

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目： 基盤研究 (C)
 研究期間： 2007 ~ 2009
 課題番号： 19592335
 研究課題名 (和文) 口腔扁平上皮癌の頸部リンパ節転移に関わる染色体・遺伝子異常の解析
 研究課題名 (英文) Analysis of chromosomal and genetic alterations related to nodal metastasis of oral squamous cell carcinoma

研究代表者
 土井田 誠 (TOIDA MAKOTO)
 岐阜大学・大学院医学系研究科・准教授
 研究者番号： 90313890

研究成果の概要 (和文)：口腔扁平上皮癌の頸部リンパ節転移に関わる分子生物学的背景を明らかにするため、2,386 個の BAC クローンを搭載した高解像度全ゲノム CGH アレイを用いて、同一症例より同時に採取された 5 対 (10 検体) の原発巣/転移巣由来 DNA についてアレイ CGH 解析を行った。その結果、原発巣には認められない転移巣特有の変異が検出され、複数例の転移巣に共通する高度の変異も認められた。既知の転移関連遺伝子のコードされていない異常領域もいくつか見出され、これらの領域に未知の転移関連遺伝子が含まれている可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：In order to clarify the molecular biological background of cervical lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma, a microarray-based comparative genomic hybridization (array-CGH) technique with high-resolution pan-genomic CGH microarray containing 2,386 BAC clones was applied to five pairs of DNA samples which were obtained simultaneously from both primary and metastatic lesions in the same five patients. The array-CGH analysis revealed metastasis-specific chromosomal alterations, some of which were of high-grade and were detected commonly in two or more cases. Moreover, there were some chromosomal regions with metastasis-specific alterations, on which none of the known metastasis-associated genes have been coded; such regions may include unknown metastasis-associated oncogenes and/or suppressor genes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 歯学・外科系歯学 (臨床腫瘍学)

キーワード： 遺伝子、癌、ゲノム、歯学、リンパ節転移

1. 研究開始当初の背景

頸部リンパ節転移の有無は口腔扁平上皮

癌の最も重要な予後因子のひとつである。最近のマイクロアレイ法を用いた研究では、

本腫瘍の頸部リンパ節転移に関与する遺伝子/遺伝子産物として、E-カドヘリン/カテニン、インテグリンの一部、CD44、EGFR、MMPの一部、PLC γ -1、FAK (Howell GM and Grandis JR: *Head Neck* 27: 710-717, 2005)、EGFR、FGF4/FGF3、CCND1、EMS1、A1B1 (Chen YJ et al: *J Pathol* 204: 326-332, 2004)などが示唆されている。

近年、ゲノム/ポストゲノム研究の進展により、数十万〜数百万塩基対に及ぶゲノム染色体上の大規模な構造異常(増幅、欠失等のDNAコピー数異常)や非コード領域を含むゲノム全領域にわたる数万〜数十万塩基対レベルの染色体異常が存在し、癌や遺伝疾患と密接に関係していることが解明され始め、癌転移の成立にも関与していることが明らかにされつつあるが、マイクロアレイ法では検出できないこのような大規模な異常を全染色体上で網羅的に解析する方法としてCGH(comparative genomic hybridization)法がある。従来のCGH法は、腫瘍細胞と正常細胞とに由来するDNAを各々異なる蛍光色素で標識し、正常分裂中期染色体伸展標本に競合的にhybridizeさせることにより、腫瘍細胞に特異的に発現しているDNA数の異常増/減領域を全染色体上において網羅的に検出する方法で、今日では染色体CGH(chromosome-based CGH)法と呼ばれている。

しかしながら、従来の染色体CGH法の解像度はあくまでも染色体レベルであり、数十万〜数百万塩基対レベルの異常でなければ検出できないという弱点がある。この弱点を補うべく、近年、ヒト全ゲノムを数万個に及ぶBAC(バクテリア人工染色体)クローンによって間断なくカバーした高解像度全ゲノムCGHアレイが開発され、これを用いたアレイCGH(microarray-based CGH)法が確立された(Solinas-Toldo S et al: *Genes Chromosomes Cancer* 20: 399-407, 1997; Pinkel D et al: *Nat Genet* 20: 207-211, 1998; Ishkanian AS et al: *Nat Genet* 36: 299-303, 2004)。

頭頸部扁平上皮癌の転移に関しては、これまで染色体CGH法を用いた研究が多く行われており、頸部リンパ節転移を伴わない腫瘍と伴う腫瘍におけるCGH所見を比較検討した研究(Weikobosky HJ et al: *Ann Otol Rhinol Laryngol* 109: 401-410, 2000, Lin SC et al: *Oral Oncol* 38: 266-273, 2002)や同一患者における原発巣とそれに対応するリンパ節転移巣を比較検討した研究(Tremmel SC et al: *Cancer Genet Cytogenet* 144: 165-174, 2003, Patmore HS et al: *Br J Cancer* 90: 1976-1982, 2004)では、非転移症例/原発巣に比して転移症例/転移巣で1q、11q、19q、22q領域の増

幅や10q、11pの欠失(減少)などの異常が比較的共通して認められている。しかしながら、アレイCGH法を用いた研究はいまだ少なく、特に同一患者における原発巣とそれに対応するリンパ節転移巣における異常を比較検討した研究は、今日までほとんど行われていない。染色体CGH法では転移関連遺伝子の特定にまで至ることは極めて困難であるが、アレイCGH法による解析は、その解像度の高さから、転移関連遺伝子の特定や未知の転移関連遺伝子の検出に直結する情報を提供し得ることが期待でき、口腔扁平上皮癌の頸部リンパ節転移を左右する分子生物学的背景を解明する上で必要不可欠と考えられる。

2. 研究の目的

頸部リンパ節転移を有する同一の口腔扁平上皮癌患者より同時に採取された原発巣と転移巣における腫瘍細胞DNAコピー数の異常を、アレイCGH法を用いて解析・比較検討し、転移に関わる染色体異常領域を特定することにより、本腫瘍の頸部リンパ節転移に関わる分子生物学的背景の一端を明らかにすることを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 検索症例: 術前治療のされていない、頸部リンパ節転移を有する口腔扁平上皮癌患者5例について検索を行った。検索症例の内訳(年齢、性別、発生部位、ステージ分類、分化型、転移リンパ節数/廓清リンパ節数)は以下の如くである。症例①: 76歳、男性、右側口底、pT2N2bM0、中分化型、23/51; 症例②: 81歳、女性、右側頬粘膜、pT2N1M0、高分化型、1/25; 症例③: 44歳、女性、右側舌縁、pT2N1M0、高分化型、1/36; 症例④: 65歳、女性、左側下顎歯肉、pT2N2bM0、高分化型、4/49; 症例⑤: 79歳、男性、左側上顎歯肉、pT4N1M0、高分化型、4/31。

(2) 試料の採取と保管: 試料提供者の同意を文書にて得た上で、手術によって同時に体外に取り出された口腔扁平上皮癌の原発巣と同一患者の頸部リンパ節転移巣より、組織片(試料)をペアで採取し、液体窒素にて凍結し、ディープフリーザー(-180°C)に保管した。凍結試料よりDNAを抽出・精製し、使用まで冷蔵保存した。また凍結試料より凍結切片を作成し、そのヘマトキシリン・エオジン染色標本にて、切片面積中に占める腫瘍細胞の面積の割合が70%以上であることを確認した。

(3) アレイCGH解析: 2,386個のBACクローンを搭載した高解像度全ゲノムCGHアレイ(Microarray Core, UCSF Comprehensive Cancer Center, USA)

(Snijders AM et al: *Brief Funct Genom Proteom* 2: 37-45, 2003; Ishkanian AS et al: *Nat Genet* 36: 299-303, 2004)を用いてアレイCGH解析を行った。腫瘍細胞由来の高分子DNAをCy3、対照DNAをCy5にてそれぞれ標識し、アレイCGHを行い、Cy3/Cy5 蛍光強度比 (Log₂比) が 0.25 以上をコピー数増加、-0.25 以下をコピー数減少とした。

4. 研究成果

アレイCGH解析結果をもとに、アレイ搭載BACクロンを、①原発巣・転移巣のいずれにおいてもDNAコピー数の異常を示さないもの(NN群)、②/③原発巣・転移巣のいずれにおいてもDNAコピー数の増加/減少を示すもの(GG群/LL群)、④/⑤原発巣ではDNAコピー数の増加/減少を示すが転移巣で異常を示さないもの(GN群/LN群)、⑥/⑦原発巣では異常を示さないが転移巣でDNAコピー数の増加/減少を示すもの(NG群/NL群)の計7群に分類した。

基本的に、NN群は口腔扁平上皮癌の発生・局所進展・転移のいずれにも関連しないBACクロン、GG群/LL群は、その過剰発現/発現低下が主に口腔扁平上皮癌の発生・局所進展に関連する癌/抑制遺伝子を含むBACクロン、GN/LN群は、主に頸部リンパ節転移を生じた後に原発巣で過剰発現/発現低下を来す癌/抑制遺伝子を含むBACクロン(転移を生じた後の原発巣の局所進展に関連するBACクロン)、NG群/NL群は、その過剰発現/発現低下が主に口腔扁平上皮癌の転移に関連する癌/抑制遺伝子を含むBACクロン(転移関連BACクロン)と考えることができる。

NN群に属するBACクロンは、全搭載BACクロン2,386個のうち、症例①、②、③、④、⑤において、それぞれ2,078個、2,024個、1,991個、1,961個、2,197個であり、どの症例においても概ね80~90%程度のクロンは口腔扁平上皮癌の発生・局所進展・転移に関連していない(換言すれば、全クロン中わずか10~20%のBACクロンが口腔扁平上皮癌の発生・局所進展・転移に関連している)と考えられた。

GG群/LL群に属するBACクロンは、症例①、②、③、④、⑤において、それぞれ41個/12個、22個/58個、34個/132個、55個/142個、5個/3個であった。2例以上に共通して異常を示すクロンがGG群/LL群で各々17個/40個認められ、特にLL群BACクロンのうちRP11-86J21(21q21)は5例中4例に、RP11-1L22(2q21.2)、RP11-32F23(3q26)、RP11-11L6(3p23-p24)、RP11-108A8(3p14)、RP11-254E10(8p22-p23.1)、RP11-51C1(8p21.3)、RP11-181G18

(21q11.2-q21)の7クロンは5例中3例に共通して異常を示し、GG群BACクロンのうちRP11-83014(8q12.1)、RP11-24C23(8q24.1)、RP11-128G18(8q24.1)、RP11-184M21(8q24.2)の4クロンが5例中3例に共通して異常を示した。

GN群/LN群に属するBACクロンは、症例①、②、③、④、⑤において、それぞれ108個/112個、46個/47個、20個/62個、6個/19個、16個/4個であった。2例以上に共通して異常を示すクロンがGN群/LN群で各々24個/23個認められ、特にGN群BACクロンのうちRP11-105K5(8q11.22)、RP11-131D12(8q22.2)、RP11-125021(8q22)、RP11-10G10(8q22.2)、CTD-2063K20(9q34)、RP1-81F12(20qter)の6クロンと、LN群BACクロンのうちRP11-204M16(8p21.3)が5例中3例に共通して異常を示した。

NG群/NL群に属するBACクロンは、症例①、②、③、④、⑤において、それぞれ18個/17個、112個/77個、86個/61個、50個/153個、152個/9個であった。2例以上に共通して異常を示すクロンはNG群/NL群で各々75個/18個認められ、特にNG群BACクロンのうちRP1-164D18(7pter)、GS1-124N22(7p21.3b-21.3c)、GS1-20208(7p12.2a)、RP11-10G10(8q22.2)の4クロンは5例中3例に共通して異常を示した。NL群では5例中3例以上に共通して異常を示すBACクロンはみられなかったが、5例中2例に共通して異常を示した18クロンのうち特にRP11-94J9(4q28)*#、RP11-40D5(4q28)*#、RP11-218I24(4q28-q31.1)#、RP11-231J7(4q32)*#、RP11-234M13(13q21.1)#、RP11-85E15(15q23)*の6クロンに関しては、原発巣に対して転移巣のCy3/Cy5 蛍光強度Log₂比が5倍以上(*)、あるいは転移巣における同Log₂比が5以上(#)の高度な変異を示す症例が認められた。

今回のアレイCGH解析で得られた口腔扁平上皮癌の頸部リンパ節転移に関連すると思われる染色体領域(NG群/NL群BACクロンに相当する染色体領域)には、DNAコピー数の増加領域に、EGFR(7p12)、TNS3(7p12.3)、LRP12(8q22)など、これまでに頭頸部扁平上皮癌の転移関連遺伝子として報告のある癌遺伝子が、また、減少領域に、LM07(13q21-q22)、HHIPなど、同腫瘍の転移抑制に関わる遺伝子として報告のある癌抑制遺伝子が含まれているが、既知の候補遺伝子のコードされていない変異染色体領域も検出されており、このような領域には未知の転移関連遺伝子が含まれている可能性がある。

癌転移の成立には、これら既知・未知の転移関連遺伝子、さらには非コード領域も巻き込んだゲノム染色体上の大規模な構造異常(増幅、欠失等のDNAコピー数異常)が多因

子的・複合的に関連していると考えられるが、今回の研究は、口腔扁平上皮癌の転移に関わる複雑な分子生物学的背景の一端を解明する契機になり得ると考えられる。

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8件)

- ① Makoto TOIDA, Yuki NANYA, Tomoko TAKEDA-KAWAGUCHI, Seiji BABA, Kazuki IIDA, Keizo KATO, Daijiro HATAKEYAMA, Hiroki MAKITA, Tomomi YAMASHITA, Toshiyuki SHIBATA: Oral complaints and stimulated salivary flow rate in 1188 adults. *Journal of Oral Pathology & Medicine* (査読有) 39: in press, 2010.
- ② Tomomi YAMASHITA, Makoto TOIDA, Keizo KATO, Nguyen Khanh LONG, Yasuo MIYAZAKI, Yuichiro ASAKA, Daijiro HATAKEYAMA, Kazuhiro YONEMOTO, Hiroki MAKITA, Yukihiro KATO, Toshiyuki SHIBATA: The effects of neoadjuvant therapy on the 5-fluorouracil metabolic and relative enzymes of oral squamous cell carcinoma. *Oncology Reports* (査読有) 22(3): 501-507, 2009.
- ③ Makoto TOIDA, Keizo KATO, Hiroki MAKITA, Nguyen Khanh LONG, Tomoko TAKEDA, Daijiro HATAKEYAMA, Tomomi YAMASHITA, Toshiyuki SHIBATA: Palliative effect of lafutidine on oral burning sensation. *Journal of Oral Pathology & Medicine* (査読有) 38(3): 262-268, 2009.
- ④ Nguyen Khanh LONG, Keizo KATO, Tomomi YAMASHITA, Hiroki MAKITA, Makoto TOIDA, Daijiro HATAKEYAMA, Akira HARA, Hideki MORI, Toshiyuki SHIBATA: Hypermethylation of the RECK gene predicts poor prognosis in oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncology* (査読有) 44(11): 1052-1058, 2008.
- ⑤ Keizo KATO, Nguyen Khanh LONG, Hiroki MAKITA, Makoto TOIDA, Tomomi YAMASHITA, Daijiro HATAKEYAMA, Akira HARA, Hideki MORI, Toshiyuki SHIBATA: Effects of green tea polyphenol on methylation status of RECK gene and cancer cell invasion in oral squamous cell carcinoma cells. *British Journal of Cancer* (査読有) 99(4): 647-654, 2008
- ⑥ 畠山大二郎, 楠 幸博, 牧田浩樹, 山下知己, 土井田 誠, 柴田敏之: 術後に傍咽頭リンパ節に転移をきたした口腔扁平上皮

癌の2例. *日本口腔診断学会雑誌* (査読有) 21(1): 45-48, 2008.

- ⑦ Hiroki MAKITA, Michihiro MUTOH, Takayuki MARUYAMA, Kazuhiro YONEMOTO, Atsushi KOBAYASHI, Hideki FUJITSUKA, Makoto TOIDA, Toshiyuki SHIBATA, Shingo MIYAMOTO, Yumiko YASUI, Rikako SUZUKI, Keiji WAKABAYASHI, Takuji TANAKA: A prostaglandin E2 receptor subtype EP1-selective antagonist, ONO-8711, suppresses 4-nitroquinoline 1-oxide-induced rat tongue carcinogenesis. *Carcinogenesis* (査読有) 28(3): 677-684, 2007.
- ⑧ Nguyen Khanh LONG, Hiroki MAKITA, Tomomi YAMASHITA, Makoto TOIDA, Keizo KATO, Daijiro HATAKEYAMA, Toshiyuki SHIBATA: Chemopreventive effect of fermented brown rice and rice bran on 4-nitroquinoline 1-oxide-induced oral carcinogenesis in rats. *Oncology Reports* (査読有) 17(4): 879-885, 2007.

[学会発表] (計13件)

- ① 土井田 誠: 口腔病変の肉眼所見(3). 第20回日本臨床口腔病理学会スライドセミナー(2009年8月20日, 札幌市, ロイトン札幌).
- ② 山下知己, 土井田 誠, 加藤恵三, Long Nguyen KHANH, 宮崎康雄, 浅香雄一郎, 米本和弘, 畠山大二郎, 牧田浩樹, 柴田敏之: 喫煙と飲酒が口腔扁平上皮癌患者の5-FU代謝酵素に与える影響. 第33回日本頭頸部癌学会(2009年6月10-12日, 札幌市, ロイトン札幌).
- ③ 加藤恵三, 宮崎康雄, 馬場政司, 畠山大二郎, 牧田浩樹, 山下知己, 土井田 誠, 柴田敏之: RECK 遺伝子のメチル化と予後との相関および脱メチル化による浸潤制御の可能性. 第63回日本口腔科学会総会(2009年4月16-17日, 浜松市, アクティ浜松).
- ④ 畠山大二郎, 牧田浩樹, 加藤恵三, 山下知己, 土井田 誠, 柴田敏之: 顎骨中心性癌と考えられた4例. 第27回日本口腔腫瘍学会(2009年1月29-30日, 宇都宮市 栃木県総合文化センター).
- ⑤ 馬場政司, 宮崎康雄, 加藤恵三, 牧田浩樹, 土井田 誠, 柴田敏之: DNA 低メチル化マウスにおける4-nitroquinoline 1-oxide (4-NQO) 誘発口腔腫瘍の検討. 第53回日本口腔外科学会総会(2008年10月20-21日, 徳島市, アスティとくしま).
- ⑥ 土井田 誠: 口腔病変の肉眼所見(2). 第19回日本臨床口腔病理学会スライドセ

- ミナー (2008年8月20日, 東京都, 東京歯科大学水道橋校舎血腸記念ホール).
- ⑦ Keizo KATO, Nguyen Khanh LONG, Yasuo MIYAZAKI, Daijiro HATAKEYAMA, Hiroki MAKITA, Tomomi YAMASHITA, Makoto TOIDA, Toshiyuki SHIBATA: Examination of hypermethylation of *RECK* gene in squamous cell carcinoma cell lines and effect of antimethylation agent. The 89th Annual Meeting, American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons in Conjunction with the Japanese Society of Oral and Maxillofacial Surgeons and the Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons (第89回米国口腔顎顔面外科学会会議・第1回日米韓口腔顎顔面外科学会合同学術大会) (October 8-13, 2007, Honolulu, USA).
- ⑧ 加藤恵三, ウエン・カン・ロン, 宮崎康雄, 畠山大二郎, 土井田 誠, 柴田敏之: 口腔扁平上皮がん細胞の *RECK* 遺伝子 hypermethylation と脱メチル化剤の効果の検討. 第52回日本口腔外科学会総会 (2007年9月29-30日, 名古屋市, 名古屋国際会議場).
- ⑨ 土井田 誠: 口腔病変の肉眼所見 (1). 第18回日本口腔病理学会スライドセミナー (2007年8月9日, 岐阜市, 長良川国際会議場).
- ⑩ ウエン・カン・ロン, 牧田浩樹, 加藤恵三, 山下知己, 土井田 誠, 柴田敏之: 発酵玄米食 (FBRA) による 4-NQO 誘発ラット舌発癌の抑制効果の検討. 第61回日本口腔科学会総会 (2007年4月19-20日, 神戸市, 神戸国際会議場).
- ⑪ 山下知己, 牧田浩樹, 加藤恵三, 畠山大二郎, 浅香雄一郎, 米本和弘, 楠 幸博, 藤塚秀樹, 土井田 誠, 柴田敏之: 早期 (Stage 1・2) 口腔扁平上皮癌の臨床的検討 —手術例について—. 第61回日本口腔科学会総会 (2007年4月19-20日, 神戸市, 神戸国際会議場).
- ⑫ Nguyen Khanh Long, 加藤恵三, 宮崎康雄, 馬場政司, 畠山大二郎, 牧田浩樹, 山下知己, 土井田 誠, 柴田敏之: 口腔がんにおける *RECK* 遺伝子のメチル化異常の探索. 第62回日本口腔科学会総会 (2007年4月17-18日, 福岡市, 福岡国際会議場).
- ⑬ 山下知己, 牧田浩樹, 加藤恵三, 畠山大二郎, 浅香雄一郎, 米本和弘, 楠 幸博, 藤塚秀樹, 土井田 誠, 柴田敏之: 口腔扁平上皮癌1次症例の臨床的検討 —手術例について—. 第25回日本口腔腫瘍学会総会: ミニシンポジウム「口腔癌治療の現状とこれから」(2007年2月2-3日, 名古屋市, 名古屋国際会議場).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土井田 誠 (TOIDA MAKOTO)
岐阜大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号: 90313890

(2) 研究分担者

加藤 恵三 (KATO KEIZO)
岐阜大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 40397336
山下 知己 (YAMASHITA TOMOMI)
岐阜大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 80345793
柴田 敏之 (SHIBATA TOSHIYUKI)
岐阜大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 50226172
牧田 浩樹 (MAKITA HIROKI)
岐阜大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 50345790