロサテライト領域を一度に解析した。

4) 病理組織学的に所属リンパ節転移陽性例 pN(+)と陰性例 pN(-)を GeneChip® Mapping 10K Array により解析し、pN(-)例と比較して pN(+)例に共通して認められるゲノムコピー数異常を検出、同座位に存在する転移関連遺伝子候補をリストアップした。

5) 候補遺伝子の mRNA 発現状況を定量的 Real-time PCR 法により検証した。

6) 得られた LOH とコピー数異常(CNA)の結果と、臨床的・病理組織学的特性からフィッシャーの直接確率法を用いて、統計解析し再発・転移の予測の関係について検討を行った。

4. 研究成果

病理組織学的に所属リンパ節転移陽性例 pN(+)と陰性例 pN(-)の口腔扁平上皮癌組織から採取した DNA を GeneChip® Mapping 10K Array により解析し、pN(-)例と比較して pN(+)例に共通して認められるゲノムコピー数異常を検出し、同座位に存在する転移関連遺伝子候補をリストアップした。

pN(+)例に共通して高頻度にコピー数異常が認められた座位である 10q21.3 領域および 2q34 領域に着目し解析を行った。

1)pN(+)例に共通してコピー数の減少が認められた座位である 10q21.3 領域には Sirt1 遺伝子が座位している。Sirt1 は細胞分化、エネルギー代謝、アポトーシス、ストレス抵抗性、DNA 損傷修復等の機能を有し長寿遺伝子と呼称されている。Sirt1 は各種悪性腫瘍細胞が発現異常を示すことが報告されている。そこで、口腔扁平上皮癌細胞における長寿遺伝子 Sirt1 の発現状態を解析した。

Real-time PCR 法の結果、切除断端付近の正常口腔組織と比較して 102 症例中 48 症例(47.1%)の口腔扁平上皮癌組織において Sirt1 mRNA の発現低下が認められた。Sirt1 の発現状態と臨床指標を比較検討した結果、Sirt1 は pN(+)例に高頻度に発現低下を示す傾向が認められた(P < 0.05)。Sirt1 が口腔扁平上皮癌の進行やリンパ節転移において重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

Sirt1 は、前立腺癌、乳癌、大腸癌等において発現が亢進し、分子標的治療の候補分子とされている。一方で、膀胱癌、肝癌、皮膚癌、卵巣癌、頭頸部癌等では発現低下が報告されている。初期の報告では、Sirt1 は癌遺伝子として機能する

とされていたが、近年の in vitro および in vivo における検討では癌抑制遺伝子として働くことが示唆されている。本研究の結果、Sirt1 は口腔扁平上皮癌細胞においては発現低下を示す可能性が示唆された。

10q21.3 領域の DNA コピー数の減少と Sirt1 の発現低下は、口腔扁平上皮癌において高頻度に認められ、口腔扁平上皮癌の進行やリンパ節転移に關与するバイオマーカーとなり得る可能性が示唆された。

2)pN(+)例に共通してコピー数の減少が認められた座位である 2q34 領域には IDH1 遺伝子が座位している。Isocitrate dehydrogenase (IDH) は、イソクエン酸と α -ケトグルタル酸とを相互に変換する酸化還元酵素である。IDH1 タンパク質は細胞質に、IDH2 はミトコンドリアに局在する。

IDH 遺伝子変異は、2009 年に、悪性神経膠腫の大規模ゲノム配列決定プロジェクトにより、IDH 遺伝子のミスセンス変異が報告されたのが最初で、現在では、急性骨髄性白血病、骨髄異形成症候群、骨髄増殖性腫瘍、急性 B リンパ芽球性白血病、血管免疫芽球性 T 細胞リンパ腫、芽球型形質細胞様樹状細胞腫瘍、軟骨肉腫、骨巨細胞腫、胆管がん、大腸がん、腸管腺がん、乳腺がん、黒色腫、前立腺がん、膀胱がん、傍神経節腫など各種がんにおいて遺伝子変異が報告されている。近年、変異 IDH タンパク質により産生される代謝産物である 2-ヒドロキシグルタル酸(2HG)が、がんの発生進展に寄与することが報告され、注目を集めている。このような、がんの発生・進展に直接的に寄与する代謝産物(低分子化合物)を“オンコメタボライト”と称し、脳腫瘍等ではすでに、2HG を標的とした治療法の開発(第 Ⅲ 相臨床試験)が進行中である。しかしながら口腔扁平上皮癌に対する 2HG の関与は不明である。そこで、われわれは、口腔扁平上皮癌細胞における 2HG の細胞内発現状態を解析した。口腔扁平上皮癌由来細胞株 5 株(SAS、KON、HSC-3、HSC-4、OSC-20)、コントロールとして表皮角化細胞(HaCaT)を使用した。CE-TOFMS を用いたメタボローム解析を行い、細胞内の代謝産物(低分子化合物)を網羅的に測定した。CE-TOFMS の結果 250 のピークが検出された。2HG は、口腔扁平上皮癌細胞株 5 株中 3 株(60%)において蓄積が認められた(SAS、KON、HSC-4)。一方で、HaCaT、HSC-3、OSC-20 からは 2HG は検出されなかった。

2HG は変異のない細胞(正常細胞)ではほとんど産生されないため、診断および治療のバイオマーカーになり得ると考えられる。本研究の結果、口腔扁平上皮癌細胞においても 2HG の蓄積が認められ、2HG は口腔扁平上皮癌のバイオマーカーとして貢献できる可能性が示唆された。IDH 変異によって産生される 2HG は野生型 IDH にはほとんど存在せず、腫瘍組織で産生される 2HG は血液中や尿中に放出される可能性があり、液体クロマトグラフタンデム質量分析法などを用いて血液中や尿中における 2HG を測定することにより、非侵襲的にがんを診断できる可能

性がある。

一方で、細胞内の 2HG を MR スペクトロスコピー(MRS)を用いて非侵襲的に測定することにより、悪性神経膠腫等において、すでに診断が試みられている。口腔扁平上皮癌においても本技術が応用できる可能性がある。

2HG はがん特異的に存在するため、理想的な治療標的となり得る。各種がんで、IDH 阻害剤の臨床試験が開始されており、口腔扁平上皮癌においても検討する必要があると考えられた。

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)

Yamamoto N, Onda T, Sugahara K, Nomura T, Shibahara T.

Molecular biological change in oral cancer, summary of our researches.

Japanese Dental Science Review, 査読有, 51, 2015, 25-33.

Katakura A, Yamamoto N, Sakuma T, Sugahara K, Onda T, Noguchi S, Shibahara T.

A screening test for oral cancer using saliva samples -Proteomic analysis of biomarkers in whole saliva-

Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology, 査読有, 27, 2015, 1-5.

Yamamoto N, Yamamoto T, Kubota M, Hanaoka K, Sugaya A, Yuyama N, Hayashida J, Kimura K, Kumada H, Yi J, Sakai N, Kawakami M, Sakurai T, Tsukinoki K, Hirata Y.

Intelligibility of medical terms in students at School of Dentistry, Kanagawa Dental University.

Kanagawa Shigaku, 査読有, 50 (2), 2015, 73-81.

Watabe Y, Nomura T, Onda T, Yakushiji T, Yamamoto N, Ohata H, Takano N, Shibahara T.

Malignant transformation of oral leukoplakia with a focus on low-grade dysplasia.

Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology, 査読有, 28, 2016, 26-29.

山本信治, 山本龍生, 窪田光慶, 花岡孝治, 菅谷 彰, 湯山徳行, 林田丞太, 木村幸司, 櫻井 孝, 平田幸夫

神奈川歯科大学歯学部学生の自己申告による医学系用語の理解度 -学年, 性および国籍別の検討-

神奈川歯学, 査読有, 51 (1), 2016, 27-33.

Yamamoto N, Fuse Y, Yoshida Y, Suzuki T, Noguchi S, Katakura A, Tanaka Y, Shibahara T, Takano N.

A case of lower gingival carcinoma with drug-induced interstitial pneumonia caused after chemotherapy with peplomycin.

Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology, 査読有, 27, 2015,

92-95.

Yamamoto N, Fuse Y, Yoshida Y, Katakura A, Tanaka Y, Shibahara T, Takano N.

A case of lower gingival squamous cell carcinoma of perineural spread to cavernous sinus and orbit caused by mandibular nerve invasion.

Japanese Journal of Oral Diagnosis/Oral Medicine, 査読有, 28 (2), 2015, 147-152.

鈴木大貴、吉田佳史、野口沙希、酒井克彦、別所央城、山本信治、佐藤一道、岡崎雄一郎、神山 勲、山内智博、野村武史、高野正行、片倉 朗、田中一郎、柴原孝彦、青柳 裕、田中陽一、山根源之、高野伸夫

東京歯科大学口腔がんセンターにおける口腔癌 Stage I, II 手術症例の予後と頸部後発リンパ節転移に関する臨床的検討

歯科学報, 査読有, 115 (2), 2015, 117-122.

Yamamoto N, Morikawa T, Yakushiji T, Shibahara T.

Treatment of mandibular reconstruction by free vascularized fibular transplant experiment in our department.

The Bulletin Tokyo Dental College, 査読有, (2018, in press).

〔学会発表〕(計 21 件)

山本信治、窪田光慶、花岡孝治、菅谷 彰、湯山徳行、林田丞太、木村幸司、李 正姫、櫻井 孝、平田幸夫

本学歯学部全学生における歯科関連事項に関する医科専門用語の認知度の実態調査

第 147 回神奈川歯科大学学会例会, 平成 27 年 6 月 11 日, 横須賀市

窪田光慶、菅谷 彰、湯山徳行、花岡孝治、熊田秀文、山本信治、林田丞太、木村幸司、櫻井 孝、平田幸夫

神奈川歯科大学の教育改革-7. 神奈川歯科大学における e-learning システム(第 2 報)-

第 34 回日本歯科医学教育学会総会, 平成 27 年 7 月 10 日, 鹿児島市

山本信治、窪田光慶、花岡孝治、菅谷 彰、湯山徳行、林田丞太、木村幸司、李 正姫、櫻井 孝、平田幸夫

神奈川歯科大学の教育改革-8. 歯学部全学生における歯科関連事項に関する医科専門用語の認知度の実態調査-

第 34 回日本歯科医学教育学会総会, 平成 27 年 7 月 10 日, 鹿児島市

星野由美、窪田光慶、鈴木幸江、飯田貴俊、玉置勝司、山本信治、藤野富久江、山田直樹、岩城重次、平田幸夫

神奈川歯科大学の教育改革-11. 口腔機能管理シミュレータの活用を検討する 3 学科合同 FD ワークショップの取組-

第 34 回日本歯科医学教育学会総会, 平成 27 年 7 月 10 日, 鹿児島市

山本信治、菅原圭亮、柴原孝彦

口腔粘膜疾患に対する新たな蛍光観察装置(イルミスキャン^R)の検討

第 8 回日本口腔検査学会総会, 平成 27 年 10

月 3 日, 横須賀市

山本信治

口腔粘膜疾患に対する新たな蛍光観察装置(イルミスキャン^R)の開発

第 60 回日本口腔外科学会総会, 平成 27 年 10 月 16 日, 名古屋市

別所央城、恩田健志、薬師寺孝、大金 覚、野村武史、山本信治、高野伸夫、片倉 朗、柴原孝彦

個別検診をサポートする口腔がん検診ナビシステム

第 60 回日本口腔外科学会総会, 平成 27 年 10 月 16 日, 名古屋市

菅谷 彰、湯山徳行、林田丞太、花岡孝治、窪田光慶、山本信治、李 正姫、木村幸司、酒井奈菜子、熊田秀文、櫻井 孝

課外活動が学修効果、留年、休学へおよぼす影響に関する調査

第 50 回神奈川歯科大学学会総会, 平成 27 年 12 月 5 日, 横須賀市

菅谷 彰、湯山徳行、花岡孝治、窪田光慶、林田丞太、木村幸司、山本信治、櫻井 孝、平田幸夫

障害者差別解消法の施行に伴う障害学生の受け入れに対する歯学部の意識と現状に関する調査

第 35 回日本歯科医学教育学会総会, 平成 28 年 7 月 2 日, 大阪市

酒井奈菜子、窪田光慶、菅谷 彰、花岡孝治、櫻井 孝、湯山徳行、熊田秀文、山本信治、木村幸司、林田丞太、李 正姫、栗本勇輝、平田幸夫

歯学部学生のためのグローバル化とは 学生アンケート調査より

第 35 回日本歯科医学教育学会総会, 平成 28 年 7 月 2 日, 大阪市

11 林田丞太、木村幸司、窪田光慶、櫻井 孝、菅谷 彰、花岡孝治、山本信治、湯山徳行、李 正姫、熊田秀文、栗本勇輝、酒井奈菜子、平田幸夫

初年次教育プログラム「大学での学び」の学修成果 第 2 報

第 35 回日本歯科医学教育学会総会, 平成 28 年 7 月 2 日, 大阪市

12 窪田光慶、菅谷 彰、花岡孝治、湯山徳行、林田丞太、木村幸司、李 正姫、山本信治、熊田秀文、酒井奈菜子、栗本勇輝、櫻井 孝、平田幸夫

神奈川歯科大学における e-learning システム(第 3 報)

第 35 回日本歯科医学教育学会総会, 平成 28 年 7 月 2 日, 大阪市

13 木村幸司、林田丞太、李 正姫、栗本勇輝、酒井奈菜子、菅谷 彰、花岡孝治、櫻井 孝、湯山徳行、窪田光慶、熊田秀文、山本信治、平田幸夫

歯学部入学以前の生物履修がもたらす効果隠れた前提

第 35 回日本歯科医学教育学会総会, 平成 28 年 7 月 2 日, 大阪市

14 別所央城、恩田健志、薬師寺孝、大金 覚、野村武史、山本信治、高野伸夫、片倉 朗、柴原孝彦

東京歯科大学で行っている口腔がんナビシステム

第 61 回日本口腔外科学会総会，平成 28 年 11 月 25 日，千葉市

15 南雲達人、山本信治、近藤忠稚、菅原聖悠、田村摩衣子、田中優作、小野千草、中村 篤
アジスロマイシンが奏効した白色海綿様母斑の 2 例

第 61 回日本口腔外科学会総会，平成 28 年 11 月 25 日，千葉市

16 前山恵里、大野啓介、住吉美咲、大金 覚、別所央城、山本信治、高野正行、片倉 朗、齊藤 力、柴原孝彦

当科を受診した口腔がん患者の臨床的検討～
Tumor budding による予後予測～

第 62 回日本口腔外科学会総会，平成 29 年 10 月 20 日，京都市

17 辛 麻由、加藤禎彰、小山拓洋、布施 俊、住吉美咲、西山明宏、関根理予、大野啓介、吉田秀児、高木 亮、菅原圭亮、別所央城、渡邊章、山本信治、笠原清弘、高野正行、齊藤 力、柴原孝彦、片倉 朗

東京歯科大学水道橋病院口腔外科における
2016 年度初診患者の臨床検討

第 304 回東京歯科大学学会(総会)，平成 29 年 10 月 22 日，東京都

18 山本信治、大野啓介、吉田秀児、高野正行、柴原孝彦

新たな蛍光観察装置(ORALOOK^R)を用いた口腔粘膜疾患に対する使用経験

第 3 回日本顎顔面再建先進デジタルテクノロジー学会総会，平成 29 年 11 月 26 日，東京都

19 吉田秀児、小高研人、海老澤朋宏、安村敏彦、大野啓介、高梨琢也、渡邊 章、山本信治、松永 智、西井 康、齊藤 力、阿部伸一、末石研二、柴原孝彦

Dental Lab System の改変と脱 Model Surgery への挑戦

第 3 回日本顎顔面再建先進デジタルテクノロジー学会総会，平成 29 年 11 月 26 日，東京都

20 小山拓洋、笠原清弘、西山明宏、大野啓介、菅原圭亮、別所央城、山本信治、中島 啓、松坂賢一、高野正行、齊藤 力、柴原孝彦、片倉朗

口腔白板症に対する治療方針決定に関する臨床的検討

第 36 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会，平成 30 年 1 月 25 日，新潟市

21 長谷川大悟、前山恵里、関川翔一、大野啓介、吉田秀児、山本信治、中島 啓、松坂賢一、高野正行、齊藤 力、柴原孝彦

Stage 1、2 舌扁平上皮癌における Tumor budding の臨床的意義の検討

第 36 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会，平成 30 年 1 月 25 日，新潟市

〔図書〕(計 6 件)

Yamamoto N.(分担執筆)

Oral cancer -Epidemiology of the oral cancer-
Springer, 2015, 1-22.

山本信治

口腔外科ハンドマニュアル'15 -初メス体験記
初めての血管柄付き腓骨移植と Microsurgery-
クインテッセンス出版, 2015, 131-132.

山本信治(分担執筆)

臨床口腔外科学 -一からわかる診断から手術 -
悪性腫瘍手術(悪性腫瘍検査含む)-
医歯薬出版, 2016, 314-326.

山本信治

口腔外科ハンドマニュアル'16 口腔がん治療
における再建 軟組織(皮膚・粘膜)の再建
クインテッセンス出版, 2016, 22-28.

山本信治(分担執筆)

1336 専門家による 私の治療 2017-18 年度版
19. 歯科・口腔外科疾患

日本医事新報社, 2017, 1414-1417.

山本信治、柴原孝彦

口腔粘膜疾患の診断の助けとなる口腔内蛍光
観察装置

デンタルダイヤモンド, 2018, 192-196.

〔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：該当なし。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 信治 (YAMAMOTO, Nobuharu)

東京歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：6 0 3 8 5 1 8 5

(2) 研究分担者

柴原 孝彦 (SHIBAHARA, Takahiko)

東京歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：5 0 1 7 8 9 1 9

恩田 健志 (ONDA, Takeshi)

東京歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：3 0 4 3 3 9 4 9

(3) 連携研究者

該当なし。

(4) 研究協力者

該当なし。