

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21792002

研究課題名(和文) DNAコピー数異常に基づいた口腔扁平上皮癌新規予後マーカーの検討

研究課題名(英文) Prognostic factor study of oral squamous cell carcinomas based on copy number aberrations

研究代表者

内田 堅一郎 (UCHIDA KENICHIROU)

山口大学・医学部付属病院・助教

研究者番号：20379986

研究成果の概要(和文)：本研究では口腔扁平上皮癌の新規予後マーカーの検索を目的としています。FISH法による検討では8q24.2領域および3p26.3領域ともに予後と関連しましたが、Real time PCR法による検討ではCHL1遺伝子のみ予後と関連しました。8q24領域に関して再考し、RECQL4を候補遺伝子として検討しました。最終的に、CHL1およびRECQL4が新規予後マーカーとなる可能性が示唆されました。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to examine the constitute prognostic markers for oral squamous cell carcinomas. In FISH analysis, copy number aberrations of 8q24.2 and 3p26.3 associated with patient's prognosis. Only copy number aberrations of CHL1 was associated with patient's prognosis. RECQL4 was analyzed as a candidate gene on 8q24. Our results suggest that CHL1 and RECQL4 are constitute marker for oral squamous cell carcinoma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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。予後マーカー。

1. 研究開始当初の背景

口腔癌のみならず多くのがんが遺伝子の蓄積のもとに成り立っています。当科は、4000個のBACクローンが搭載されたMAC array[®]Karyo4Kを用いて口腔扁平上皮癌症例50例のA-CGH法によるDNAコピー数異常のプロファイリングを行いました。その結果、8q24.2に位置する0.4Mbの領域のコピー数増加と、3p26.3に位置する0.2Mbの領域のコピー数減少を新規予後マーカー候補として検出いたしました。

2. 研究の目的

本研究では我々が有するA-CGH法の解析結果をもとに、口腔扁平上皮癌の新規予後マーカーとなる、ゲノム異常や遺伝子発現の異常を明らかにすることを目的としています。

3. 研究の方法

本研究では我々が有する口腔扁平上皮癌50症例のA-CGH法による解析データを基に、
(1) Gene copy number 検討用のReal-time P

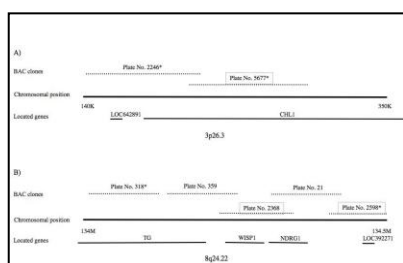
CR法やFISH法等別の解析法を用いて、8p24.2領域や3p26.3領域のコピー数異常が口腔扁平上皮癌における予後マーカーとして有用であることを明らかにします。

(2) 8p24.2領域や3p26.3領域に位置する遺伝子の発現を評価して、遺伝子異常と遺伝子発現の関係を評価します。

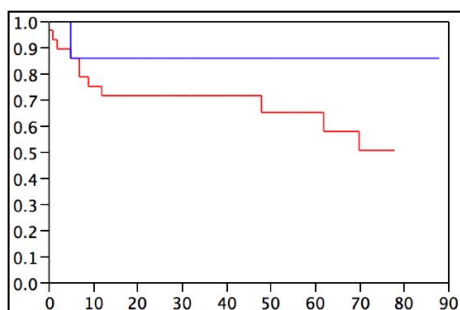
(3) 既にわれわれがゲノムコピー数異常のプロファイリングを行った口腔扁平上皮癌細胞株を用いて、8p24.2領域や3p26.3領域に位置する遺伝子の発現をSi-RNAを用いて抑制し、細胞株の浸潤能との関係を解析し、口腔癌の予後マーカーとなる生物学的根拠を得ます。

4. 研究成果

(1)



われわれが有する口腔扁平上皮癌の解析結果をもとに、上記 BAC クローンを用いて 8q24.2 および 3p26.3 領域の FISH プローブを作成し、手術施行症例の凍結標本を用いて検討を行いました。予後不良症例で、8q24.2 領域 FISH シグナルの増加および 3p26.3 領域 FISH シグナルの減少を認めました。Applied Biosystems 社より販売されている Copy number variation 検討用の WSP1 遺伝子および CHL1 遺伝子に対するプライマー・プローブのセットを購入して、Taq-Man PCR 法にて検討を行いました。容易に PCR 産物の良好な増殖曲線がえられ、3p26.3 に関しては予後との相関が見られました。8q24.2 に関しては、Array-CGH 法の解析結果と一致しませんでした。



赤：CHL1 コピー数減少 (+), 青 CHL1 コピー数減少 (-). CHL1 のコピー数異常を認める症例で有意に予後不良を認める。

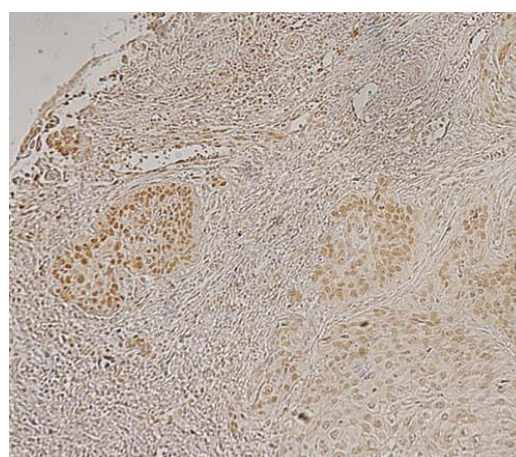
(2)

CHL1 に関して、免疫染色法による検討を行いました。その結果、予後不良例で有意に CHL1 の細胞質における発現低下を認めました。8q24 領域に関して、Array-based CGH 法の結果をもとに候補遺伝子を再考しました。その結果、8q24.3 領域にある約 200kb の領域に約 20% の口腔癌症例で著しい DNA コピー数の増加を認めることを発見しました。同領域に位置する 10 個の遺伝子に関してゲノムデータベースおよび文献を検索し最終的に RECQL4 を候補遺伝子として検討しました。RECQL4 は正常口腔粘膜や異型上皮と比較して口腔扁平上皮癌で免疫染色における核陽性細胞率が著しく上昇していました。また、RECQL4 核陽性細胞率が 60% 以上の口腔扁平上皮癌症例では予後不良でした。CHL1 に対するバイサルフェートシークエンシングを試みましたが、PCR 産物が得られませんでした。

・ Array-based CGH で口腔癌に高頻度に著しいコピー数の増加を検出した領域

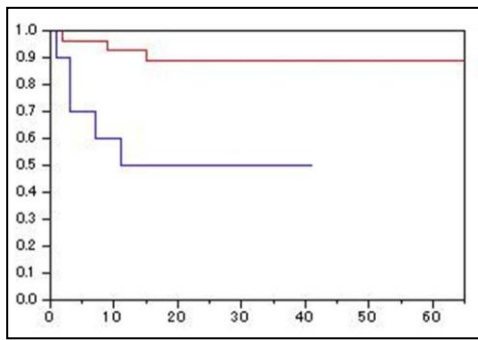
Chromosomal site	BAC start	BAC end	Plate No.	Gains		Frequency of gains Group A*	Frequency of gains Group B†
				Located genes	p-value		
3q23	143731339	143817430	2411	ATR	0.0009	3 / 27	6 / 10
3q25.2-3q25.31	156280154	156393342	556	MME	0.0075	4 / 26	5 / 8
5p15.33	2593881	2676370	1258		0.0018	4 / 27	6 / 10
8q12.1	58530498	58626304	1293		0.0087	13 / 27	0 / 10
8q22.1	98299966	98389663	4950	TSPYL5	0.0019	15 / 24	0 / 9
8q22.3	102513356	102619292	505		0.0047	14 / 27	0 / 10
8q24.21	128110171	128193833	939		0.0014	21 / 27	2 / 9
8q24.22	133489743	133608097	5269	KCNQ3	0.0010	19 / 27	1 / 10
8q24.22	134015801	134112080	318	TG	0.0016	23 / 27	4 / 10
8q24.22	134344743	134440638	2598	NDRG1, LOC392271	0.0052	19 / 26	2 / 9
14q31.1	80562798	80644440	776	TSHR, NMNATP	0.0070	5 / 23	6 / 8
Losses							
3p26.3	142175	224030	2246	LOC42891, CHL1	0.0041	5 / 27	7 / 10
3p26.3	180950	339983	5077	LOC42891, CHL1	0.0073	6 / 27	7 / 10
3p26.2	4637828	4736173	4541	ITPR1	0.0073	8 / 27	8 / 10
4q35.1	187265799	187236711	1263	LOC44122, TLR3	0.0007	3 / 27	6 / 10
8p23.3	1289201	1436212	923	LOC442576	0.0042	10 / 27	9 / 10

・ 口腔扁平上皮癌における RECQL4 の免疫染色像



ほぼ全ての癌細胞の核が染色されている。正常上皮では、基底細胞層から傍基底細胞層まで陽性細胞を認めた。

- ・ 口腔扁平上皮癌における RECQL4 の免疫染色核陽性率と予後の関係の検討



赤：RECQL4 核陽性細胞率が 60%以上，青 RECQL4 核陽性細胞率が 60%未満。RECQL4 の染色率が高い症例で有意に予後不良を認める。

(3)

培養細胞に対して RNA 干渉を用いた検討は資金の都合上施行できませんでした。

考察

CHL1 遺伝子は細胞間接着に関わる遺伝子です。同遺伝子のコピー数減少とそれに伴う遺伝子発現の低下が食道癌で報告されており今回の検討でも同様の結果が得られました。8q24 に関しては多くの癌腫でコピー数増加が報告されています。関連遺伝子は諸説ありますが、今回の我々の検討では 8q24.3 領域に位置する 200 kb の塩基配列に著しいコピー数の増加を認め、そこに位置する 10 個の遺伝子のうち、RECQL4 が口腔扁平上皮癌で高発現していることを発見しました。また、この遺伝子が著しく発現している症例では予後不良でした。RECQL4 は DNA 複製に関わる遺伝子であり、いくつかの癌腫で高発現することが報告されています。

結語

今回の検討により、CHL1 および RECQL4 が口腔扁平上皮癌の予後マーカーとなる可能性が示唆されました。今後はこれらの遺伝子の口腔癌における詳細な役割を明らかにする事が検討課題と考えられました。

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 7 件)

① Uchida K, Oga A, Mano T, Nagatsuka J, Ueyama Y, Sasaki K. Screening for DNA copy number aberrations in mucinous

adenocarcinoma arising from the minor salivary gland. -Two case studies. Cancer Genetics and Cytogenetics. Cancer Genetics and Cytogenetics. 203(2): 324-327. 2010. 査読有り.

② Kawauchi S, Furuay T, Uchiyama T, Adachi A, Okada T, Nakao M, Oga A, Uchida K, Sasaki K. Genomic instability and DNA ploidy are linked to DNA copy number aberrations of 8p23 and 22q11.23 in gastric cancers. Int J Mol Med. 2010 Sep;26(3):333-9. 査読有り.

③ Hayashi E, Kuramitsu Y, Fujimoto M, Zhang X, Tanaka T, Uchida K, Fukuda T, Furumoto H, Ueyama Y, Nakamura K. Proteomic profiling of differential display analysis for human oral squamous cell carcinoma: 14-3-3 σ Protein is upregulated in human oral squamous cell carcinoma and dependent on the differentiation level. PROTEOMICS - Clinical Applications. 2009;3(11):1338-47. 査読有り

④ Mano T, Wada N, Uchida K, Muraki Y, Nagatsuka H, Ueyama Y. A case of mucinous adenocarcinoma of the palate. Japanese Journal of Oral and Maxillofacial Surgery 52(9), 507-510, 2006-09-20. 査読有り.

⑤ 菅一能, 内田堅一郎他. 頭頸部領域の 18F FDG-PET/CT 検査で診断に難渋した 4 例. 臨床放射線. 54(6). 757-764. 2009. 査読有り.

⑥ 上山吉哉, 岡藤正樹, 原田耕志, 真野隆充, 三原真理子, 内田堅一郎, 堀永大樹, 和田範子. S-1+Docetaxel (TXT) 超選択的動注併用療法の口腔癌症例に対する臨床第 I 相試験. 癌と化学療法. 36. 395-399. 2009. 査読有り.

⑦ 梅田浩嗣, 森悦秀, 真野隆充, 内田堅一郎, 堀永大樹, 上山吉哉. ワルファリンによる抗凝固療法施行患者に対する顎矯正手術の 1 例. 日口外. 56 (5). 328-332. 2010. 査読有り.

[学会発表] (計 20 件)

① Uchida K, Mano T, Harada K, Ueyama Y. Identification of Sentinel Node Using CT Lymphography in Oral Cancer. ISNS 2010. 11.20. Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan.

② 加藤芳明, 真野隆充, 原田耕志, 内田堅一郎, 堀永大樹, 中野旬之, 上山吉哉: 当科におけるエナメル上皮腫の臨床的検討. 第 58 回日本口腔科学会中国・四国地方部会 2010.11.6. 広島.

③植田祐子, 内田堅一郎, 真野隆充, 片瀬直樹, 長塚 仁, 上山吉哉: 下顎骨原発性肉腫の1例. 第58回日本口腔科学会中国・四国地方部会 2010.11.6. 広島.

④内田堅一郎, 原田耕志, 真野隆充, 三島克章, 上山吉哉: 口腔扁平上皮癌におけるゲノムコピー数異常の解析. 第9回中国四国口腔癌研究会学術講演会 2010.11.5. 広島.

⑤山内良太, 真野隆充, 原田耕志, 内田堅一郎, 堀永大樹, 中野旬之, 梅田浩嗣, 森悦秀, 上山吉哉: 下顎後退症における固定材料の違いによる術後安定性についての比較検討. 第55回日本口腔外科学会総会 2010.10.16. 幕張.

⑥宮本寿太郎, 内田堅一郎, 板敷康隆, 竹縄隆徳, 原田耕志, 真野隆充, 上山吉哉: 頭頸部扁平上皮癌のリンパ節転移診断におけるFDG-PETの有用性. 第64回日本口腔科学会学術集会 2010.6.24. 札幌.

⑦原田耕志, 板敷康隆, 内田堅一郎, 真野隆充, 上山吉哉: ヒト口腔扁平上皮癌に対するTS-1を用いたメトロニックケモセラピーの有用性. 第34回日本頭頸部癌学会 2010.6.10. 東京.

⑧板敷康隆, 原田耕志, 植田祐子, 内田堅一郎, 真野隆充, 上山吉哉: 血管新生阻害剤ベバチスマブの口腔扁平上皮癌に対する抗腫瘍効果の検討. 第34回日本頭頸部癌学会 2010.6.10. 東京.

⑨植田祐子, 内田堅一郎, 板敷康隆, 原田耕志, 真野隆充, 上山吉哉: 当科におけるStage1, Stage2舌癌に関する検討. 第34回日本頭頸部癌学会 2010.6.10. 東京.

⑩加藤芳明, 原田耕志, 今田隆志, 吉村達雄, 堀永大樹, 内田堅一郎, 真野隆充, 上山吉哉: 口腔症状を契機に発見された白血病の1例. 第39回日本口腔外科学会中国・四国地方会 2010.5.22日. 徳島.

⑪真野隆充, 原田耕志, 内田堅一郎, 中野旬之, 板敷康隆, 上山吉哉: 上顎歯肉癌切除後の瘻孔閉鎖に舌弁を用いた1例. 第28回日本口腔腫瘍学会総会 2010.1.29. 東京.

⑫内田堅一郎, 原田耕志, 板敷康隆, 森悦秀, 上山吉哉, 佐々木功典. Array-based CGH法による口腔扁平上皮癌のゲノムコピー数異常に関する検討. 第47回癌治療学会学術集会. 2009.10.23. パシフィコ横浜.

⑬内田堅一郎, 原田耕志, 真野隆充, 北川真理子, 森悦秀, 上山吉哉. 唾液腺由来腺様嚢胞癌のゲノムコピー数異常に関する検討. 第54回日本口腔外科学会総会. 2009.10.9. 札幌コンベンションセンター.

⑭ Uchida K, Harada K, Ueyama Y, Sasaki K. Loss of 3p26.3 detected by array-based comparative genomic hybridization as a predictive marker of poor prognosis in patients with oral squamous cell

carcinomas. Oral oncology. 2009.7.11. Sheraton Centre, Tronto, Canada.

⑮原田耕志, 板敷康隆, 中野旬之, 内田堅一郎, 真野隆充, 上山吉哉: Focused DNA arrayによる頭頸部癌における5-FU系抗癌剤の効果予測因子の検討. 第33回日本頭頸部癌学会 2009.6.10. 札幌.

⑯内田堅一郎, 板敷康隆, 堀永大樹, 真野隆充, 今手祐二, 山下裕司, 上山吉哉: 甲状腺乳頭癌を併発した舌小唾液腺基底細胞腺癌の1例. 第33回日本頭頸部癌学会 2009.6.10. 札幌.

⑰内田堅一郎, 原田耕志, 板敷康隆, 森悦秀, 上山吉哉. 舌癌に対するRemote After Loading System (RALS)を用いた機能温存療法. 第31回日本局所療法研究会. 2009.6.5. 宇部全日空ホテル.

⑱真野隆充, 森悦秀, 内田堅一郎, 堀永大樹, 中野旬之, 松下明日香, 宮脇雄一郎, 上山吉哉: 口唇・口蓋裂患者における脊椎側弯についての検討. 第19回日本顎変形症学会総会 2009.6.4. 仙台.

⑲松下明日香, 中野旬之, 堀永大樹, 内田堅一郎, 宮脇雄一郎, 真野隆充, 森悦秀, 上山吉哉: 顎変形症患者における術後の気道形態の変化に関する検討. 第19回日本顎変形症学会総会 2009.6.4. 仙台.

⑳板敷康隆, 原田耕志, 植田祐子, 諏訪由里子, 内田堅一郎, 三原真理子, 真野隆充, 森悦秀, 上山吉哉: 口腔扁平上皮癌におけるpodoplaninの臨床的意義. 第63回日本口腔科学会学術集会 2009.4.16. 浜松.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

内田 堅一郎 (UCHIDA KENICHIRO)

山口大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：20379986

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし