

機関番号：12501

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592353

研究課題名 (和文) 口腔癌における核内転写因子群 Pax family の総合的解析

研究課題名 (英文) Total analysis of Pax family genes in oral carcinoma.

研究代表者

小河原 克訓 (OGAWARA KATSUNORI)

千葉大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20372360

研究成果の概要 (和文)：

本研究において、口腔扁平上皮癌 (OSCC) における PAX 遺伝子群の潜在的関係を決定するために、我々はリアルタイム PCR 法によって PAX 遺伝子群の mRNA の発現状態を評価した。PAX5 遺伝子が、人間の口腔正常角化細胞 (HNOKs) と比較して全ての OSCC 細胞株で発現上昇を認めた。結果から、PAX5 が、口腔癌の発癌、そして、バイオマーカーとして OSCC の治療的目標として可能性があることが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

In the current study, to determine the potential involvement of PAX genes in oral squamous-cell carcinoma (OSCC), we evaluated the status of PAX genes mRNA expression in OSCC cell lines, by real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction. A significant increase in PAX5 expression was observed in all OSCC-derived cell lines examined compared to human normal oral keratinocytes (HNOKs). The results suggest that PAX5 plays an important role during oral carcinogenesis, and that the gene may have potential as a biomarker and therapeutic target for OSCC.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	700,000	210,000	910,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：口腔扁平上皮癌、Pax Family、マイクロアレイ解析、リアルタイム PCR 法

## 1. 研究開始当初の背景

核内転写因子である PAX 遺伝子は、9 つの Family を持ち、発生初期における細胞分化への関与が報告されている。また本遺伝子はヒト成人細胞において、抗腫瘍遺伝子である p53 の遺伝子発現を調節すること、変異タンパクが肺扁平上皮癌を初めとする複数のヒト癌組織で認められていることから発癌へ

の関与が示唆されている。この転写因子である PAX family を解析することにより癌の情報伝達系が明らかになり、より詳細な発癌機構が解明され、癌の診断、治療法、遺伝子治療に役立つものと思われる。当科では、ここ数年において、ヒト全遺伝子搭載マイクロアレイ (Affymetrix 社) のデータをもとに、口腔癌組織における遺伝子発現について解析

を行ってきた。そのデータより、*PAX* 遺伝子群の口腔癌における発現状態を解析し、機能解析を行い、さらに実際の口腔癌治療へのターゲット遺伝子になる可能性を検討する。

## 2. 研究の目的

本研究は単一遺伝子を云々する研究ではなく、一つの機能を果たす遺伝子群として核内転写因子である *PAX* 遺伝子群を捉え、遺伝子群相互の関連や調節制御機構にまでおよぶ大きなメカニズムの変化や異常を総合的に明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

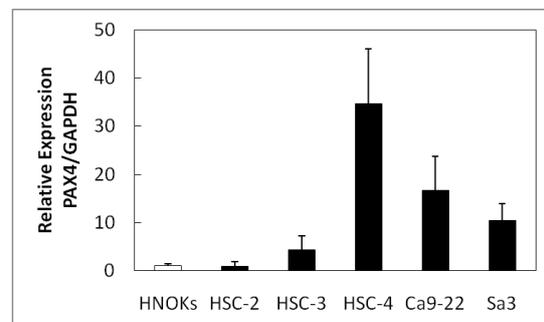
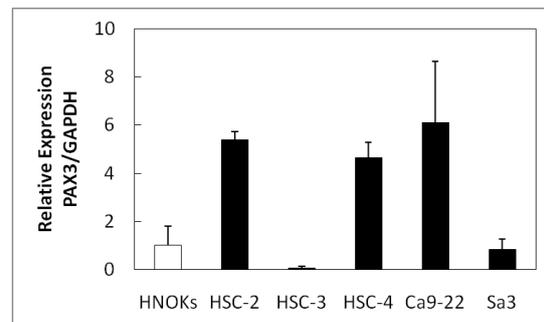
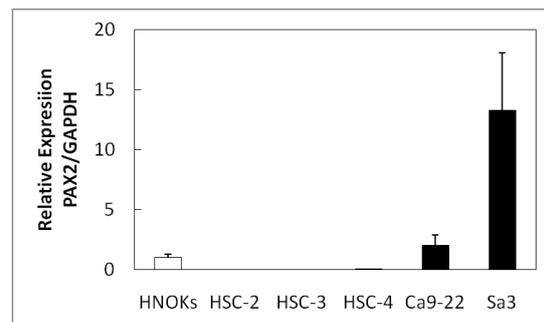
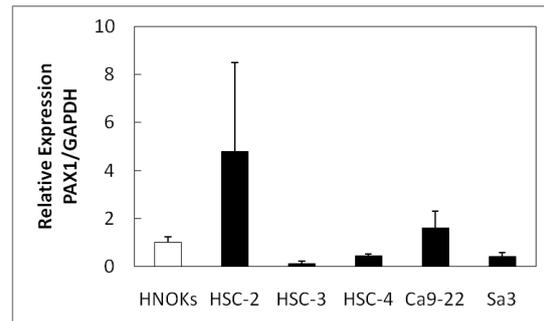
口腔癌組織、口腔癌由来細胞株、口腔正常粘膜を用いて以下の実験を行う。

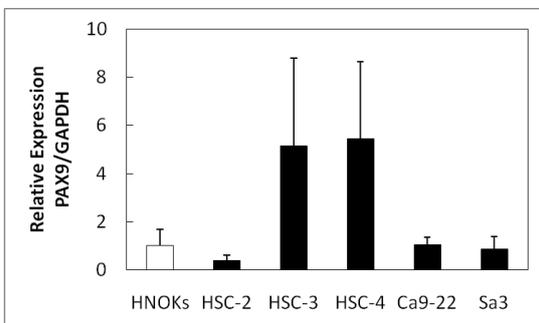
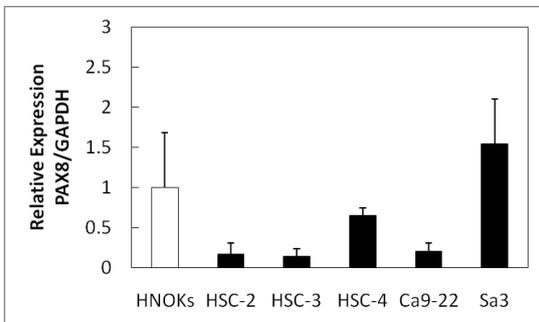
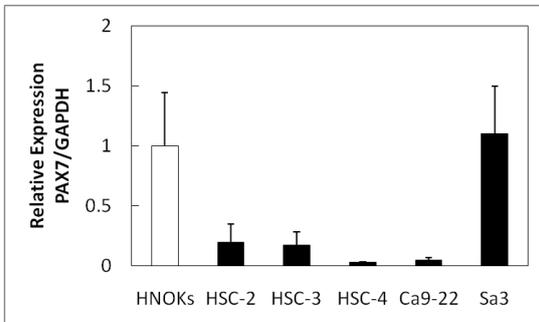
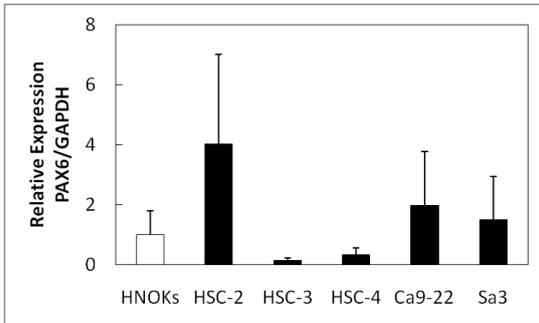
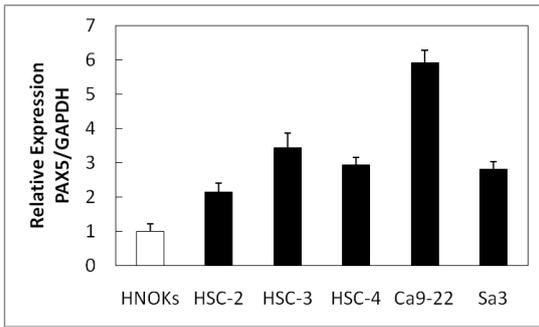
- 1) すでに独自の研究により作成・保有している、マイクロアレイ解析に基づく口腔扁平上皮癌におけるヒト全遺伝子発現プロファイリング・データベースから *PAX* 遺伝子群を抽出する。
- 2) データベース上でのそれぞれの遺伝子の発現状態を明らかにし、抽出した遺伝子群のうち、癌特異的に発現異常を示している遺伝子群を同定する。
- 3) 口腔癌細胞株 5 種類 (HSC-2, HSC-3, HSC-4, Ca9-22, Sa3) と正常口腔扁平上皮由来初代培養細胞株 (HNOK) から mRNA とタンパクを抽出・精製する。
- 4) Real-time PCR により、定量的に各 *PAX* 遺伝子の発現を確認する。
- 5) Western blot 法により、各 *PAX* 遺伝子のタンパクの発現状態を明らかにする。
- 6) 実際の臨床検体を用いて免疫染色法により本遺伝子群のタンパク発現状態を確認する。
- 7) 以上の実験から得られたデータを Ingenuity Pathway Analysis tool (IPA) を用いて解析し、各 *PAX* 遺伝子群の相互関係を解析する。

## 4. 研究成果

本研究において、正常口腔扁平上皮由来初代培養細胞株 (HNOK) と口腔癌細胞株 4 種類 (HSC2, HSC3, H1, Sa3) を用いて、Affymetrix 社製 GeneChip™ (HumanGenome U133 Plus 2.0array, 54, 675 プローブ搭載) を使用して 9 つの Family からなる核内転写因子 *Pax* 遺伝子群 9 種類 (*Pax 1, Pax 2, Pax 3, Pax 4, Pax 5, Pax 6, Pax 7, Pax 8, Pax 9*) 口腔癌細胞株における発現状態を、マイクロアレイ解析を行った結果、正常口腔粘膜上皮と比較して

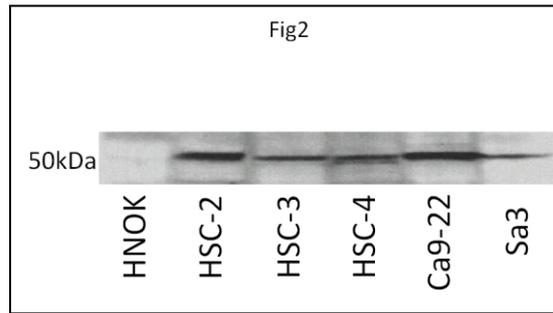
口腔癌細胞株で発現が亢進していたものは *Pax 1, Pax 2, Pax 3, Pax 5, Pax 6, Pax 7, Pax 8* の 7 種類あり、*Pax 4* および *Pax 9* は発現減弱していた。発現レベルは *Pax 5* が最大であり、*Pax 9* が最小であった。上記 *Pax* 遺伝子群全てのプライマーを作成し、口腔扁平上皮癌細胞株 5 種 (HSC2, HSC3, HSC4, Ca9-22, Sa3) についてリアルタイム PCR 法を用いて mRNA 発現解析を行った。*Pax5* 遺伝子のみ全ての口腔癌細胞株において正常口腔扁平上皮由来初代培養細胞株と比べて発現上昇を認めた。





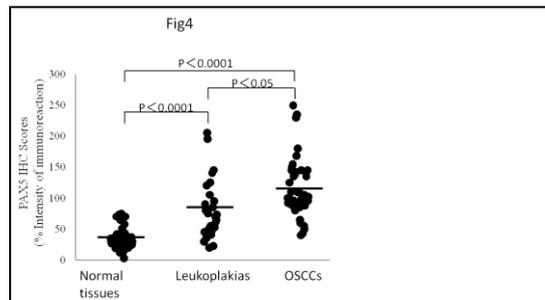
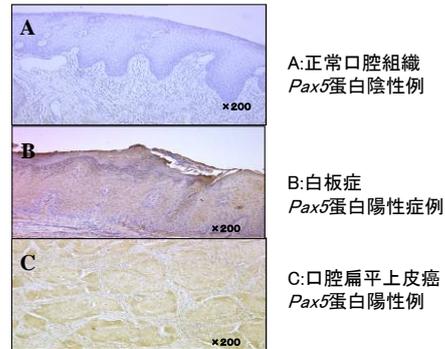
さらに、Pax5 遺伝子についてタンパクにおける発現状態についても確認した。その結果、全ての口腔癌細胞株において正常口腔扁平

上皮由来初代培養細胞株と比べて発現上昇を認めた。



また、免疫組織化学染色における Pax5 遺伝子の発現との関連を調べたところ、正常組織と比べて腫瘍において有意な発現上昇を認めた。

免疫組織化学的染色



また、臨床指標と Pax5 遺伝子の発現との関連を調べたところ、有意な相関は認められなかった。

Pax5 蛋白発現と臨床指標の相関

Clinical classification	Total	Result of immunostaining (no. of patients; %)			P
		pax5(-)	pax5(+)		
Age at surgery (year)	< 60	19	4(21)	15(79)	0.997037
	60 ≤ <70	12	2(17)	10(83)	
	≥ 70	19	5(26)	14(74)	
Gender	Male	29	5(17)	24(83)	0.677405
	Female	21	6(29)	15(71)	
T-primary tumor	T1	5	1(20)	4(80)	0.832745
	T2	27	7(26)	20(74)	
	T3	8	0(0)	8(100)	
	T4	10	3(30)	7(70)	
N-regional lymph node	N(-)	25	7(28)	18(72)	0.631773
	N(+)	25	4(16)	21(84)	
Stage	I	5	1(20)	4(80)	0.826432
	II	14	5(36)	9(64)	
	III	6	0(0)	6(100)	
	IV	25	5(20)	20(80)	
Histopathologic type	Well	33	8(24)	25(76)	1.000000
	Modelately	10	2(20)	8(80)	
	Poorly	7	1(14)	6(86)	
Tumor site	Gingiva	17	4(24)	13(76)	0.970242
	Tongue	25	5(20)	20(80)	
	Buccal mocosa	3	1(33)	2(67)	
	Oral floor	3	0(0)	3(100)	
	Oropharynx	2	1(50)	1(50)	

P値: Mann-WhitneyのU検定により統計的有意差を検定

Pax5 遺伝子は口腔癌において、発症・進展に重要な機能を有していると考えられ、今後の腫瘍マーカー及び治療ターゲットとしての可能性が示唆された。

## 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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小河原 克訓 (OGAWARA KATSUNORI)

千葉大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 20372360

### (2) 研究分担者

鶴澤 一弘 (UZAWA KATSUHIRO)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号: 30302558

武川 寛樹 (BUKAWA HIROKI)

筑波大学・医学部・教授

研究者番号: 80173558

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: