

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2007 ～ 2009

課題番号：19390521

研究課題名（和文）：口腔癌における癌関連遺伝子のスプライシング異常の検討

研究課題名（英文）：Alternative splicing of cancer-related genes in oral squamous cell carcinoma.

研究代表者

杉原 一正 (SUGIHARA KAZUMASA)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：00117516

研究成果の概要（和文）：

口腔癌における癌関連遺伝子のスプライシング異常の検出を行い、臨床病理学的事項との関連について検討し、その結果を口腔癌の早期発見および治療に反映させるとともに分子標的治療のターゲットとなる分子マーカーを見出すことで治療成績の向上に寄与することを目的として本研究を企画した。107 例の口腔癌切除標本を用いて MUC1, MUC4, VEGF, SULF2 について蛋白質レベルで検討を加えた。また、口腔癌患者の含嗽液(55 例)を用いて癌関連遺伝子 mRNA の発現を RT-PCR で検索した。その結果は以下の通りである。

①Sulf2、MUC1 および MUC4 の発現は腫瘍の進展、リンパ節転移、ステージの進行、生存率に影響を与えた。②癌関連遺伝子の mRNA の発現を検索したところ、症例ごとに発現レベルの相違を認めた。③MUC1、VEGF および VEGFR の各スプライシングバリエントを特異的に選択するプライマーを開発し、培養細胞を用いてプライマーの特異性、感度を確認した。以上の結果より、SULF2、MUC1 および MUC4 の発現は、口腔扁平上皮癌の新しい有意な予後予測因子であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of the present study is to find markers, which might be molecules of targeted cancer therapy for the patients with oral squamous cell carcinoma(OSCC), by means of investigating the expression level of splicing isoforms of cancer-related genes in samples from patients with OSCC. The correlation between the expression level of several genes and clinicopathological factors was also evaluated. We harvested samples of the biopsy and operation in 107 patients with OSCC, and investigated the expression level of proteins of MUC1, MUC4, VEGF, and SULF2. Also mRNA expression of each cancer-related genes in the oral rinse obtained from 55 patients with OSCC was semi-quantitated by RT-PCR. The results obtained are as follows:

I. The expression level of SULF2, MUC1 and MUC4 was significantly correlated

with higher T classification, metastasis to regional lymph node, advanced tumor stage and poor prognosis. II. The expression levels of cancer-related genes were varied in each patient. III. The specific primer sets for MUC1, VEGF and VEGFR splicing variants were conducted, and those sensitivity and specificity were confirmed by using cultured cell. These results suggest that the expression level of SULF2, MUC1 and MUC4 gene might be the new useful prognostic factors of OSCC patients.

#### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度			
2006年度			
2007年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	4,600,000	1,380,000	5,980,000

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：口腔癌・予後因子・分子標的治療・スプライシング・mRNA・癌遺伝子・癌抑制遺伝子

#### 1. 研究開始当初の背景

2001年のヒトゲノムプロジェクトの概要の発表により、十数万程度と予測されていたヒトの遺伝子の総数は25,000～35,000に過ぎないことが明らかになり、予想以上に少ない遺伝子が多様なタンパク質を生み出していることが判明してきている。2001年、全ゲノム遺伝子の約7割が選択的スプライシングを受けており、これがヒトのタンパク質の多様性を生み出す機構の一つであることが明らかになった。したがって、選択的スプライシングは多細胞生物に特有の遺伝子発現制御機構として、これまでによく研究されている転写調節に勝るとも劣らない生物学的意義を有するものと考えられている。

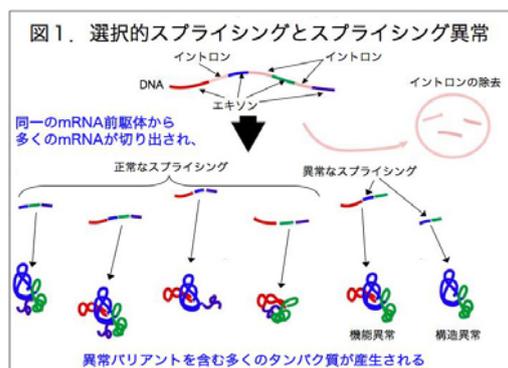
2003年、エキソン上の点変異の約15%はスプライシング異常を引き起こす可能性があることが発表され、疾患に関連するスプライシング異常は予想以上に数多く存在し、治療のターゲットとなりうる可能性が示唆されている。また近年、ヒト癌において、転写因子や細胞接着、シグナル伝達などに関わる多数の重要な蛋白質がスプライシング異常を起こしていることが報告されている。しかしながら、口腔癌においてはこれらの報告は少なく、スプライシング異常と再発・転移や予後との関連性が報告されている遺伝子はCD44のみである。これらのことから、スプライシング異常と口腔癌の発癌・転移・予後などとの関連性の検討が今後の推進すべき重

要な研究課題と思われ、今回の着想に至った。

## 2. 研究の目的

口腔顎顔面領域の悪性腫瘍は、その解剖学的位置から比較的発見しやすい部位に発症する。しかし早期の口腔癌などはしばしば自覚症状が乏しく、大きくなるまで放置される傾向があり、早期発見・治療という点では必ずしも満足できる現状にあるとは言えない。また口腔癌の進行例は、比較的早い時期から顎骨や隣接組織に浸潤拡大し、リンパ節に転移することがあり、これらは予後不良の原因となる。このような背景から、口腔癌の病態に直接関与し、早期発見や治療方針の決定に有用であり、かつ治療のターゲットとなる分子マーカーの登場が待たれている。

真核生物では、遺伝子のほとんどがイントロンによって分断化されて保存される。よって mRNA 前駆体からイントロンを除去しエキソン同士をつなぎ合わせるスプライシングは、遺伝子発現に必須な過程である。高等真核生物では、多くの遺伝子が多数のエキソンから構成され、その組み合わせにより複数種



類の遺伝子産物を産生する (= 選択的スプライシング、図1)。

また近年、悪性腫瘍を含むヒト疾患において、いくつかの蛋白質は異常な選択的スプライシング (=スプライシング異常) によってその機能が変化しているとの報告が増えつつある (図1)。

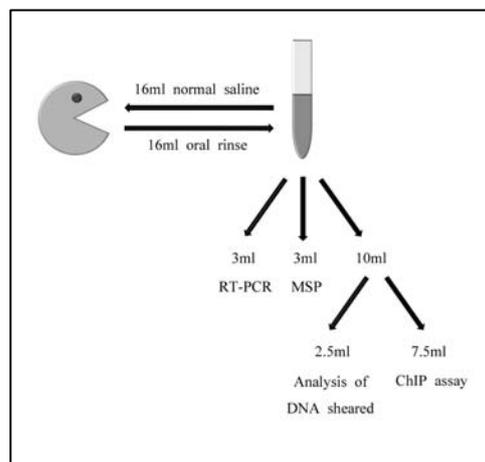
そこで今回我々は、口腔癌における癌関連遺伝子のスプライシング異常の検出を行い、浸潤・転移などの臨床病理学的事項との関連や予後に対する影響について検討し、有用な腫瘍分子マーカーを確立することで、その結果を早期発見および治療方針の決定へ反映し、治療成績の向上に寄与することを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究は鹿児島大学大学院医歯学総合研究科内の倫理委員会の承認の上、実施された。

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・口腔顎顔面センター・口腔外科を受診した口腔癌および前癌病変患者 40 例とボランティアの口腔健常者 22 例より口腔含嗽液を採取した。

含嗽液は口腔癌症例および健常者からわれわれの考案したプロトコル (下図) に従い採取され、DNA 抽出用、mRNA 抽出用、タンパク質精製用にそれぞれ 3, 3,



9ml に分注され、2000rpm で 5 分間遠心分離されたのち以後のステップに使用された。

また、回顧的なタンパク質発現の検討のために、157 例の口腔癌患者の切片標本が作製され、HE 染色および免疫組織化学的染色がなされると同時に臨床病理学的情報が収集

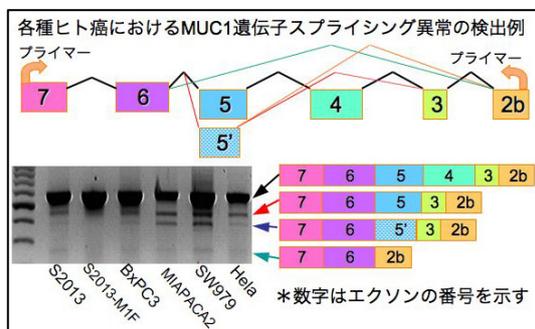
された。

MUC1、MUC4、VEGF および SULF2 に関しては口腔癌症例 157 例を用いてタンパク質レベルで検討を加えた。また、実際の症例から得た含嗽液 (62 例) を用いて各癌関連遺伝子 (MUC1、MUC4、VEGF、p16、DAPK、E-cadherin、p15、FHIT、SPARC、RASFF1A、TIMP3、RAR  $\beta$ 、TMEFF2、HIN-1、WIF-1、NGALR、SULF2) mRNA の発現を RT-PCR にて検索した。MUC1、VEGF および VEGFR の各スプライシングバリエントを特異的に選択するプライマーを開発し、培養細胞を用いてプライマーの特異性、感度を確認した。

統計学的評価と検討は、結果と臨床病理学的事項とを比較し、カイ二乗検定やマン・ホイットニーU 検定を用いて統計結果の P 値 0.05 以下に有意差があるとした。

#### 4. 研究成果

まずわれわれは、6 種類の癌細胞株を用いて、癌関連遺伝子の発現の検出を行うことで、実験手技および解析手法を確立した。⑤また、MUC1、VEGF および VEGFR の各スプライシングバリエントを特異的に選択するプライマーを開発し、培養細胞を用いてプライマーの特異性、感度を確認した。下図は MUC1 遺伝子の各スプライシングバリエントに対応した特異的 PCR プライマーの良好な感度・特異性を示す。



つぎに、MUC1、MUC4、VEGF および SULF2 に関

しては口腔癌症例 107 例を用いてタンパク質レベルで検討を加えた。また、実際の症例から得た含嗽液 (55 例) を用いて各癌関連遺伝子 mRNA の発現を RT-PCR にて検索した。結果は以下の通りである

①MUC1 および MUC4 の過剰発現は腫瘍の進展、リンパ節転移、ステージの進行と有意に関連していた。②Sulf2 非発現群、MUC1 および MUC4 発現群は、頸部リンパ節転移を有する危険性が有意に高かった。③MUC1 および MUC4 ムチンの発現群は非発現群と比較して有意に生存率が低かった。④RT-PCR を用いて MUC1、MUC4、VEGF、p16、DAPK、E-cadherin、p15、FHIT、SPARC、RASFF1A、TIMP3、RAR  $\beta$ 、TMEFF2、HIN-1、WIF-1、NGALR、SULF2 遺伝子の mRNA の発現を検索したところ、症例ごとに発現レベルの相違を認めた。

以上の結果より、SULF2、MUC1 および MUC4 の発現は、口腔扁平上皮癌の新しい有意な予後予測因子であることが示唆された。今後は各遺伝子の個別のスプライシングバリエントに対するプライマーを開発し、個々の症例に対して検討を加え、有用な分子マーカーを検討していく予定である。

#### 5. 主な発表論文等

〔学会発表〕 (計 3 件)

①浜田倫史、若松常信、宮原麻由美、上村祐二、永田聡、野村昌弘、杉原一正

MUC4 ムチンの発現は口腔扁平上皮癌の予後予測因子となりうる

第 28 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会

2010 年 1 月 28 日 東京都

②楠元孝宣、浜田倫史、山田宗茂、後藤正道、米澤傑、向井洋、杉原一正、口腔含嗽液からの腫瘍抑制遺伝子プロモーター領域における DNA 異常メチル化とヒストン修飾状態の検

討,

日本口腔科学会総会

2008年4月 福岡市

③ 浜田倫史、楠元孝宣、若松常信、向井洋、  
杉原一正、

口腔含嗽液からのDNAメチル化異常検出による  
口腔癌および発癌ハイリスク群スクリー  
ニング法の確立

第26回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会

2008.01.25 別府市

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

杉原 一正 (SUGIHARA KAZUMASA)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：00117516

### (2) 研究分担者

上川 善昭 (KAMIKAWA YOSHIAKI)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・助教

研究者番号：30332901

坂元 亮一 (SAKAMOTO RYOICHI)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：60452950

浜田 倫史 (HAMADA TOMOFUMI)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・助教

研究者番号：00444894

上川 泰子 (KAMIKAWA YASUKO)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教務職員

研究者番号：70253903

### (3) 研究協力者

楠元 孝宣 (KUSUMOTO TAKANOBU)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・大学院生

永田 聡 (NAGATA SATOSHI)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・大学院生

上村 祐二 (KANMURA YUJI)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・大学院生