

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 6 月 4 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22792012

研究課題名（和文） 癌幹細胞のエピジェネティックな異常からみた新規治療標的の検索

研究課題名（英文）

The analysis of a new therapeutic target as seen from the epigenetic abnormality of cancer stem cells.

研究代表者

葎葉 清香 (Yoshiba Sayaka)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：60555358

研究成果の概要（和文）：

我々は、口腔扁平上皮癌 59 症例を用いて網羅的メチル化の解析を行った。メチル化プロファイルにより口腔癌は大きく ClusterA, ClusterB という 2 群に分類されることが明らかとなった。後発転移までの期間を Kaplan-Meier 法を用いて解析すると、ClusterB 群に含まれる癌組織が優位な差をもって予後不良であることが分かった。ClusterB 群に含まれる癌症例には、基底細胞層に特異的に発現するケラチン群の発現が強く認められた。さらに我々は、口腔癌の予後を分類する 2 つの遺伝子を同定した。

研究成果の概要（英文）：

59 preoperative biopsy specimens of oral cancer and nine non-cancerous specimens were analyzed using Infinium HumanMethylation27 BeadArray system. The global methylation profiles of oral cancer were classified by unsupervised two-way hierarchical clustering method. The decision tree classifiers were evaluated by the validation set of 25 oral cancer specimens. We identified 2,361 aberrantly methylated CpG sites in cancer-specific manner. By unsupervised clustering analysis, oral cancer was divided into two methylation epigenotypes that are significantly correlated with incidence of lymph node metastasis and differentiation grades. Two markers (*EPHA5* and *CYB5R1*) were selected as the decision tree classifiers that can predict tumor metastasis in the training set, and demonstrated that they are validated to be highly predictive in the independent preoperative biopsy samples. We identified two methylation epigenotypes correlated with clinical outcome in oral cancer, and candidate classifier genes that would be useful in patient stratification for intensive therapy to overcome the tumor recurrence.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
22 年度	1,900,000 円	570,000 円	2,470,000 円
23 年度	1,200,000 円	360,000 円	1,560,000 円
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000 円	930,000 円	4,030,000 円

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：臨床腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

幹細胞（かんさいぼう）は、複数系統の細胞に分化できる能力である多分化能と、細胞分裂を経ても多分化能を維持できる能力である自己複製能を併せ持つ細胞である。癌組織を構成する癌細胞においても、自己複製により自分と同じ細胞を維持しながら、分化によって周辺の大多数の癌細胞を生み出すものになっている癌幹細胞が存在する事が、明らかとなってきた(Nature Medicine, Vol.3, 1997, p.p. 730-737)。口腔癌においてもこれまでに、癌幹細胞が存在するとの報告がある(Nat Rev Cancer. 2003 Dec;3(12):895-902.)

2. 研究の目的

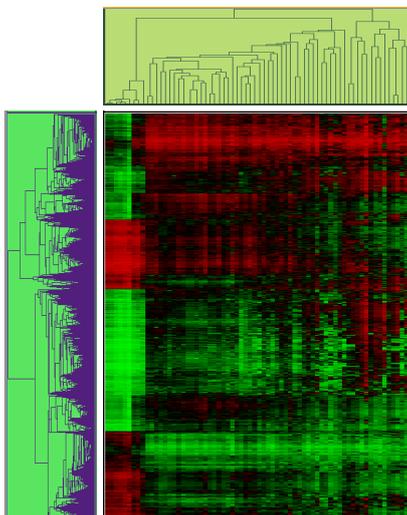
再発・治療抵抗性を示す症例の新たな治療標的の検索を行うには、癌幹細胞の性質を理解することが必須であると考えられるが、未だ癌幹細胞の形質と、癌幹細胞より分化派生した癌細胞の詳細な相違は未だ不明である。そこで本研究では、癌幹細胞の異常からみた、新規の癌治療標的の検索を行う事を目的とする。

3. 研究の方法

口腔扁平上皮癌細胞株から癌幹細胞様細胞株を樹立し、癌幹細胞のDNAのメチル化の異常を網羅的に解析する。さらに癌幹細胞を分化誘導し、分化後の癌細胞についても網羅的にメチル化の解析を行う。得られた解析結果から、癌幹細胞に特有の異常メチル化候補遺伝子を同定する。癌幹細胞株のエピジェネティクスな異常については、詳細はいまだに不明である。そこで今回癌幹細胞の異常からみた、新規の癌治療標的を検索するという非常に独創的な視点から研究をすすめる。

4. 研究成果

①口腔癌組織を用いた網羅的メチル化の解析

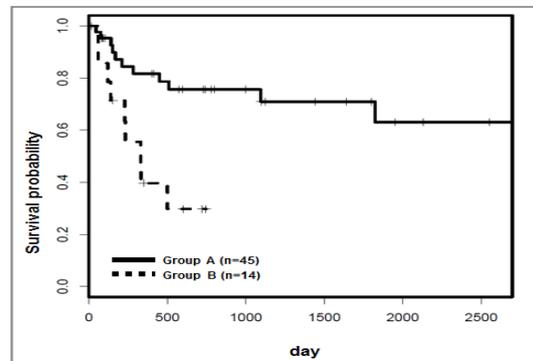


口腔癌組織 59 症例と正常口腔粘膜上皮 6 症例について網羅的メチル化を解析した。口腔癌組織と口腔正常粘膜上皮はメチル化プロファイルにより異なるクラスターに分類された。

さらに、口腔癌組織は大きく 2 つのクラスターに分類された (ClusterA, ClusterB)。

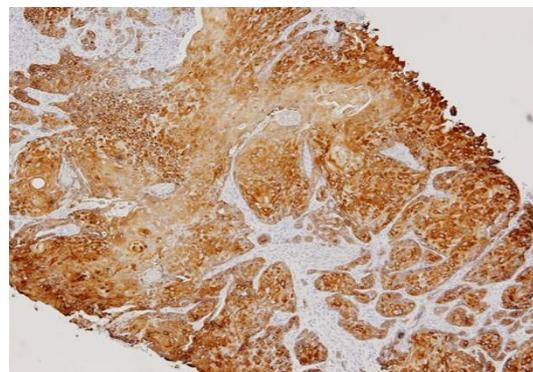
②メチル化プロファイルと予後の相関

ClusterA と ClusterB にて分類されたメチル化プロファイルと後発転移までの期間をコプランマイヤー法にて解析したところ、ClusterB に分類される癌患者は優位な差を持って予後が不良であることが分かった。



③ケラチンタンパクの免疫組織染色

ClusterA 群と ClusterB 群におけるケラチンタンパクの発現を、免疫組織学的に検討した。口腔癌の発生母地であり、癌幹細胞の存在が示唆されている基底細胞層に特異的なケラチンが ClusterB には強く発現していた。このことから、ClusterB は発生分化から基底細胞の形質を受け継ぎ、癌幹細胞用の形質を受け継いでいることが示唆された。



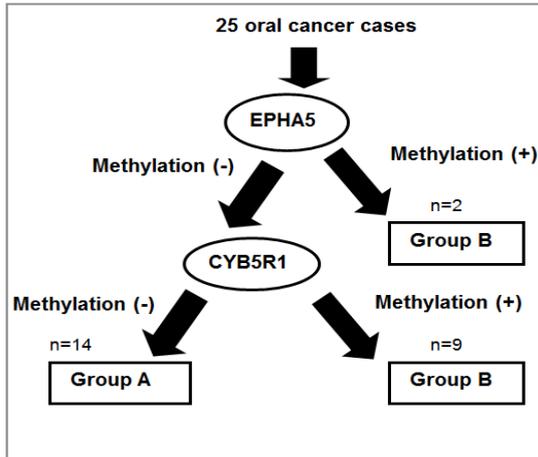
④口腔癌予後マーカー候補の同定

ClusterA, ClusterB の各群を分類するマーカー候補遺伝子を 7 つ同定した。これらの遺伝子のメチル化を異なる二つのメチル化検出方法にて解析した。その結果、他のメチル化

解析方法によってもメチル化を検出できた。

⑤口腔癌予後マーカーを用いた決定木の作成

④において同定した、7つの予後マーカー候補遺伝子から、ClusterAとClusterBを効率よく分類する決定木を作成した。この決定木の有用性の検証を行った。



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2件)

① Antitumor activity of suberoylanilide hydroxamic acid against human oral squamous cell carcinoma cell lines in vitro and in vivo.

Nagumo T, Takaoka S, Yoshiba S, Ohashi M, Shiota T, Hatori M, Isobe T, Tachikawa T, Shintani S.

Oral Oncol. 2009 Sep;45(9):766-70.

② Hypoxia induces resistance to 5-fluorouracil in oral cancer cells via G(1) phase cell cycle arrest.

Yoshiba S, Ito D, Nagumo T, Shiota T, Hatori M, Shintani S.

Oral Oncol. 2009 Feb;45(2):109-15.

[学会発表] (計2件)

① 葭葉清香, Epigenomic profiling of oral cancer, 国際口腔外科学会、2010年11月27日、クアラルンプール(マレーシア)

② 葭葉清香, Epigenomic profiling of oral cancer, 日本癌学会、2010年9月23日、横浜

[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

葭葉 清香 (Yoshiba Sayaka)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号: 60555358

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: