

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25861913

研究課題名(和文) FNA-FISH法による口腔扁平上皮癌の遺伝子数的異常解析の研究

研究課題名(英文) Study of genome copy number alterations in oral cancer by FNA-FISH

研究代表者

名生 邦彦(Myō, Kunihiro)

東京医科歯科大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：50634119

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：われわれがこれまで行ってきた口腔扁平上皮癌に対してFNA-FISH法による分子遺伝学的解析の経験を活かし、SNP(single-nucleotide polymorphism)マイクロアレイを用いた全ゲノムコピー数の網羅的解析を行った。具体的には頸部リンパ節転移を生じた舌扁平上皮癌症例を対象に高密度のSNPマイクロアレイを用いて、ゲノムコピー数変異(CNA)に関して原発巣と転移巣間での相同性および相違性を評価した。結果、20q11.2の増幅は統計学的に有意に転移巣特異的な変異であることが示され、そのうちの1遺伝子であるE2F1が転移過程へ大きく関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In oral tongue cancer, lymph node metastasis is poor-prognostic factor. To understand the mechanisms underlying metastasis, we compared the genetic profiles of paired primary tumor (PT) and metastatic lymph node (MLN) samples in oral tongue cancer patients. We extracted genomic DNA from formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE) tissue sections of paired PT and MLN samples. We applied the past experience of molecular genetic analysis by FNA-FISH, large-scale genetic profiling was performed using high-density single-nucleotide polymorphism (SNP) microarray. Then, we compared the genetic profiles of PT and MLN samples to identify specific copy number alterations (CNA). As a result, we identified 20q11.2 gain was significantly more frequent in MLN samples. Moreover, the expression of one of 20q11.2 genes, E2F1, was significantly increased during process of metastasis. This study indicates that additional genetic changes may be required for the metastatic process.

研究分野：医歯薬学

キーワード：遺伝子解析 口腔扁平上皮癌 FNA-FISH SNPマイクロアレイ ゲノムコピー数変異 CNA

1. 研究開始当初の背景

口腔扁平上皮癌の発生・進展のメカニズムについて、これまで多くの研究者が様々な手法を用いてその解明を試みてきた。我々は FNA-FISH (fluorescence in situ hybridization) 法を用いて、着目した *Cyclin D1* や *EGFR* などの特定の遺伝子の数的変化に関する解析を進めてきた。

癌研究は昨今のアレイ CGH 解析や次世代シーケンサーの活用により飛躍的な進歩を遂げている。全ゲノムシーケンシング技術の発展に伴い、従来の個々の遺伝子解析に代わり、全ゲノムを網羅的に解析することが可能となった。

そこで、FNA-FISH 法の適応や限界といった評価を行いながら、口腔癌の発生・進展への関与が報告されている遺伝子群の数的異常解析を試みた。さらに、得られた遺伝情報と患者の予後・頸部リンパ節転移などの臨床的・病理組織学的データとの関連性について分析する。これらの結果から個々の癌の特性を診断し、治療計画立案への応用や予後判定のバイオマーカーとして可能性について検討を図った。

当科では口腔扁平上皮癌の外科的切除術が施行された切除検体に対し、fine-needle aspiration (穿刺吸引法) を用いて癌細胞と正常細胞のサンプリングを従来から行っており、これを継続して行い、FNA-FISH 法の準備を並行して進めた。

2. 研究の目的

FNA-FISH 法を用いた特定の染色体領域のコピー数異常の解析にとどまらず、SNP (single-nucleotide polymorphism) マイクロアレイを用いた口腔扁平上皮癌における全ゲノムコピー数を網羅的に評価する。具体的には頸部リンパ節転移をきたした舌癌症例を用いて原発巣および転移巣からそれぞれゲノム DNA をサンプリングし、それらを

OncoScan FFPE Assay kit (Affymetrix 社) を用いてコピー数変異 (Copy number alteration: CNA) の解析をおこない、その結果舌癌の転移に直接関与する CNA の特定を目標とする。

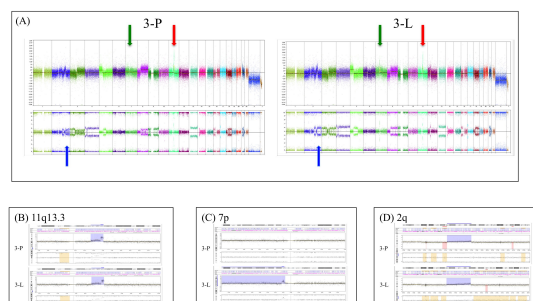
3. 研究の方法

当科にて外科手術を施行した頸部リンパ節転移を有する口腔舌扁平上皮癌患者 10 名を対象とし、各症例における原発巣と転移巣それぞれのパラフィン包埋ホルマリン固定 (FFPE) 組織、計 20 サンプルを用いた。各 FFPE で腫瘍部のみをトリミングし、ゲノム DNA を抽出した。それらを高密度の SNP アレイである OncoScan® FFPE Assay (Affymetrix) を用いて、全ゲノムコピー数解析を行った。コピー数は 2.0 以上を "gain"、2.0 未満を "loss" とそれぞれ定義した。そして、OncoScan に搭載されている全てのプローブについて各々、コピー数の状態 (gain, loss, normal) および CN-LOH の状態を原発巣・転移巣ともに評価し、両者間での比較を Fisher の正確確率検定により行った。

全ゲノムコピー数解析で得られた結果の検証目的に、別集団の口腔舌扁平上皮癌患者を対象に正常組織・原発巣・転移巣の FFPE 計 76 サンプルを用い免疫組織染色を行った。

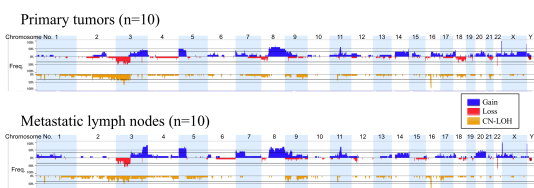
4. 研究成果

全ゲノムコピー数解析の結果、以下の図に示すように一患者における原発巣、転移リンパ節の間で、遺伝的な相同性及び相違性を見出すことができた。



原発巣と転移巣の大部分は遺伝的に共通した癌細胞集団で構成されているが、一部の細胞集団はその両者間で異なっていることが示唆された。他の9症例についても同様の評価を行い、全20サンプルの階層クラスタリング解析の結果からも原発巣と同一患者の転移巣は概ね遺伝的に共通した癌細胞集団で構成されていることが裏付けられた。

-原発巣群及び転移巣群のCNAの分布-



さらに原発巣と同一患者の転移巣のCNAの比較解析を症例毎に行った結果、20q11.2のgainは10症例中5例の転移巣のみでみられた変異であり、統計学的有意差をもって(p=0.0325)、転移巣特異的な変異であることが示された。SNPアレイとは別コホートにおける免疫組織染色の結果、E2F1タンパクは転移巣で有意に(p<0.001)発現の亢進がみられた。

20番染色体長腕のgainは多くの癌種で見られ、この染色体上に存在するE2F1は、細胞周期に関わる遺伝子の転写を調節するもので、この遺伝子の発現異常ががんの浸潤・転移に関わると報告されている。今後の研究においては、E2F1を筆頭に20q11.2に存在する他の候補遺伝子の詳細な解析および、それらを通して頸部リンパ節転移過程のメカニズムの解明を図る予定である。

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6件)

1. 鷗澤成一、森田琢磨、星玲子、赤津千絵、道泰之、大山巖雄、炭野淳、名生邦彦、山城正司 口腔癌頸部リンパ節転移被膜

外浸潤陽性症例の予後因子に関する検討 頭頸部癌 査読有り 2016;42(4):400-405.

2. Morita T, Uzawa N, Mogushi K, Sumino J, Michikawa C, Takahashi KI, Myo K, Izumo T, Harada K. Characterizing Genetic Transitions of Copy Number Alterations and Allelic Imbalances in Oral Tongue Carcinoma Metastasis. Genes Chromosomes Cancer. 査読有り 2016; 55:975-986. doi: 10.1002/gcc.22395.
3. 道泰之、香月佑子、水谷美保、三浦千佳、大山巖雄、名生邦彦、鷗澤成一、山城正司、山口聰 Nをどう診断するか?-cNとpNはどれくらい一致するのか- 口腔腫瘍 査読有り 2016;28(3):103-108.
4. 水谷美保、道泰之、香月佑子、大山巖雄、鷗澤成一、名生邦彦、川俣綾、炭野淳、三浦千佳、森田琢磨、山城正司、天笠光雄、山口聰 当科における口腔扁平上皮癌597例の臨床的検討 口腔病学会誌 査読有り 2016; 83(2):12-18.
5. 名生邦彦、道泰之、水谷美保、大山巖雄、鷗澤成一、原田清. 80歳以上の超高齢者口腔扁平上皮癌症例の臨床的検討 日本口腔腫瘍学会誌 査読有り. 2014.02; 26(2); 45-52
6. 名生邦彦、長谷川和樹、宮本日出雄 緊急対応を要した下顎骨動静脈奇形の1例 日本口腔外科学会雑誌 査読有り 2013;59(5):316-320.

[学会発表](計12件)

1. 鷗澤成一、森田琢磨、星礼子、道泰之、大山巖雄、炭野淳、名生邦彦、山口聰 口腔癌頸部リンパ節転移被膜外浸潤陽性例の予後因子に関する検討 第40回日本頭頸部癌学会 2016.6.9 ソニックシティ(埼玉県)
2. 名生邦彦、道泰之、大山巖雄、鷗澤成一、山口聰 口腔扁平上皮癌術後の再発高リスク群に対するシスプラ

- チンを用いた化学放射線療法の検討
第 70 回日本口腔科学会・学術集会
2016.4.16 福岡国際会議場 (福岡県)
3. 鵜澤成一、森田琢磨、星礼子、道泰之、大山巖雄、炭野淳、名生邦彦、原田清 口腔癌頸部リンパ節転移被膜外浸潤陽性例に関する臨床的検討
第 34 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会 2016.1.21 横浜市開港記念会館 (神奈川県)
 4. 森田琢磨、鵜澤成一、茂柳薫、名生邦彦、高橋謙一郎、道川千絵子、炭野淳、出雲俊之、原田清 舌癌同一患者における原発巣-転移リンパ節間のゲノム異常の相同性と相違性について 第 53 回日本癌治療学会総会・学術大会 2015.10.29 国立京都国際会館・グランドプリンスホテル京都 (京都府)
 5. 森田琢磨、鵜澤成一、栢森高、水谷美保、名生邦彦、大山巖雄、道泰之、山城正司、出雲俊之、原田清 当科における舌扁平上皮癌 Stage1-2 症例の臨床的検討 第 60 回日本口腔外科学会総会・学術大会 2015.10.16 名古屋国際会議場 (愛知県)
 6. Takuma Morita, Narikazu Uzawa, Kaoru Mogushi, Kunihiro Myo, Ken-ichiro Takahashi, Chieko Michikawa, Jun Sumino, Yujiro Moriya, Toshiyuki Izumo, Kiyoshi Harada. Genome-wide comparison of copy number alterations between primary and metastatic site in oral cancer. 第 39 回日本頭頸部癌学会・第 4 回アジア頭頸部癌学会 2015.6.4 神戸国際会議場 (兵庫県)
 7. 森田琢磨、鵜澤成一、名生邦彦、高橋謙一郎、道川千絵子、炭野淳、守谷友二郎、出雲俊之、原田清 舌癌同一患者における原発巣-転移リンパ節間の全ゲノムコピー数異常の比較 第 33 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会 2015.1.29. 奈良県新公会堂 (奈良県)
 8. 鵜澤成一、道川千絵子、炭野淳、森田琢磨、高橋謙一郎、道泰之、大山巖雄、名生邦彦、原田清. 口腔癌頸部リンパ節転移被膜外浸潤の新たな分類に関する検討. 第 59 回日本口腔外科学会総会・学術大会 2014.10.17 幕張メッセ (千葉県)
 9. 森田琢磨、鵜澤成一、炭野淳、鈴木美保、名生邦彦、大山巖雄、道泰之、山城正司、出雲俊之、原田清. 当科における 30 歳未満の舌扁平上皮癌症例の臨床的検討. 第 32 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会 2014.01.23 札幌コンベンションセンター (北海道)
 10. 奥山紘平、道泰之、水谷美保、名生邦彦、山城正司、原田清. 下顎辺縁切除術後の下顎骨骨折因子に関する臨床的検討. 第 32 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会 2014.01.23 札幌コンベンションセンター (北海道)
 11. 大山巖雄、鵜澤成一、道泰之、鈴木美保、名生邦彦、儀武啓幸、佐藤豊、炭野淳、三浦千佳、長谷川和樹、山城正司、原田清. 下顎頭を含めた下顎骨切除に対する再建法の検討. 第 32 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会 2014.01.23 札幌コンベンションセンター (北海道)
 12. 炭野淳、鵜澤成一、名生邦彦、水谷美保、大山巖雄、道泰之、山城正司、原田清. 触診で発見困難な口腔癌後発頸部リンパ節転移の検討. 第 32 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会

2014.01.2 札幌コンベンションセ
ンター（北海道）

6．研究組織

(1)研究代表者

名生 邦彦（MYO Kunihiro）

東京医科歯科大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：50634119