

令和 2 年 6 月 24 日現在

機関番号：13701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06275・19K21366

研究課題名（和文）口腔癌におけるクロマチン再構成因子複合体の機能解析

研究課題名（英文）The functional analysis of chromatin remodeling complex in oral cancer

研究代表者

武内 勝章（Bunai, Katusaki）

岐阜大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：30601091

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000円

研究成果の概要（和文）：ARID1AはSWI/SNFクロマチンリモデリング複合体のサブユニットの一つである。多くの悪性腫瘍で遺伝子の変異が認められ腫瘍促進的の働くとされているが、口腔癌においてどのような分子と協調して働くのかは不明のままである。本研究では口腔癌細胞株を用いてcDNAマイクロアレイによる遺伝子の解析をおこない、ARID1Aの関連する遺伝子の候補を挙げることを目的とした。結果、2倍以上の発現があった遺伝子を6つ検出した（CXCL1, OR7E91P, FUT3, FAM222B, TGFB2, JARID2）。中でもCXCL1はRT-PCRにおいても発現の増加を認め、標的分子として良好な結果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では口腔癌細胞株を用いてcDNAマイクロアレイによる遺伝子の解析をおこない、ARID1Aの関連する遺伝子の候補を挙げることを目的とした。ARID1Aは口腔領域ではなじみの薄い遺伝子である。しかし、ARID1Aの遺伝子変異は日本人やアジア人に多い特徴があり、研究・解析に関しては本邦の研究者の貢献するところが多い。2019年の国立がんセンターのプレスリリースにおいて、ARID1Aは研究プロジェクトの標的遺伝子の一つに位置付けられている。今後さらに発展すると思われるARID1Aの分野において、口腔癌における候補遺伝子を解析することは口腔癌の病態解明に非常に有益なものとなると考える。

研究成果の概要（英文）：ARID1A is one of the subunit of SWI/SNF chromatin remodeling complex. Genetic mutations have been found in many malignant tumors and thought to be act as tumor promoter. However, it remains unclear what molecules cooperate with oral cancer. In this study, we used cDNA microarray analysis of oral cancer cell lines in order to identify the genes related to ARID1A. The result, we detected six genes with more than 2-fold expression (CXCL1, OR7E91P, FUT3, FAM222B, TGFB2, JARID2). In addition, the expression of CXCL1 was also increased in RT-PCR, showing good results as a target molecule.

研究分野：口腔外科学

キーワード：口腔癌 クロマチンリモデリング複合体 ARID1A

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

昨今の化学療法や放射線療法の進歩にもかかわらず、進行した口腔扁平上皮癌の予後は依然として不良である。これまでに申請者らの講座では、DNA のメチル化の異常がヒト口腔扁平上皮癌の発癌過程において重要な働きを果たすことを報告してきた(Kato et al. J Cancer Res Clin Oncol. 2006)。しかし現在においても、口腔癌の発癌、進展を制御する分子の発見には至っておらず、新たな分子経路を解明することは今後も重要な要素であると考えられる。近年、がん研究において microRNA や DNA のメチル化といったエピジェネティクス制御に加えて、クロマチン再構成因子複合体つまり、クロマチンの構造を変化させることにより転写活性を制御する機能が発がん・悪性形質の獲得に関わると提唱されてきている。

本研究対象であるクロマチンリモデリング(再構成)は大きくわけて2つの機構が存在する。1つはリン酸化、アセチル化といったヒストン翻訳後修飾。2つにATP 依存的にクロマチン構造を変化させる機構であり、AT-rich interactive domain-containing protein 1A (以下 ARID1A) は後者に属する。近年、ARID1A の変異が卵巣明細胞癌の50%で見いだされることがわかり(Wiegand et al. N Eng J Med. 2010, Jones et al. Science. 2010)それ以降、肝細胞腺腫の15%、大腸癌や乳癌で10~30%など多くの腫瘍で変異や発現の低下が報告されている。現在、ARID1A はクロマチン再構成因子関連遺伝子群の中で最も研究が進んでいる。多くの腫瘍で ARID1A の異常が発見されることは、発癌のみならず治療対象としても注目されることを意味しており、口腔癌を用いた研究もこれらの報告の一助となると考える。

これまでに申請者は、胃癌において得られた結果を参考として、ARID1A の下流にある分子の細胞学的研究および臨床予後解析をおこない、結果を得ている(Takeuchi et al. Carcinogenesis. 2012)。これらの結果から ARID1A の下流で発現を認める TMEM207 の発現亢進が、口腔癌の予後増悪因子であることを報告してきた(Bunai et al. J Cell Mol Med. 2018)。

2. 研究の目的

これまでの研究を通して、ARID1A が口腔扁平上皮癌の予後に深く関与していることを示せたが、どのような分子と協調して働くのかは依然不明のままである。そこで本研究ではまず、口腔癌細胞株において、cDNA マイクロアレイによる遺伝子の解析をおこない ARID1A の関連する遺伝子の候補を挙げることを目的とする。そして、候補遺伝子に関して、口腔癌手術材料による臨床的予後解析をおこない、ARID1A の口腔癌における発癌機構の解明の礎を築くことを目指す。

3. 研究の方法

(1) 口腔癌細胞株を用いた cDNA マイクロアレイ解析

口腔扁平上皮癌細胞株として SAS (ヒト舌扁平上皮癌細胞株) を用い、野生型 (ARID1A 発現株) と siRNA 処理をおこなった ARID1A 抑制株において total RNA を抽出し、解析に用いた。GeneChip Human Gene 2.0 ST Array を用いて遺伝子発現解析をおこない、2倍以上の遺伝子を発現変動遺伝子として抽出した。

(2) 口腔癌細胞株を用いた実験

口腔扁平上皮癌細胞株として SAS および Ca9-22 (ヒト歯肉扁平上皮癌細胞株) において、ARID1A の siRNA をおこない、CXCL1 の発現量を定量的リアルタイム PCR 法にて解析した。

(3) 口腔癌臨床検体を用いた実験

当科において手術を受けた口腔扁平上皮癌の手術材料 12 検体を用い、CXCL1 の発現の有無に関して、免疫組織化学染色をおこない検討した。CXCL1 抗体は Anti-GRO alpha 抗体 (ab86436) を用いた。

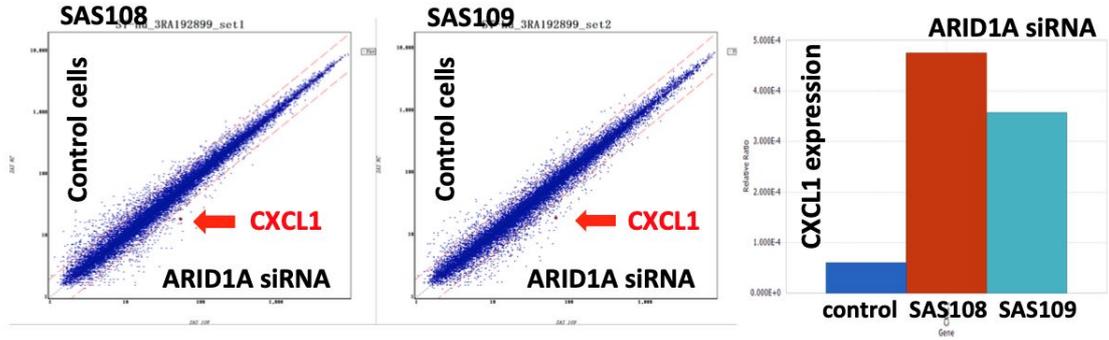
4. 研究成果

(1) 口腔扁平上皮癌細胞株として SAS を用い、2 サンプルにおいて (SAS108, SAS109 と標記) cDNA マイクロアレイ解析をおこなった。結果、2 サンプルにおいて、2倍以上の発現があった遺伝子を計 32 個検出し、ともに2倍以上の発現があった遺伝子を6つ検出した (CXCL1, OR7E91P, FUT3, FAM222B, TGFB2, JARID2)。

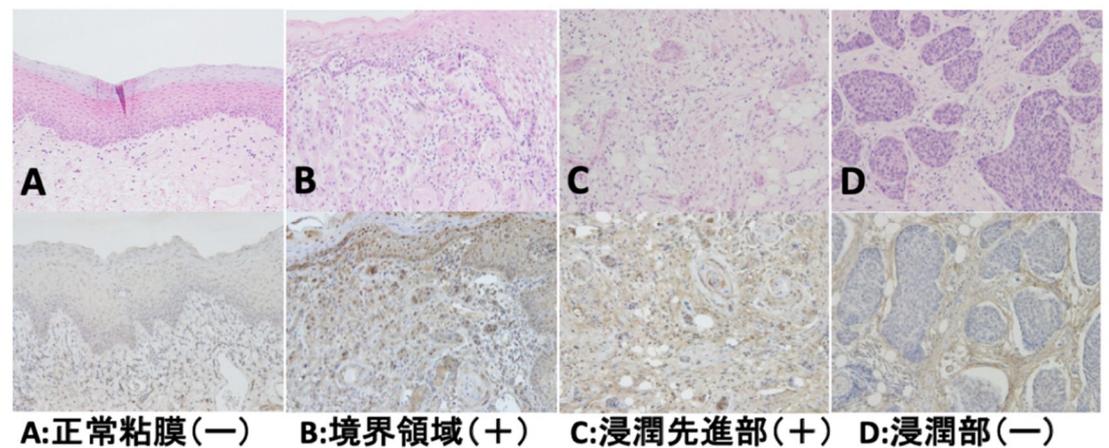
SAS108 2 fold-change gene		SAS109 2 fold-change gene			
Gene symbol		Gene symbol			
FBXO32		CCL20	IL6R	EREG	
ANKRD22		PTX3	ZNF117	FAM222B	
CXCL1		CXCL1	LOC102724580	STK40	
OR7E91P		SLC10A5	PDCD1LG2	SNORA38B	
MIR501		TXNIP	PAPPA	BST1	
MIR130B		TNFAIP3	LOC100128816	TSLP	
WIP1		LOC102724897	NCR3LG1	STC2	
GBP1		HBEGF	ZC3H12A	ANKRD1	
CHRNB1		TNFSF18	ABL2		
TRIM16L		BIRC3	ICAM1		
DSG3		INHBA	GOLGA8EP		
FUT3		LINC00622	OR7E91P		
DSC2		SOC3	SERPINA3		
CD24		JARID2	IL6		
FAM222B		TGFB2	LOC105371453		
MIR891A		NFKBIZ	CYR1		
TGFB2		FN1	FUT3		
LOC105372578		SESN2	ATF3		
JARID2		IL1A	FBXL19-AS1		
TNFSF10		CYP1B1	KDM6B		

2倍以上の発現のあった遺伝子を6つ検出した。

(2) これらの遺伝子に関してリアルタイム PCRをおこなったところ、SASにおいて ARID1A抑制株において CXCL1 の有意な発現の増加がみられた。一方、Ca9-22 では有意な発現の増加は認めなかった。



(3) 当科において手術を受けた口腔扁平上皮癌の手術材料を用いて CXCL1 の免疫組織化学染色をおこなったところ、正常口腔粘膜上皮では陽性像は認めず、腫瘍では境界領域～浸潤先進部に陽性像が認められた一方、浸潤先進部で陽性像を認めない標本もみられた。陽性像は12標本中5例で認められた。また、陽性像に関しても境界領域では細胞膜に陽性像がみられた一方、浸潤先進部では核および細胞質に陽性像を認めた。



A:正常粘膜(-) B:境界領域(+) C:浸潤先進部(+) D:浸潤部(-)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Inoue K, Hano K, Bunai K, Saigo C, Kito Y, Shibata T, Takeuchi T	4. 巻 2
2. 論文標題 Loss of ARID1A, a component of the SWI/SNF chromatin remodeling complex, at the invasion front is related to poor outcomes in oral squamous cell carcinoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oral Cancer	6. 最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Inoue K, Hatano K, Hanamatsu Y, Saigo C, Kito Y, Bunai K, Shibata T, Takeuchi T	4. 巻 145(4)
2. 論文標題 Pathobiological role of cleft palate transmembrane protein 1 family proteins in oral squamous cell carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Cancer Research and Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 851-859
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00432-019-02843-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 武内勝章、加藤恵三、米本和弘、畠山大二郎、柴田敏之
2. 発表標題 膜タンパクTMEM207はWWOXの腫瘍抑制作用を妨げMAPK経路およびHIF1 , GLUT1を亢進する
3. 学会等名 第63回日本口腔外科学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 武内勝章、石田和久、中島教行、加藤恵三、柴田敏之
2. 発表標題 Seber 症turge-Weber候群の既往を有した下顎歯肉扁平上皮癌の一部検例
3. 学会等名 第29回日本臨床口腔病理学会第11回日本口腔検査学会総会・共催学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 武内勝章、飯田一規、奥田孝大、畠山大二郎、加藤恵三、柴田敏之
2. 発表標題 FDG-PET/CTにて集積を認め生検時に診断に難渋した口腔底平滑筋腫の1例
3. 学会等名 第30回日本臨床口腔病理学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 武内勝章、波多野貴一、波野公香、井上敬介、石田和久、飯田一規、畠山大二郎、加藤恵三、柴田敏之
2. 発表標題 口腔癌細胞株におけるDNAマイクロアレイを用いたARID1A標的遺伝子の同定
3. 学会等名 第74回 NPO法人日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考