

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月28日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592204

研究課題名（和文）頭頸部癌における新しい転移関連遺伝子の検討と早期診断システムの開発

研究課題名（英文）Evaluation of novel metastasis-related genes and development of an early diagnostic marker in head and neck cancer

研究代表者

田村 真司（TAMURA SHINJI）

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：10244724

研究成果の概要（和文）：MAL, MAL2, BENE を含むプロテオリピドの MAL (Myelin and Lymphocyte protein) 遺伝子ファミリーは、上皮細胞における表層への蛋白輸送と細胞極性の制御因子であると考えられている。今回、我々は一致した症例の原発と転移の頭頸部扁平上皮癌（HNSCC）腫瘍における MAL2 と BENE 遺伝子の発現と染色体部位の欠損（LOH）の状態を分析した。結果として、転移 HNSCC における MAL mRNA 発現の down-regulation は顕著であり、それは有意に転移 HNSCC における LOH と関連していた。更に、我々は HNSCC における診断的マーカーとして血中を循環する過メチル化 MAL 遺伝子の役割を評価した。我々は HNSCC 患者からの 8 例の血清のうち 5 例（62%）で MAL プロモーターの過メチル化を検出し、血清の MAL プロモーターの過メチル化の検出が HNSCC の診断的マーカーとなる可能性があると思われた。

研究成果の概要（英文）：MAL (Myelin and Lymphocyte protein) family of preteolipids including MAL, MAL2 and BENE are implicated to be potent regulator of apical protein transport and cell polarization in epithelial cells. In this study, we evaluated expression of MAL2 and BENE genes in matched primary and metastatic tumors of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). We also analyzed loss of heterogeneity (LOH) status of MAL2 and BENE gene. As a result, down-regulation of MAL mRNA expression was remarkable in metastatic HNSCC tumors and it was significantly related with LOH in metastatic HNSCC. Furthermore, we evaluated role of circulating hypermethylated MAL gene as a diagnostic marker in HNSCC. We found hypermethylation of MAL promoter in five out of eight (62%) plasma samples from HNSCC patients. Therefore, detection of hypermethylation of MAL promoter in plasma may be a promising diagnostic marker for HNSCC.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
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：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：MAL ファミリー、頭頸部癌、転移、メチル化

1. 研究開始当初の背景

頭頸部癌は手術および手術前後の放射線・化学治療の改善により、局所コントロールが可能となったが、5年生存率は長期的に変化していない。その主要な原因は微小転移を含む頭部転移または遠隔転移と考えられる。現在まで原発腫瘍の転移能力を測定する方法はなく、転移抑制遺伝子の解明が必要である。我々は頭頸部癌における転移能力を制御する候補遺伝子群である MAL (Myelin and Lymphocyte protein) ファミリー (BENE、MAL および MAL2) を microarray database により特定した。MAL ファミリーは上皮細胞極性の作成および細胞内の蛋白輸送に重要な役割を果たすと報告されている。

2. 研究の目的

(1) 頭頸部癌における MAL ファミリー遺伝子の mRNA 発現低下のメカニズムを解明するために、各遺伝子の染色体部位の欠損 (LOH: loss of heterogeneity) とプロモーターのメチル化状態を検索する。

(2) 頭頸部癌における MAL ファミリー遺伝子の発現と転移抑制における役割を検討する。

(3) 頭頸部癌患者の血清における MAL 遺伝子のメチル化状態のバイオマーカーとしての役割を検索する。

3. 研究の方法

(1) プロテイナーゼK/フェノール抽出法にて

バイオ細胞および組織からDNAを抽出する。

(2) ISOGEN処理でバイオ細胞および組織からRNAを抽出する。

(3) SuperScriptII RT で Reverse transcription よりcDNAを作成する。

(4) Real-time PCRにより癌組織、血清、バイオ細胞での各遺伝子の発現を検討する。

(5) QIAamp Viral Spin Kitにて血清からDNAを抽出する。Sigma imprint DNA modification kitで DNAの bi-sulphite t処置した後メチル化特異的PCRを行い、血清中の遺伝子プロモーターのメチル化状態を検討する。

(6) 各遺伝子の発現データと臨床的および予後的なデータの関係について統計的な分析を行う。

4. 研究成果

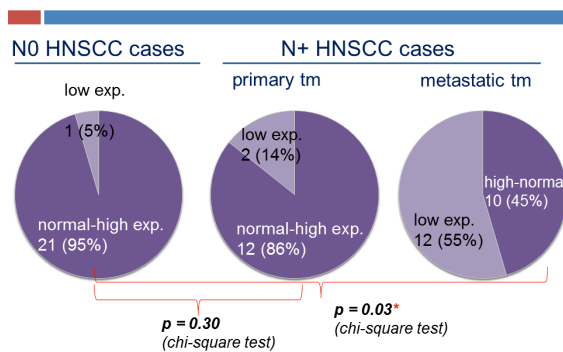
(1) 原発巣、転移巣の30ペアを含む、51症例の頭頸部癌組織に関する、MAL と BENE の mRNA 発現および LOH 分析にて、頭頸部癌の原発腫瘍と比較して転移腫瘍での mRNA 発現減少率は MAL 43%、BENE 72%であった。各遺伝子の転移組織における LOH 頻度は MAL 38%、BENE 38%であった。

MAL2 遺伝子の発現および LOH 分析では、転移巣では正常組織と比較して MAL2 mRNA の発現の減少、または消失が 55%の組織で認め

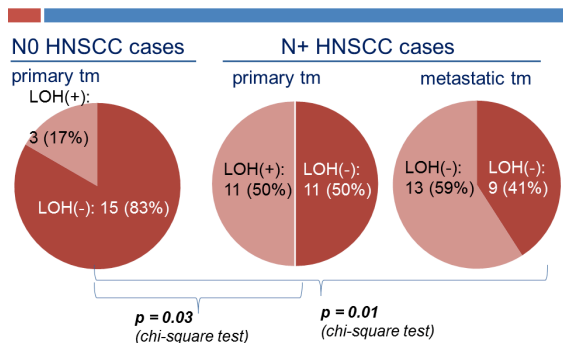
たが、転移のない原発巣では5%のみであった (p=0.03)。また、LOHは転移巣にて59%と高頻度に認められたが、原発巣では50%であった。さらに、転移を認めない症例の原発巣組織ではLOHは17%と有意に低値を示した (p=0.03)。

結果として、転移腫瘍における MAL mRNA 発現の down-regulation は顕著であり、それは有意に転移 HNSCC における LOH と関連していた。

Results: mRNA expression



Results: LOH analysis of MAL2



(2) MAL 遺伝子の発現はすべて 33 の転移癌由来の培養細胞のうち 20 株 (60%) で減少していた。また、8 ペアの前発部癌由来と転移癌由来の細胞の発現を比較すると、4 株の転移腫瘍で減少していた (50%)。さらに、メチル化の影響も検索した 13 株のうち、7 株が脱メチル化剤により MAL 発現の増加が認められた。

(3) 頭頸部癌患者からの 8 例の血清検体のうち 5 例で (62%) MAL プロモーターの過メチル化を検出した。対照健常者においては、9 例のうち 3 例 (33%) のみが過メチル化を示した。

結果として、血清の MAL プロモーターの過メチル化の検出が HNSCC の診断的マーカーとなる可能性があると思われる。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 7 件)

① Levent B Beder, Shunji Tamagawa, Mehmet Gunduz, Kazuya Yata, Hotomi Muneki, Omer F Hatipoglu, Shinji Tamura, Togawa Akihisa, Noboru Yamanaka: Loss of heterozygosity on chromosome 8q: relation with clinical parameters and survival in head and neck squamous cell cancer, American Head and Neck Society International Conference on Head and Neck Cancer, 2012.07, Toronto, Canada.

② Beder Levent, 玉川俊次, Gunduz Mehmet, 矢田和弥, 戸川彰久, 保富宗城, 田村真司, 山中昇: Allelic loss on chromosom 8q: association with prognosis in head and neck cancer, 第 113 回日本耳鼻咽喉科学会総会、2012.05, 新潟市

③ Beder Levent, 玉川俊次, Gunduz Mehmet, 矢田和弥, 戸川彰久, 保富宗城, 田村真司, 山中昇: 頭頸部扁平上皮癌における MAL2 遺伝子発現の低下と転移との関連、第 24 回日本バイオセラピー学会学術集会総会、2011.12, 和歌山市

④ Beder Levent, 玉川俊次, Gunduz Mehmet, 矢田和弥, 戸川彰久, 保富宗城, 田村真司, 山中昇: Down-regulation of MAL2 gene associates with metastasis in head and

neck squamous cell carcinomas、第35回日本頭頸部癌学会、2011.06、名古屋市

⑤ Beder Levent, 玉川俊次, Gunduz Mehmet, 保富宗城, 田村真司, 戸川彰久, 山中昇: Evaluation of methylated MAL gene in plasma as a diagnostic marker for HNSCC、第112回日本耳鼻咽喉科学会総会、2011.05、京都市

⑥ Gunduz Mehmet, Beder Levent, 玉川俊次, 保富宗城, 田村真司, 山中昇: Increased BRG1 mRNA expression was associated with worse prognosis in oral carcinomas、第112回日本耳鼻咽喉科学会総会、2011.05、京都市

⑦ 玉川俊次, Beder Levent, 田村真司, 保富宗城, Gunduz Mehmet, 山中昇: 頭頸部癌細胞株を用いたマイクロRNAによる頭頸部癌転移のリスク診断の試み、第112回日本耳鼻咽喉科学会総会、2011.05、京都市

[図書] (計 1件)

① Beder LB, Yamanaka N. MAL (mal, T-cell

differentiation protein). Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. July 2010.

URL:

<http://AtlasGeneticsOncology.org/Genes/MALID46222ch2q11.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田村 真司 (TAMURA SHINJI)
和歌山県立医科大学・医学部・講師
研究者番号: 10244724

(2) 研究分担者

山中 昇 (YAMANAKA NOBORU)
和歌山県立医科大学・医学部・教授
研究者番号: 10136963
保富 宗城 (HOTOMI MUNEKI)
和歌山県立医科大学・医学部・講師
研究者番号: 90336892

(3) 連携研究者

()

研究者番号: