

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 21年 4月 10日現在

研究種目： 基盤研究 (C)
 研究期間： 2007~2008
 課題番号： 19592286
 研究課題名 (和文) 免疫関連遺伝子多型を用いて口腔多発癌に有用な疾患感受性マーカーを探る
 研究課題名 (英文) Susceptible gene search using single nucleotide polymorphism analysis in multiple primary oral cancer
 研究代表者
 藤田 一 (FUJITA HAJIME)
 新潟大学・医歯学系・助教
 研究者番号： 60271805

研究成果の概要：

口腔多発癌発症の背景の解明のため遺伝子多型解析を行った。口腔多発癌 27 名、口腔単発癌 133 名 (全て扁平上皮癌)、健常者 99 名の免疫関連遺伝子 14 種についてナノインベーター法にて SNP を検出し、遺伝統計学的解析を行った結果、IgA Fc α RI(+56)に有意差を認め、口腔多発癌における疾患感受性マーカーとなる可能性が示唆された。一方、MMP-1(-1607)にも有意差を認めたが、これらは癌の悪性度との関連による結果と考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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： (1) 口腔多発癌 (2) 疾患感受性遺伝子 (3) SNP 解析
 (4) 免疫グロブリン受容体 (5) サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

口腔多発癌は、従来の疫学的研究から、口腔癌の中でも女性に発症する頻度が高く、低悪性度で粘膜表在性癌の特徴を示すことが多いとされ、その発症には前癌病変の存在が危険因子として示唆されている。実際の臨床の場において口腔多発癌は、単発の浸潤癌とは臨床的な様相が異なることを多く経験しており、これまでに臨床的、あるいは病理学的に検討を行った報告は見られるものの、発症の背景に関する分子遺伝学的検討は国内外において報告がない。

しかし、女性に発症する頻度が高いこと、粘膜表在癌は金属アレルギーや口腔カンジダ症、歯周炎などの感染症との関連が示唆されていることなどから、口腔多発癌の発症には、field cancerization といった局所的環境要因のみならず、単発癌とは異なる遺伝的背景があり、これには特に免疫学的な関与が推測され、今後、全身的遺伝要因を解明していくためには、関連が考えられる遺伝子座の多型解析を行う必要がある。

ところで、IgG Fc γ R 遺伝子多型は、様々な感染症や自己免疫疾患との関連性が報告

されている。また、最近では抗体産生性B細胞特異的Fc受容体、粘膜免疫に重要なIgA Fc受容体、炎症性サイトカイン遺伝子、細胞外基質分解酵素(MMP-1など)の多型も、生体防御能に関連した遺伝要因のマーカーとして、様々な疾患での意義が報告されている。これまで私たちは、平成17-18年度科学研究費補助金基盤研究(C)課題番号17592067(研究代表者:藤田 一)にて、従来から免疫機構の関与が考えられているが、未だに詳細な原因が不明である口腔扁平苔癬について、免疫関連遺伝子14種類のSNPについて検索し、IgG Fc γ RIIIb(NA)においてNA2アレルの頻度、保有率が高い傾向があったが有意差は得られなかった一方、TNFRII(+587)においてGアレルの頻度、保有率が有意に高く、口腔扁平苔癬における疾患感受性マーカーとなる可能性が示唆されたという結果を得ている。

私たちはこれらの免疫関連遺伝子は、口腔多発癌においても同様に有用なマーカーになりうる可能性を考えており、これまでの研究の手法を応用し、以上の14種類のSNPを検出し、更に臨床病態などについて検討を加えることにより、口腔多発癌の免疫に関連した遺伝的背景の検証と有用な疾患感受性マーカーの選定を行おうと考えた。

2. 研究の目的

IgG Fc受容体(FcR)などの免疫グロブリン、TNF- α 、MMP-1などのサイトカインの遺伝子多型(SNP)は、口腔多発癌の疾患感受性マーカーになりうるか:

口腔多発癌におけるIgG Fc受容体、サイトカインなど様々な免疫関連遺伝子の多型を検出し、臨床ならびに病理組織所見に加え、実際の治療経過、予後を比較検討することにより、口腔多発癌の発症における有用な疾患感受性マーカーの選定を行うことを第一の目的とし、口腔癌患者における口腔多発癌の易罹病性診断への応用を目指す。

3. 研究の方法

(1) 患者および健常人からのゲノム DNA 抽出:

新潟大学医歯学総合病院口腔外科では、従来から継続治療をしている口腔癌患者約300~400名(うち口腔多発癌患者約30~40名)に加え、年間20名前後の新患がある。これらの患者のうち、研究の主旨を説明して同意書に署名をいただいた患者について末梢血採血を行い、フェノール/クロロホルム法にてゲノムDNAを抽出する。

(2) 免疫関連遺伝子14種類の遺伝子多型の検出:

免疫関連遺伝子多型の検出のために独自に作成したTaqMan MGBプローブ&プライマーセットによってリアルタイムPCRによ

る遺伝子多型(SNP)検出を患者(口腔多発癌)群とpositive control(口腔単発癌)群、健常者群の三者について行う。

(3) 統計処理:

患者群とpositive control群、健常者群において、14種類の遺伝子多型(SNP)のアレル頻度、遺伝子型頻度、アレル保有率について統計学的に検討する。

4. 研究成果

(1) 緒言

口腔多発癌は、単発の浸潤癌とは臨床的な様相が異なることを多く経験している。これまでに臨床的、病理学的に検討がなされ、口腔多発癌は、女性に発症する頻度が高く、低悪性度で粘膜表在性癌の特徴を示すことが多いとされ、その発症に前癌病変の存在が危険因子として指摘されている。

粘膜表在癌は、金属アレルギーや口腔カンジダ症、歯周炎などの感染症との関連が示唆されており、口腔多発癌の発症には、field cancerizationといった局所的環境要因の関与が考えられる。一方、生体防御能や刺激感受性など単発癌と異なる全身的遺伝要因も考えられ、これには特に免疫学的な関与が推測される。

そこで私たちは、疾患感受性マーカーとして免疫関連遺伝子の多型(SNP)を用い、口腔多発癌における分子遺伝的背景について検討を行ったので報告をする。

(2) 対象および方法

新潟大学歯学部倫理委員会の審査と承認を受け、口腔多発癌患者(OMC)27名、対照として口腔単発癌患者(OSC)133名(いずれも扁平上皮癌)、健常者(HC)99名を対象とし、インフォームドコンセントを得た上で末梢血採血を行い、ゲノムDNAを抽出した。対象は全て日本人で、内訳は、多発癌群では男性15名、女性12名、初診時年齢21~83歳(平均57.0歳)、単発癌群では男性88名、女性45名、初診時年齢21~88歳(平均56.2歳)、健常者群では男性50名、女性49名、採血時年齢28~35歳(平均24.7歳)であった。

免疫グロブリン受容体5項目(Fc γ RIIa(131), Fc γ RIIb(775), Fc γ RIIIb(NA), Fc α RI(324), Fc α RI(56))、サイトカイン8項目(IL-1a(+4845), IL-1b(-31), IL-1ra(+2018), IL-2(-330), IL-6(-572), IL-10(-1087), TNFRII(+587), TGF- β 1(-509))、蛋白分解酵素1項目(MMP-1(-1607))の計14種類についてナノインバーダー法にてSNPを検出し、各遺伝子座について、遺伝子型頻度、アレル頻度、アレル保有率を解析後、カイ二乗検定にてp値、オッズ比(OR)、相対危険度(RR)を求めた。

(3) 結果

IgA FcαRI(+56)において、多発癌群では健常者群に比べて C アリルの頻度が有意に高く (p=0.0499) (図 1)、遺伝子型を CC と TC+TT の 2 群に分けるとホモ接合型 CC の頻度が有意に高く (p=0.0171)、OR 3.37、RR 2.37 と高値を認めた (図 2) が、単発癌群と健常者群、多発癌群と単発癌群との間には有意差は認められなかった。

また、MMP-1(-1607)において、遺伝子型頻度では、単発癌群は健常者群、多発癌群の各々に比して有意差が認められた (p=0.0165, 0.0011)。アリル保有率では、単発癌群は健常者群に比べて 2G アリルの保有率が有意に高く (p=0.0060)、OR 3.47、RR 1.98 であった。一方、多発癌群は単発癌群に比べると 2G アリルの保有率は有意に低く (p=0.0005)、OR 6.30、RR 3.65 であった。

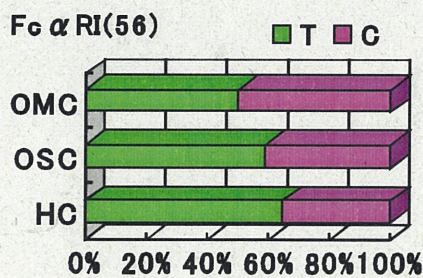


図 1

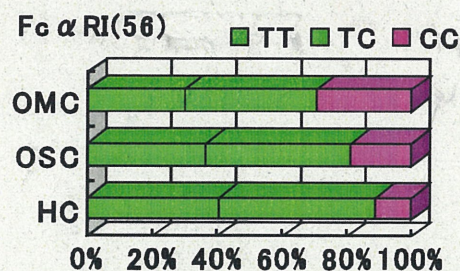


図 2

OMC : 口腔多発癌群
OSC : 口腔単発癌群
HC : 健常者群

(4) 考察

IgA 抗体は、主に分泌液中に存在し、ウイルスや細菌毒素に結合して、中和抗体として働いており、粘膜免疫において重要な役割を担っている。IgA を特異的に認識する Fc 受容体 (FcαR) は、単球・マクロファージ、好中球、好酸球で発現しており、これらの細胞は IgA によって活性化され、貪食や活性酸素の生成、抗体依存性細胞介在性細胞傷害 (ADCC) 活性、さらには炎症性メディエーターの放出を起こすことが知られている。ま

た、FcαR と疾患との関わりについては、アレルギー患者では末梢血好酸球の FcαR が増加していると報告されており、好酸球が FcαR を介して、アレルギーにおける炎症に何らかの関与をしている可能性が示唆されている。

ところで、FcαRI(+56)/T/C は、IgA 受容体のプロモーター領域の遺伝子多型であり、T→C 置換によって FcαR の転写を上昇させることが知られており、CC>TC>TT の順に転写活性が高い。IgA 腎症患者では、T→C 変異の頻度が有意に高く、FcαR の産生量の増加が可溶性 FcαR (sCD89) 量を増加させ、結果的に IgA 腎症の発症あるいは進展に寄与している可能性が示唆されている。

口腔単発癌と健常者間には有意差は認められなかったが、口腔多発癌と健常者間には有意に C アリルやホモ接合型 CC の頻度が高かった。これらのアリル、遺伝子型により増加した FcαR が、口腔内の金属アレルギーや慢性炎症に対する過剰反応を生じて、これらの背景が口腔多発癌を生じやすくしている可能性が考えられる。

以上により、IgA FcαRI(+56)は口腔多発癌における疾患感受性マーカーとしての有用性が示唆され、C アリルあるいはホモ接合型 CC は危険因子であると考えられた。

一方、MMP-1 は、細胞外基質を構成する Type I コラーゲンを分解するコラーゲン分解酵素であり、正常組織では MMP-1 発現レベルは低く、発癌物質・増殖因子・炎症性細胞の刺激により発現レベルが上昇し、癌細胞では恒常的な MMP-1 発現レベルの上昇が生じていることが知られている。また、2G アリルでは新たな転写因子結合部位が出現し、MMP-1 転写活性が上昇するとされ、癌の悪性度との関連を示唆する報告も見られる。

今回の結果において、MMP-1(-1607)は口腔単発癌で 2G アリルの保有率が高かったが、口腔多発癌ではむしろ 2G アリルの保有率が低かった。口腔多発癌では、臨床的に低悪性度の粘膜表在癌を認めることが多く、これらの結果は、口腔単発癌発症との関連よりも、それぞれの癌の悪性度との関連による結果と考えられた。

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 1 件)

1. Fujita H, Kobayashi T, Tai H, Nagata M, Hoshina H, Nishizawa R, Takagi R, Yoshie H : Assessment of 14 functional gene polymorphisms in Japanese patients with oral lichen planus: a pilot case-control study. International Journal of Oral and

Maxillofacial Surgery, 38, 2009 (in press),
査読有

[学会発表] (計 1 件)

1. 藤田 一: 口腔多発癌における SNP 解析
による疾患感受性遺伝子の探究. 第 53 回日
本口腔外科学会総会, 2008 年 10 月 20~21 日,
徳島市

[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]

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田 一 (FUJITA HAJIME)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号: 60271805

(2) 研究分担者

高木 律男 (TAKAGI RITSUO)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号: 20143795

星名 秀行 (HOSHINA HIDEYUKI)

新潟大学・医歯学総合病院・講師

研究者番号: 30173587

永田 昌毅 (NAGATA MASAKI)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号: 10242439

吉江 弘正 (YOSHIE HIROMASA)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号: 20143787

小林 哲夫 (KOBAYASHI TETSUO)

新潟大学・医歯学総合病院・准教授

研究者番号: 00215344

(3) 連携研究者

なし