

機関番号：12602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791977

研究課題名（和文） 口腔扁平上皮癌の癌関連遺伝子解析による分子標的治療への応用に関する基礎的研究

研究課題名（英文） Basic resarch about application of targeted therapy by anaysis of cancer-associated gene in oral squamous cell carcinoma

研究代表者

中村 恵理奈 (NAKAMURA ERINA)

東京医科歯科大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：20527022

研究成果の概要（和文）：口腔扁平上皮細胞株 21 株に対してアレイ解析を行い、コピー数増幅のみられた 6 番染色体に注目して解析を進めた。増幅をみとめた Tosca55 細胞株の 6q22 領域に amplicon map を作成し、FISH 解析を行ったところ、約 3.5Mb の増幅領域を認めた。

この 3.5Mb の増幅領域に関してゲノムデータベースにより標的遺伝子の選択を行い、8 つの遺伝子に着目し、RT-PCR をおこない発現レベルを検討したところ、3 つの遺伝子に増幅がみとめられた。今後この 4 つの遺伝子に着目し更なる機能解析・臨床検体による解析を検討する予定である。

研究成果の概要（英文）： We assessed copy-number alterations among the 21 OSCC cell lines by array-CGH .High-level amplifications were detected in Tosca 55 cell lines around 6q22.By FISH analysys,We recognized around 3.5 Mb amplification region.

In this region,eight genes located according to the information archived by genome detabases.Next we determined the mRNA expression levels of eight genes in 21 OSCC cell lines .Among eight genes,three genes were expressed in most of the OSCC cell lines,suggesting that these genes are the target for 6q22 amplification region.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,700,000	510,000	2,210,000

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：口腔外科学一般

1. 研究開始当初の背景

癌細胞は、様々な遺伝子に多段階の変異が生じることで悪性形質を獲得し、浸潤・転移・治療への抵抗性を示す異なった個性をもつものへと変化する。従って、癌の遺伝子異常とその組み合わせを解明して癌の個性を診断して癌の質的診断を行っていくことは重要である。

DNA マイクロアレイでは数十～数千の遺伝子異常を網羅的に検索し、得られたデータをもとに遺伝子異常の程度やその組み合わせを調べて、診断や治療を行うことが可能である。これらの結果を総合的に加味しながら個々の患者の健康状態を判定することが次世代の医療において望まれる。

これらの背景より、新規口腔扁平上皮癌関連遺伝子の単離・同定を目的に、ゲノムアレイを用いた口腔扁平上皮癌細胞株の潜在的ゲノムコピー数異常の網羅的解析、ならびに同解析で見出された候補遺伝子の詳細な解析を行い、これらの領域より口腔癌でのバイオマーカーや分子標的治療の標的となりうるものが探索されることが今後期待される。

2. 研究の目的

口腔癌のアレイ解析で新規に検出されてきた染色体領域から、mRNA, 蛋白レベルでの発現解析を行い、癌関連遺伝子を単離・同定し診断・治療に有用な分子を探索する。

3. 研究の方法

口腔癌でのゲノムコピー数異常の確認と異常領域の決定を行い、標的遺伝子候補を選択して各遺伝子の癌細胞の悪質形成獲得への関与の機能的解析を行う。

アレイ CGH 解析については、主として癌関連遺伝子を含む BAC (Bacterial artificial

chromosome) クローン 800 個をスポットした MCG Cancer Array-800、ヒト 24 本の全染色体を 4523 個の BAC クローンでカバーする Whole Genome Array-4500 を用いた。対象として、OSCC 組織より樹立した TOSCa シリーズ 14 株 (TOSCa-2S, -7, -18, -23, -24, -30, -32, -36, -45, -50, -52, -55, -58S₁, -65) と SAS, Sa3, KOSC-3, H0-1-u-1, T3M1 C12, T3M1 C1-10, HSQ89 の計 21 株の OSCC 細胞株、ならびに正常コントロールとして正常口腔粘膜上皮由来不死化細胞株 RT7 を用いた。同領域内に座位する各遺伝子の発現変化を Reverse Transcription (RT)-PCR にて確認した。ゲノム DNA は Genomic DNA Purification kit (Gentra, Minneapolis, MN) を、total RNA は Isogen (Nippon Gene, Toyama, Japan) を用いて抽出した。complementary DNA (cDNA) は Superscript II 逆転写酵素 (Invitrogen, Carlsbad, CA) を使用して作製した。

4. 研究成果

口腔癌細胞株 21 株の CGH アレイ解析を用いてゲノムコピー数異常が新規に検出されてきた領域の中で、1つの細胞株 Tosca55 で増幅がみとめられた 6q22 領域に着目した。その領域に座位する遺伝子をデータベースより確認したところ最大 5 Mb の増幅領域がみとめられた。

増幅をしめした細胞株を対象にして、FISH を行った。アレイの BAC を FITC で 6 番染色体のコントロール BAC をローダミンでラベルして FISH を行うと図のように緑のシグナルが増幅して、HSR パターンがみられ、著明な増幅が確認された。

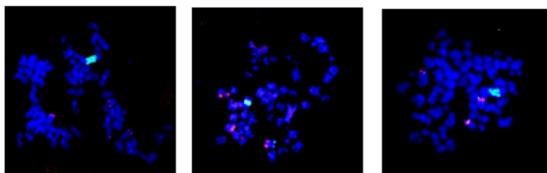
FISH の結果から、Amplicon Map を作製し、6q22 領域に下図に示すように約 3.5 Mb の HSR パターンの増幅がみとめられ、その領域に関して座位する遺伝子をデータベース

にて解析し、詳細な地図を作成し、8つの標的遺伝子を選択した。この領域の候補遺伝子の発現を確認するため、細胞株 21 株に対し RT-PCR を行い mRNA レベルでの発現、蛋白レベルでの発現解析を行った。その結果を下図に示す。赤い枠で囲んだ部位がアレイで増幅のみられた Tosca55 の細胞株で、GJA1、HSF2、SMPDL3 の3つの遺伝子で発現の亢進がみられました。これらの遺伝子は他の癌でも報告がみられた。

今後、候補遺伝子として GJA1、HSF2、SMPDL3A に注目してさらなる解析をすすめていく予定である。

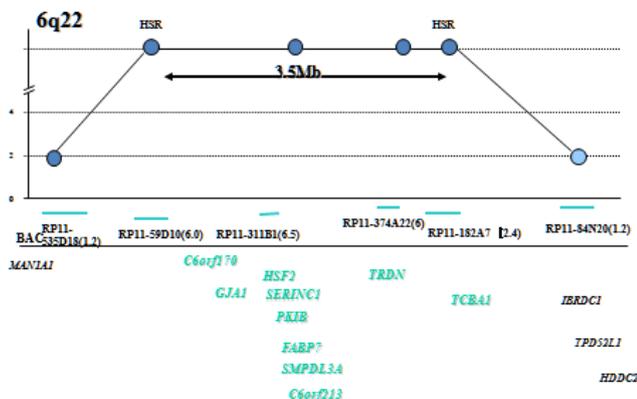
FISH analysis

6q22 (Tosca55)



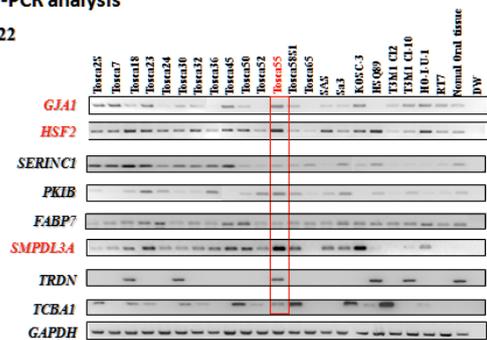
G RP11-59D10(6.0) G RP11-311B1(6.0) G RP11-182A7(2.4)
 R RP1-48L2(1.24) R RP1-48L2(1.24) R RP1-48L2(1.24)

Amplicon map



RT-PCR analysis

6q22



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 1 件)

Frequent silencing of a putative tumor suppressor gene melatonin receptor 1A (*MTNRIA*) in oral squamous-cell carcinoma. 9th Asian Congress on Oral and Maxillofacial Surgery

November 25-28 2010, Kuala Lumpur, Malaysia

Nakamura E., Suzuki E., Nakagawa T., Tsuda H., Kozaki K., Tachikawa T., Imoto I., Inazawa J., Amagasa T.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：

種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 恵理奈 (NAKAMURA ERINA)
東京医科歯科大学・顎顔面外科・医員
研究者番号：20527022

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：