

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 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：2013～2015

課題番号：25861914

研究課題名(和文) 口腔癌におけるオートファジー細胞死抑制機構の研究

研究課題名(英文) A research of the inhibition mechanism of autophagy cell death in the oral cancer

研究代表者

富岡 寛文(Tomioka, Hirofumi)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：10436610

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：当分野において口腔癌と診断され、網羅的解析研究への協力の同意が得られた患者の、生検または手術により摘出された組織を研究対象(以下、サンプル)とした。研究期間中は随時サンプルを蓄積、保存した。それらのサンプル中で、化学療法が奏功した症例と、化学療法が無効であった症例を識別し、抽出した。ゲノム、遺伝子の網羅的解析法を用いて、それらのプロファイリングデータについても随時蓄積した。得られた膨大なプロファイリングデータを解析し、口腔癌における臨床データと比較検討を行った。様々な臨床病態を規定すると考えられる候補遺伝子の中から、オートファジー細胞死抑制遺伝子の候補を抽出し、発現解析を行った。

研究成果の概要(英文)：Among the patients who have been diagnosed in our department with oral cancer, was from a patient consent is obtained the cooperation of the exhaustive analysis research, and study the excised tissue by biopsy or surgery. During the study period to accumulate samples at any time, and stored. Among these samples, the cases chemotherapy were successful, the cases chemotherapy were invalid, identified respectively. Using an exhaustive analysis of the genome and the gene, we were also accumulated at any time for their profiling data.

Obtained by analyzing an enormous amount of profiling data, were compared with the clinical data in the oral cancer. From the candidate gene that is believed to define various clinical pathological conditions, it extracts the candidates of autophagy cell death suppressing gene was performed expression analysis.

研究分野：口腔癌における臨床病理学的解析

キーワード：口腔癌 化学療法 オートファジー細胞死 マイクロアレイ 遺伝子発現 RT-PCR 遺伝子導入 RNA干渉

1. 研究開始当初の背景

(1) 口腔癌において、癌細胞の細胞死回避・再増殖の分子生物学的なメカニズムは未だに解明されていないのが現状である。

(2) アポトーシスはプログラムされた細胞死のひとつでしかないことが証明されており、現在ではもうひとつのプログラム細胞死である「オートファジー細胞死」の機構が解明されつつある。この細胞死機構と、癌細胞の関連性が注目されてきている。オートファジーとは、細胞の新陳代謝に貢献する細胞内浄化機構である。何らかの異常によってアポトーシス機構による細胞死が破綻した細胞においては、それに続く代償機構として第二のプログラム細胞死である「オートファジー細胞死」が発動するとされている。アポトーシス機構の破綻だけでなく、この「オートファジー細胞死」機構も破綻することで、本来死ぬべき細胞が生存・増殖するということが予測されている。すなわち、癌細胞における発癌や無秩序な増殖機構、抗がん剤に抵抗する細胞死回避と再増殖に関わっている可能性が考えられるのである。

(3) これまで正常細胞内の「オートファジー細胞死」機構については種々の解析が行われてはいるが、口腔癌との関連性を解析した研究はほとんどないのが現状である。

2. 研究の目的

(1) 口腔癌の生体試料を用いてゲノム・遺伝子・タンパク質について網羅的な解析を行う。このようにして得られたプロファイリングデータを解析し、口腔癌の頸部リンパ節転移の予測因子、顎骨浸潤の予測因子、化学療法の効果予測因子等を抽出する。最終的には、予後予測診断として臨床にフィードバックさせる。そして、手術前後に化学療法あるいは放射線療法を実施するかどうかの指標の一つとして活用するなど、実際の臨床に結果を反映させることが本研究の主目的・目標である。

(2) 蓄積されたプロファイリングデータとそれに対応する臨床病理学的データから、化学療法の組織学的効果判定を抽出し、抗がん剤を無効にする病態に関連する遺伝子、すなわち「オートファジー細胞死抑制遺伝子」の候補を抽出する。

(3) これまで口腔癌の「オートファジー細胞死」に関する研究はほとんどない。これらの「オートファジー細胞死」抑制機構を解明し、正確な化学療法効果予測を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 当分野において口腔癌と診断され、ゲノム・遺伝子・タンパク質の網羅的解析研究

への協力の同意が得られた患者から、生検あるいは手術により摘出された組織を研究対象(以下、サンプル)とした。研究期間中は継続して、サンプルを採取・蓄積し、随時保存していった。サンプルのゲノム・遺伝子・タンパク質を網羅的に解析することで得られたプロファイリングデータについても併せて随時蓄積していった。

(2) 化学療法の奏効率や、組織学的頸部リンパ節転移の有無、顎骨浸潤の有無など、予後と直結すると思われる臨床病理学的データも併せて随時蓄積していった。

(3) プロファイリングデータより得られた、化学療法への感受性を規定する候補遺伝子、頸部リンパ節転移を規定する候補遺伝子、顎骨浸潤を規定する候補遺伝子等、口腔癌の予後を規定すると思われる候補遺伝子について、RT-PCR法を用いて確認作業を行いつつ、臨床病理学的データと統合し、候補をさらに絞り込んでいった。

4. 研究成果

(1) 口腔扁平上皮癌の頸部リンパ節転移率は、一般的に30%前後とされている。このような頸部リンパ節転移を誘発する危険因子の抽出を行った。

当科で加療を行った、舌扁平上皮癌332症例について解析を行った。結果として、原発巣の臨床視診型が内向型であることと、超音波検査における腫瘍の厚さが7mm以上であることが危険因子として抽出された。それぞれの転移率は60.5%と53.2%であり、非常に高率であった。

下顎歯肉扁平上皮癌113例についても同様の解析を行った。結果として、前医で抜歯などの外科処置を施行していることや、T3/T4症例であること、そしてX線の顎骨浸潤様式が虫喰い型であることが転移の危険因子として抽出された。それぞれの転移率は45.0%と32.5%と45.3%であり、高率であった。

また、上顎歯肉扁平上皮癌90例についても解析を行った。結果として、垂直的顎骨浸潤症例、特に鼻腔・上顎洞浸潤症例と翼状突起浸潤症例が転移の危険因子として抽出された。それぞれ転移率は45.5%と52.4%であり、高率であった。

上記の危険因子は全て各種の統計学的解析において有意差を認めており、かつ独立した危険因子として抽出された。これらの解析結果については研究期間中の各学会において、本研究代表者が筆頭で発表した。

(2) 口腔扁平上皮癌における化学療法・放射線療法に対する抵抗性とそれを規定していると考えられる候補遺伝子・タンパクにつ

いて解析を行った。術前化学療法あるいは術前放射線療法を施行し、その後に手術を行った症例の FFPE 組織サンプルを用いて、定量的プロテオミクス解析を施行した。さらに免疫組織学的解析による確認作業を行った。それにより、galectin-7 が化学療法・放射線療法に対する抵抗性を規定していると考えられることを解明した。このタンパクの発現量についてスコア化すると、高スコア群の疾患特異的 5 年生存率が低スコア群と比較し、有意に低い結果であった。

(3) これまで蓄積し保存したプロファイリングデータは膨大な量であり、研究期間中にすべてのデータを解析するまでに至らなかった。今後も臨床病理学的データとプロファイリングデータを統合しつつ解析研究を継続していく。それにより、上記のように抽出し得た因子だけでなく、口腔癌における様々な病態を規定している因子について、さらに詳細な結果を報告することができると期待される。最終的には、口腔癌の症例個々に応じた予後予測診断やオーダーメイド医療に至ることが可能になると考える。

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 11 件)

Mochizuki Yumi, Harada Hiroyuki, Ikuta Minoru, Shimamoto Hiroaki, Tomioka Hirofumi, Tanaka Kae, Hirai Hideaki, Omura Ken. Clinical characteristics of multiple primary carcinomas of the oral cavity. *Oral Oncology*. 査読あり. 51 2015 182-189. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2014.11.013

Tomioka H, Kaneoya A, Mochizuki Y, Harada H. Primary diffuse large B-cell lymphoma arising in the tongue accompanied by ataxia-telangiectasia. *Journal of clinical and diagnostic research*. 査読あり. 9 2015 ZD25-27. DOI: 10.7860/JCDR/2015/12121.6107.

Matsukawa S, Morita K, Negishi A, Harada H, Nakajima Y, Shimamoto H, Tomioka H, Tanaka K, Ono M, Yamada T, Omura K. Galectin 7 as a potential predictive marker of chemo-and/or radio-therapy resistance in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Medicine*. 査読あり. 3 2014 349-361. DOI: 10.1002/cam4.195.

津島文彦、桜井仁亨、佐藤 昌、須田悠

里、田中香衣、富岡寛文、島本裕彰、中島雄介、原田浩之、小村 健、口腔白板症の癌化に関する臨床的検討、*日本口腔外科学会雑誌*、査読あり、59 巻、2013 年、691-698

Harada H, Omura K, Tomioka H, Nakayama H, Hiraki A, Shinohara M, Yoshihama Y, Shintani S. Multicenter phase II trial of preoperative chemoradiotherapy with S-1 for locally advanced oral squamous cell carcinoma. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 査読あり. 71 2013 1059-1064. DOI: 10.1007/s00280-013-2101-5.

[学会発表](計 41 件)

森田圭一、及川 悠、谷本幸介、栢森 高、坂本 啓、平井秀明、富岡寛文、島本裕彰、生田 稔、石川俊平、稲澤謙治、原田浩之、口腔がんにおけるがん関連遺伝子変異のターゲットリサーチ、第 53 回日本癌治療学会、2015 年 10 月 29~30 日、国立京都国際会館(京都府京都市)

富岡寛文、大迫利光、田口貴英、平井秀明、望月裕美、島本裕彰、生田 稔、原田浩之、小村 健、上顎歯肉・硬口蓋扁平上皮癌の顎骨浸潤に関する検討、第 32 回日本口腔腫瘍学会、2014 年 1 月 23~24 日、札幌市

松川 祥、森田圭一、根岸綾子、原田浩之、中島雄介、島本裕彰、富岡寛文、田中香衣、尾野雅哉、山田哲司、小村 健、定量的プロテオームによる口腔扁平上皮癌の術前治療抵抗性予測因子の同定、第 37 回日本頭頸部癌学会、2013 年 6 月 13~14 日、東京

富岡寛文、釘本琢磨、平井秀明、望月裕美、田中香衣、島本裕彰、中島雄介、原田浩之、小村 健、舌扁平上皮癌 T1・T2 症例の超音波検査における腫瘍の厚さと頸部リンパ節転移の関連、第 37 回日本頭頸部癌学会、2013 年 6 月 13~14 日、東京

Tomioka Hirofumi, Omura Ken, Kugimoto Takuma, Hirai Hideaki, Mochizuki Yumi, Tanaka Kae, Shimamoto Hiroaki, Nakajima Yusuke, Harada Hiroyuki. Bone Invasion relate to cervical lymph node metastasis in squamous cell carcinoma of lower gingiva. 4th World congress of the international academy of oral oncology. 2013 年 5 月 15~18 日. Rhodes Island, Greece.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

富岡 寛文 (TOMIOKA, Hirofumi)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・

助教

研究者番号：10436610