

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15日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592326

研究課題名（和文） 口腔癌における新規癌抑制遺伝子 INGファミリーの機能解明

研究課題名（英文） Functional analysis of candidate tumor suppressor gene, ING family in head and neck squamous cell carcinoma.

研究代表者

長塚 仁 (NAGATSUKA HITOSHI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：70237535

研究成果の概要（和文）：

本研究では口腔癌におけるING遺伝子ファミリーの機能解明を行った。ING2遺伝子のLOH解析では、ING2遺伝子が進行期の口腔癌において有意に欠失していることが示唆された。ING5の遺伝子解析からは、ING5遺伝子のmRNA発現量の低下と変異が癌抑制機能低下の一因と考えられた。また、ING遺伝子の異常は良性腫瘍でも生じうること、ING遺伝子ファミリーは相互に協調して機能している可能性が示された。本研究は、ING遺伝子をターゲットとした分子標的治療の基礎研究として価値を有する。

研究成果の概要（英文）：

In the present research project, we investigated the function of candidate tumor suppressor gene, ING family in oral squamous cell carcinoma (OSCC). LOH analysis of ING2 gene revealed that allelic loss of ING2 gene was frequent in the patients with late stage (T3-4), suggesting tumor suppressive role of ING2 in OSCC. Mutation analysis for ING5 gene implied that decreased expression of ING5 mRNA or mutation might be the cause of loss of tumor suppressive function of ING5. Moreover, concerted function of ING family members was also suggested and allelic loss of ING family was also common in benign tumor. All the results obtained are of value as a basic study to establish a gene targeted therapy in OSCC treatment.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
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・形態系基礎歯科学

キーワード：口腔癌、扁平上皮癌、癌抑制遺伝子、ING、機能解析、p53、LOH、遺伝子解析

1. 研究開始当初の背景

癌は癌遺伝子および癌抑制遺伝子などの癌

関連遺伝子に生じた変異や後成的修飾の結果として生じる。特に癌抑制遺伝子の機能低下

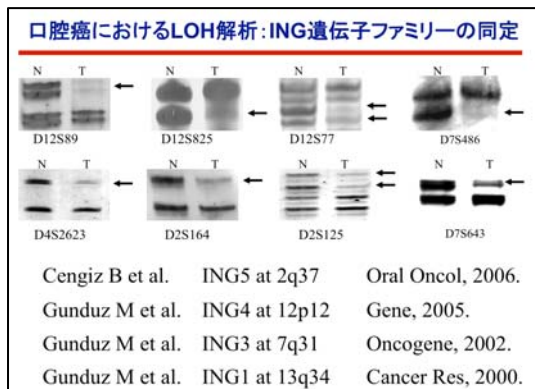
ないし欠失は癌の発生に重要であり、癌抑制遺伝子の同定や機能解析は癌の病態解明において重要な意義を要する。

一方で、口腔癌（扁平上皮癌）に関わる遺伝子群については未だ不明な点が多い。口腔癌の治療では、手術療法や化学療法、放射線療法が行われるが、いずれも侵襲性が高く、患者のQOL低下が避けられない。また、転移を来した場合には治療困難となることもしばしば経験される。

口腔癌の発生・転移のキーとなる遺伝子群を同定し機能を明らかにすること、それにより分子標的治療等のより侵襲性の少ない治療法を開発することが求められている。

2. 研究の目的

我々はこれまで、口腔癌において網羅的なヘテロ接合性消失(loss of heterozygosity : LOH)解析を行ってきた。その結果、複数の染色体上の領域に特異的かつ高頻度にLOH（つまり癌抑制遺伝子の欠失）が生じていることを見出し、特に高頻度にLOHを生じている領域についての詳細な検討からING (INhibitor of Growth) 遺伝子を独自に同定、クローニングしている（図1）。



<図1. 口腔癌でのING遺伝子のLOH>

ING遺伝子はING 1-5のメンバーから成るファミリーを構成しており、これらの個々のメンバーの機能は明らかにはなっていないが、

協調して機能し、癌抑制遺伝子としての機能を発揮していると考えられる。

本研究では、ING遺伝子ファミリーの機能解析と遺伝子ネットワークの解明をめざし、口腔癌に対する分指標的治療の基礎を構築することを目的とした。具体的には、ING2遺伝子のLOH状態の確認とING遺伝子の遺伝子変異の検索、ING遺伝子メンバー間の相互作用についての検討を中心とした。さらに、ING遺伝子ファミリーが普遍的に重要な機能を有する可能性の検討と、遺伝子間の相互作用について検討するため、エナメル上皮腫でのING遺伝子のLOHの状態も検討した。

3. 研究の方法

(1) ING2領域の詳細なLOH解析

①材料

岡山大学腫瘍バンク（清水憲二教授）から扁平上皮癌症例80例（平均年齢65.4歳）を抽出、LOH解析に用いた。

②方法

癌組織および正常組織からDNAをSDS/proteinase K処理とフェノールクロロホルム抽出で抽出、contiguous genomic sequence (NW_001838921)、GENETYX-MAC 10.1 software を用いてデザインしたING2領域を特異的に認識するマイクロサテライトを用いてLOH解析を行った。

また、ING遺伝子はTP53遺伝子と協調して機能すると考えられているため、TP53遺伝子をPCRで増幅、direct sequencingにより遺伝子変異解析も行った。

これらのLOHの状態、TP53遺伝子変異の状態と臨床データ、予後との相関を統計学的に検討した。

(2) ING5遺伝子の遺伝子変異解析

①材料

岡山大学腫瘍バンク（清水憲二教授）の

口腔扁平上皮癌（舌癌、頬粘膜癌など）症例31例を用いた。

②方法

組織材料からacid guanidium phenol chloroform法によりTotal RNAを抽出し、RT-PCR法によりcDNAを合成した。遺伝子のcoding regionをPCRで増幅し、direct sequencingによりING5の遺伝子変異を検出した。また、TP53遺伝子のexon 4-9のdirect sequencingも行い、遺伝子変異を検索した。

(3) エナメル上皮腫におけるING遺伝子ファミリーのLOH解析

①材料

代表的な歯原性腫瘍であるエナメル上皮腫は、良性腫瘍でありながら顎骨破壊性の増殖を示し、不十分な切除では再発することもある。INGファミリー遺伝子が良性腫瘍でも重要な役割を果たす可能性を検討するため、岡山大学病院病理部口腔病理診断部門のエナメル上皮腫38症例を用いた。

②方法

パラフィンブロックから10 μ mの切片を作成し、マイクロダイセクションにより腫瘍部分と非腫瘍部分を分離、それぞれからDNA抽出を行い、ING遺伝子ファミリーを、特異的マイクロサテライトマーカーを用いてPCRで増幅、LOH解析を行った。LOHの状態と臨床データとの相関を検討した。

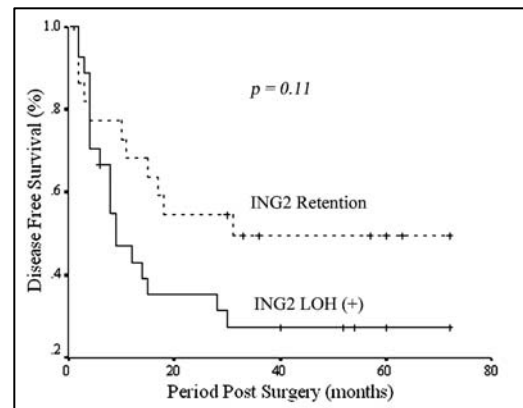
4. 研究成果

(1) ING2領域の詳細なLOH解析

ING2遺伝子のLOH解析では、解析可能であった55症例中30症例と、高頻度（54.6%）にLOHが認められた。TP53の遺伝子変異解析では、検索可能であった68症例中26症例（38.2%）において変異を認めた。統計学的解析ではING2のLOHとTP53遺伝子変異との間には明ら

かな相関は認められなかった。ING2のLOHと臨床病理データとの比較では、進行期（Late T, T3-T4）において有意に高いLOHを認めた。

また、LOHを認めた患者は無疾患生存率が短い傾向を示した（図2）。



<図2. ING2のLOHと予後の相関>

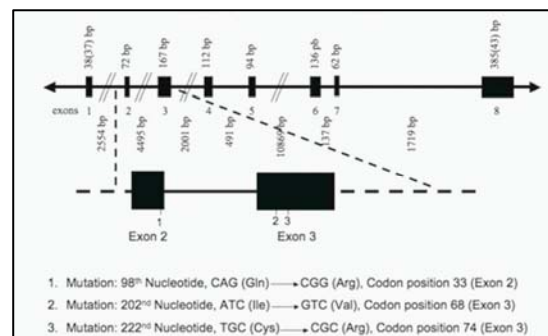
以上のことから、ING2は口腔扁平上皮癌における新規癌抑制遺伝子である可能性が示唆され、癌の病期と関連することが示唆された。

(2) ING5の遺伝子変異解析

ING5のmRNA発現解析により、31症例中19例（61.2%）でING5遺伝子の発現低下が認められた。また、新規にING5のスプライシングバリエントが見出された。

ING5の遺伝子変異解析では、31例中3例（9.6%）で変異が認められた。ING5の変異は8つのexonのうち、exon2（コドン33：Glu→Arg、コドン68：Ile→Val）とexon3（コドン74：Cys→Arg）に限定していた（図3）。

TP53遺伝子の変異は31例中7例（22.6%）で認められた。



<図3. ING5遺伝子変異解析>

- Katase N, Rodriguez AP, Sasaki A, Nagai N, Nagatsuka H, Allelic loss of the ING gene family loci is a frequent event in ameloblastoma, *Oncol Res*, 査読有、18 巻10号、2010、pp509-518.
5. Cengiz B, Gunduz E, Gunduz M, Beder LB, Tamamura R, Bagci C, Yamanaka N, Shimizu K, Nagatsuka H, Tumor-specific mutation and down-regulation of ING5 detected in oral squamous cell carcinoma, *Int J Cancer*, 査読有、127 巻9号、2010、pp. 2088-2094.
 6. Ali MA, Gunduz M, Gunduz E, Tamamura R, Beder LB, Katase N, Hatipoglu OF, Fukushima K, Yamanaka N, Shimizu K, Nagatsuka H, Expression and mutation analysis of her2 in head and neck squamous cell carcinoma, *Cancer Invest*, 査読有、28巻5号、2010、pp495-500.
 7. Katase N, Gunduz M, Beder LB, Gunduz E, Al Sheikh Ali M, Tamamura R, Yaykasli KO, Yamanaka N, Shimizu K, Nagatsuka H, Frequent allelic loss of Dkk-1 locus (10q11.2) is related with low distant metastasis and better prognosis in head and neck squamous cell carcinomas, *Cancer Invest*, 査読有、28巻1号、2010、pp103-110.
 8. Gunduz E, Gunduz M, Ali MA, Beder L, Tamamura R, Katase N, Tominaga S, Yamanaka N, Shimizu K, Nagatsuka H, Loss of Heterozygosity at the 9p21-24 Region and Identification of BRM as a Candidate Tumor Suppressor Gene in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma *Cancer Invest*, 査読有、27巻6号、2009、pp. 661-668.
 9. Gunduz M, Demircan K, Gunduz E, Katase N, Tamamura R, Nagatsuka H, Potential usage of ING family members in cancer diagnostics and molecular therapy, *Curr Drug Targets*, 査読有、10 巻5号、2009、pp465-476.
 10. Borkosky SS, Gunduz M, Nagatsuka H, Beder LB, Gunduz E, Ali MA, Rodriguez AP, Cilek MZ, Tominaga S, Yamanaka N, Shimizu K, Nagai N, Frequent deletion of ING2 locus at 4q35.1 associates with advanced tumor stage in head and neck squamous cell carcinoma, *J Cancer Res Clin Oncol*, 査読有、135 巻5号、2009、pp703-713.
 11. Lefeuvre M, Gunduz M, Nagatsuka H, Gunduz E, Al Sheikh Ali M, Beder L, Fukushima K, Yamanaka N, Shimizu K, Nagai N, Fine deletion analysis of 1p36 chromosomal region in oral squamous cell carcinomas, *J Oral Pathol Med*, 査読有、38巻1号、2009、pp94-98
- [学会発表] (計 45 件)
1. 片瀬 直樹 他、頭頸部扁平上皮癌における DKK3 タンパクおよび遺伝子発現と予後との相関、第 70 回日本癌学会総会、2011 年 10 月 3 日、名古屋
 2. 武部 祐一郎 他、エナメル上皮腫における CCN2 の発現解析、第 20 回硬組織再生生物学会、2011 年 8 月 27 日、東京
 3. Sathi GSA 他、Immunoexpression of different type stem cell marker in ameloblastoma、World Congress of IA00、2011 年 7 月 16 日、Singapore
 4. 中野 敬介 他、Calcifying cystic odontogenic tumor の 1 症例: Notch とその関連因子の検討、第 100 回日本病理学会総会、2011 年 4 月 30 日、東京

5. 長塚 仁 他、Inhibitory mechanism of bone formation in ameloblastoma, The 6th Asian Science Seminar、2010年11月20日、Taiwan
6. 玉村 亮 他、Fine deletion analysis of lp36 region in oral squamous cell carcinomas、The 6th Asian Science Seminar、2010年11月20日、Taiwan
7. 片瀬 直樹 他、頭頸部扁平上皮癌における Dkk 遺伝子ファミリーのヘテロ接合性消失 (LOH) 解析、第7回日本病理学会カンファレンス、2010年8月7日、岡山
8. 長塚 仁 他、口腔腫瘍発症・進展の分子機序、第4回病態制御科学専攻系シンポジウム、2010年7月21日、岡山
9. 長塚 仁 他、口腔腫瘍の分子病理学的解析と組織再生への展望、岡山大学歯学部同窓会岡山県支部講演会、2010年5月9日、岡山
10. 片瀬 直樹 他、頭頸部扁平上皮癌における Dkk-3 のヘテロ接合性消失 (LOH) 解析と蛋白発現の解析、第99回日本病理学会、2010年4月29日、東京
11. 松田 寛之 他、頭頸部扁平上皮癌における Dkk-3 遺伝子ファミリーのヘテロ接合性消失 (LOH) と臨床病理学的特徴の相関、第99回日本病理学会、2010年4月28日、東京
12. 劉 涵 他、扁平上皮癌における CD44 と ABCG2 の発現、第68回日本癌学会、2009年10月2日、横浜
13. 片瀬 直樹 他、頭頸部扁平上皮癌における Dkk-3 のヘテロ接合性消失解析、第20回日本臨床口腔病理学会、2009年7月30日、札幌
14. 藤井 昌江 他、Allelic loss of the *ING* gene family correlates with aggressive behavior in ameloblastoma、第98回日

- 本病理学会総会、2009年5月3日、京都
15. Mathieu Lefevre 他、Three regions are preferentially deleted in lp36 region in oral squamous cell carcinoma、第98回日本病理学会総会、2009年5月3日、京都

[図書] (計1件)

1. Naoki Katase 他、NOVA Science Publisher、Oral Cancer: Causes, Diagnosis and Treatment. 2011、169-188.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長塚 仁 (NAGATSUKA HITOSHI)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：70237535

(2) 研究分担者

福島 邦博 (FUKUSHIMA KUNIHIRO)
岡山大学・岡山大学病院・講師
研究者番号：50284112

玉村 亮 (TAMAMURA RYO)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：00403494

片瀬 直樹 (KATASE NAOKI)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：30566071

(3) 連携研究者