

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25463121

研究課題名(和文) 口腔扁平上皮癌に対し抗癌剤感受性予測因子となるバイオマーカーの分子生物学的探求

研究課題名(英文) Molecular biological research for the biomarker as sensitive predicting factor to anticancer agents in oral squamous cell carcinoma

研究代表者

渡辺 正人 (Watanabe, Masato)

東京医科大学・医学部・臨床講師

研究者番号：40349460

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：口腔扁平上皮癌を対象に腫瘍実質に発現するフッ化ピリミジン系抗癌剤をターゲットとする代謝酵素を定性的および定量的に検討した。抗癌剤の奏効性に代謝酵素の発現の多寡が影響することが認められた。一方、腫瘍幹細胞の治療抵抗性が指摘されており、腫瘍幹細胞と関連性が示唆されている上皮間葉移行のマーカーを用いて抗癌剤感受性についても病理組織学的に検討した。薬剤非奏効例ではマーカーの発現が強い傾向を示した。発現変化する代謝酵素遺伝子を標的とするmiRNAの検討では、発現プロファイル解析を行いその違いより同定を試みた結果、代謝酵素関連遺伝子を標的とするmiRNAは解明されなかった。

研究成果の概要(英文)：The expression of targeting metabolic enzymes of fluoropyrimidine was investigated in oral squamous cell carcinoma. The quantity of expression in metabolic enzymes (OPRT, TS, and TP) influenced the response to the antitumor agent. Meanwhile, it has been indicated that tumor stem like cells could have resistance to therapy and be regarded with epithelial-mesenchymal transition. Therefore, the relation with the sensitivity to antitumor agent and the markers (vimentin, snail, and E-cadherin) of epithelial-mesenchymal transition was studied histopathologically. There was strong positivity of their markers in the non-response cases. In examination of the presence of miRNA targeting genes of metabolic enzymes that change in expression, the identification was attempted by mean of the difference of miRNA expression using the profile analysis. However, it was not elucidated miRNA that targets genes of metabolic enzymes

研究分野：口腔外科学

キーワード：口腔扁平上皮癌 上皮間葉移行 抗癌剤感受性 組織学的悪性度 miRNA

1. 研究開始当初の背景

口腔癌の治療における化学療法の役割として、一次治療後の再発および転移の予防に貢献する概念が重要視されている。頭頸部癌では一次治療後一年以内での再発、転移の可能性が7割以上あり、その後の予後に大きく影響を与える。いかに再発、転移をこの時期に制御するかが予後を規定する要因と考えられる。そこで、薬剤感受性が予後に関連するような予知性因子すなわち効果予測因子の存在に注目した。口腔扁平上皮癌に対する临床上使用可能な抗癌剤の一つにフッ化ピリミジン系すなわち5-FU系があり、抗癌剤治療立案の際にkey drugとなる。これに関わる代謝酵素、OPRT、TSおよびTPが各代謝経路上で基質に作用する。

近年、口腔以外の消化器系癌を対象にこれら代謝酵素の発現を分子学的に遺伝子レベルで解析された報告がある。癌実質に発現する遺伝子変異性の代謝酵素では薬剤感受性が低下し化学療法に抵抗性を示す。口腔癌においてタンパクレベルでそれらの発現の多寡は検討されているが、分子レベルでの検討は明らかにされていない。

一方、抗癌剤耐性を示す要因の一つとして腫瘍幹細胞の存在が考えられている。化学療法や放射線療法に抵抗性を示す腫瘍細胞が代謝酵素の発現変化に加え、腫瘍幹細胞の性格に変化している可能性も想定される。その表現型として上皮間葉移行という現象があり幹細胞との関連が示唆されている。

次世代のバイオマーカーとして注目されているのが、蛋白質をコードしない低分子RNA (small non-coding RNA) の一つであるmicroRNAがある。癌の発育、転移、予後あるいは治療との関連を示唆するものが発見されている。しかし、フッ化ピリミジン系薬剤の代謝酵素の遺伝子発現変化を制御するmiRNAはいまだ明らかにされていない。

2. 研究の目的

(1) OPRT、TSおよびTPの腫瘍実質組織内の発現を評価し、薬剤感受性との関連を検討する。

(2) 腫瘍実質組織内の上皮間葉移行マーカーの発現を評価し、治療抵抗性との関連を検討する。

(3) 薬剤感受性の異なる症例について発現変化する代謝酵素遺伝子を制御するmiRNAを同定し、その存在を解明する。

3. 研究の方法

対象は2009年1月から2011年12月までに東京医科大学病院歯科口腔外科を受診した未治療の口腔扁平上皮癌を対象とした。それぞれ治療前生検組織およびPRあるいはNCを認めた症例の切除組織を検討に供した。

両者ともパラフィン標本を作製し、また新鮮組織片を準備した。一次治療後、臨床的にPR以上の症例を薬剤感受性群とした。

(1) OPRT、TSおよびTPの各代謝酵素を対象としたcDNAプローブあるいはoligonucleotideプローブを用い、in situ hybridization法にて組織中に発現するmRNAを検出する。発現量の測定は画像解析を利用し定量的にその数値を算出した。各代謝酵素の免疫組織化学的染色法にて得られた発現量とmRNA発現量を比較した。

(2) 上皮間葉移行マーカーであるvimentin、snailおよびE-cadherinを対象とした抗体を用いて免疫組織化学的染色を施行し奏功群と非奏功群での発現変化を比較した。

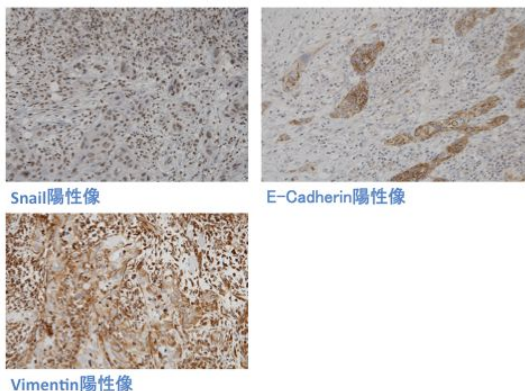
(3) 薬剤感受性の異なる症例について発現変化するmiRNAを同定を試みた。DNAチップを使い網羅的に発現分布するプロファイル解析を行い、奏効群と非奏効群での違いが観察されたmiRNAを検索した。候補に上がったmiRNAよりその代謝酵素標的遺伝子を専用の

塩基配列データベースから入手し web 上の標的予測プログラムを利用して標的部位を探索した。

4. 研究成果

(1) 化学療法の奏功群と非奏功群に分け、各 OPRT、TS および TP のタンパクレベルでの発現量を測定した結果、OPRT では有意に奏功群が非奏功群比して高値を示した。TS では逆に奏功群が非奏功群比して有意に低値を示した。TP では両群で有意差は認められなかった。mRNA レベルでは同様に OPRT では奏功群で有意に高値を示し、TS では有意に低値が認められた。TP ではタンパクレベルと同様に有意な差は無かった。各代謝酵素のタンパク発現量と mRNA 量の相関性の検討では OPRT と TS で有意な正の相関が認められた。TP では明確な相関性が示されなかった。よって、分子レベルにおいても同様な発現パターンが認められた。

(2) 上皮間葉移行マーカーである vimentin、snail および E-cadherin の発現を検討した結果、いずれも 50%以上の発現頻度を示した。組織学的悪性度との関係では high score 症例の内、84%にマーカー発現が認められた。奏功性との関係では非奏功群でマーカーの強い発現傾向がみられた。



(3) 薬剤感受性の有無により miRNA の発現の差を検討した結果、27 個の候補が得られた。これらを基に Rfam および Entrez nucleotide データベースから

両者の塩基配列を入手し、標的となる変異代謝酵素遺伝子を探索したが miRNA との相補性は得られなかった。

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 5 件)

Watanabe Masato, Tada Masanori, Satomi Takafumi, 6 名, 1 番目, 3 番目, Metastatic rectal adenocarcinoma in the mandibular gingival: a case report, World Journal of Surgical Oncology, 査読有, 14 巻, 2016, DOI:10.1186/s12957-016-0958-6

河野 通秀、渡辺 正人、浜田 勇人、藤川考、里見 貴史、近津 大地、若年者のびまん性硬化性下顎骨骨髓炎にパミドロネートが著効した 1 例、日本口腔外科学会雑誌、査読有、61 巻、2015、pp. 368-373

山本海生、金子忠良、渡辺正人、豊田潤、宮本重樹、近津大地、若年者の舌に発生した顆粒細胞腫の 1 例。日本小児口腔外科学会雑誌、査読有、24 巻、2014、pp.181-187

Kohno Michihide, Watanabe Masato, Abukawa Haruthugi, Hasegawa On, Satomi Takafumi, Chikazu Daichi: Cyclo-oxygenase-2 expression is associated with vascular endothelial growth factor C expression and lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma, J Oral Maxillofac Surg, 査読有、71 巻、2013、pp. 1694-1702、<http://dx.doi.org/10.1016/j.joms.2013.04.015>

長谷川 温、里見 貴史、渡辺 正人、河野 通秀、口腔癌頸部郭清術後難治性リンパ漏に対して胸腔鏡下胸管結紮術が有

効であった 1 例.日本口腔腫瘍学会誌、査読有、25 巻、2013、pp. 115-121

〔学会発表〕(計 3 件)

渡辺 正人、口腔外科医の立場より静脈内鎮静法の適応および施行における現状と課題、日本口腔科学会、2016 年 4 月 17 日、福岡国際会議場

渡辺 正人、口腔癌において組織学的悪性度より評価した上皮間葉移行に関する免疫組織化学的検討、日本口腔外科学会、2015 年 10 月 18 日、名古屋国際会議場

河野 通秀、里見 貴史、長谷川 温、渡辺 正人、池畑 直樹、榎本 愛、虻川 東嗣、古賀 陽子、近津 大地、口腔扁平上皮癌における M2 マクロファージ発現の臨床病理学的検討、日本口腔外科学会、2015 年 10 月 17 日、名古屋国際会議場

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 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

渡辺 正人 (WATANABE, Masato)
東京医科大学・医学部・臨床講師
研究者番号：40349460

(2) 研究分担者

里見 貴史 (SATOMI, Takafumi)
東京医科大学・医学部・臨床准教授
研究者番号：70276921

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()