

## 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15日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009年～2011年

課題番号：21592543

研究課題名（和文） 遺伝子多型および発現特性による口腔癌細胞特性診断パネルの開発

研究課題名（英文） Development of diagnostic panel of oral cancer cell properties by genetic polymorphisms and expression properties

研究代表者

大島 朋子（OHSHIMA TOMOKO）

鶴見大学・歯学部・准教授

研究者番号：50233101

研究成果の概要（和文）：本研究は、口腔癌の特性と変異遺伝子との関係を理解し治療法を選択する基準を確立するために、遺伝子発現と多型のバリエーションを分析し、それぞれの細胞特性を明らかにすることを目的とした。なお、あらかじめ鶴見大学倫理審査委員会の承認を受け、被験者のインフォームドコンセントを得た上で行った。遺伝子多型を調べる SNP 解析および発現多型を調べる DNA マイクロアレイ解析やプロテオーム解析を行った。すべての解析で共通のものはなかったが、少数の候補を絞ることができた。

研究成果の概要（英文）： In order to understand the relationship between OSCC properties and gene mutation and to establish a standard for selection of therapy, the variety of gene expression and polymorphism and individual OSCC cell properties was analyzed. This study was conducted with the approval of Tsurumi University ethical review board. Informed consent was obtained from all of patients prior to this study. We performed SNP analysis to determine the gene polymorphism, DNA microarray analysis and proteome analysis. The common candidate in all analysis was not found but there is potential in combinations of plural candidates.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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： 遺伝子発現、遺伝子多型、癌細胞特性、口腔扁平上皮癌、バイオインフォマテイクス

## 1. 研究開始当初の背景

p53 癌抑制遺伝子はすべての癌での異常の報告があり、50%の癌細胞に異常が認められていることから、癌抑制における p53 経路の重要性が考えられている。TP53 変異の75%はミスセンス変異であり、1 アミノ酸置換により DNA 結合能が低下すると、p53 標

的遺伝子の転写を介した細胞周期停止、アポトーシス、血管新生阻害、DNA 修復などの様々な機能が失われる。TP53 のミスセンス変異のバリエーションは実に様々で 2006 年現在で 1000 種類以上のアミノ酸置換が報告されているが、口腔癌に関してはシステムティックレビューやメタアナリシスによる

検証をするほど報告が蓄積していない。

そこでわれわれは、実際に癌患者の組織から培養系に移行し、15株の細胞特性と TP53 変異および多型(SNP)との関わりを検討してきた。その結果、ある傾向は確認されたが、非常に複雑なものであった (Kamiya, Y. & Ohshima, T. Oral Sci. Int. 2 (2) 104-117, 2005)。p53 発現を欠く negative グループは TP53 変異型を発現する positive グループより抗癌剤感受性が4薬剤中3薬で低い傾向にあり、コドン 72SNP は R 型が P より高い感受性を示し、他の腫瘍組織での従来の報告とは逆の傾向にあった。一方、細胞浸潤能は p53 発現および 72SNP とは関連した傾向は示されなかった。したがって、口腔癌特有の特性がある可能性が考えられた。多くの癌で最も重要かつ普遍的に機能する TP53 の変異が、診断および予後判定の因子として利用できる可能性を持つにもかかわらず、このように臨床に反映できる答が得られておらず、p 53 以外の要因が複雑にからんでいる機能解析が不十分であると考えられた。また、臓器組織特有の性質も考えられ、これらを明らかにすることがきわめて重要と思われた。

## 2. 研究の目的

口腔癌の持つ特性と変異遺伝子との関係を理解し科学的根拠を検証した上で、最も効果の高い治療法を選択する基準を確立するために、本研究では遺伝子発現と多型のバリエーションを分析し、それぞれの細胞特性を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究は鶴見大学倫理審査委員会の承認を受け、被験者のインフォームドコンセントを得て行った。

### (1) 症例、および樹立化と細胞培養:

2002年から2004年の間に、鶴見大学附属病院口腔外科へ来院した口腔癌患者の生検および手術時切除物の組織の一部をサンプルとし、さらに *in vitro* にて培養した。細胞培養は公的に分与されている口腔癌由来の SCC 細胞株、KB, HSC-3, HSC-4, SAS, SCC25, Ca9-22, HOC313, HO-1-N-1, HO-1-u-1 を含め、すべて 10%FBS 添加 DMEM 培地を使用した。また、末梢血サンプルは同様に2007年から2010年の間に、鶴見大学附属病院口腔外科へ来院した口腔癌患者 47 名および健康ボランティア 47 名から採取した。

### (2) RNA 抽出および cDNA 合成・増幅

それぞれの細胞株または組織サンプルより total RNA を High pure RNA Isolation Kit (Roche Diagnostics Co., Indianapolis, USA) で抽出し、逆転写反応 (SuperScript II Rnase H- Reverse Transcriptase, Invitrogen) により first strand cDNA の合

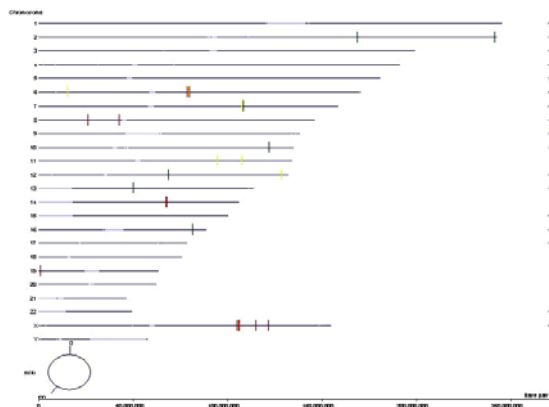
成を行った。

(3) DNA マイクロアレイによる発現解析  
OSCC 細胞培養株と正常口腔粘膜細胞培養株より抽出した total RNA を用い、8500 遺伝子の発現解析を DNA マイクロアレイ (Affymetrix 社製 GeneChip Human Genome Focus Array) を用いて 8500 遺伝子について行った。Gene Springs (Silicon Genetics) により、正常口腔粘膜上皮細胞に対する癌細胞における各遺伝子の相対発現量の比率を求め、特異的に発現が上昇および低下している遺伝子群を特定した。

### (4) 定量-リアルタイム PCR

cDNA を鋳型として使用した。相対発現量が有意に2倍以上もしくは0.5倍以下になっていた遺伝子および GAPDH 遺伝子の定量を行った。解析は Quanti Tect Probe PCR Kit (Qiagen Hilden, Germany) および LightCycler-FastStart DNA マスター-SYBR Green I キットを用いて反応させた。内部標準として、GAPDH 遺伝子の各検体における発現量を調べ比較した。

(5) ASPE (Allele-specific primer extension) 法による focused SNP genotyping  
ヒト口腔癌 47 症例および健康者 47 名から末梢血を採取し、DNA を抽出し PCR 増幅および EXO/SAP 処理後、ASPE 反応させた。ASPE プライマーは各 SNP 領域に2個ずつ SNP 配列が 3' 端に位置するよう設計した。Vera Code Beads でキャプチャーし hybridization 後、取込まれたビオチン標識 dCTP の蛍光量を Bead Xpress Reader にて測定した。データ解析は Bead Studio FrameWork と Genotyping Module によって行った。以下の図は今回解析した SNPs のゲノム内 site を示す。



(6) LCM (Laser capture microdissection) サンプルの SELDI-TOF-MS 解析  
凍結腫瘍組織および周囲の正常上皮を LCM (Laser capture microdissection) により別々のチューブに回収し、抽出したタンパク質を SELDI-TOF-MS (surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry; ProteinChip®) 解析を行い、腫瘍と正常組織間で発現レベルの異な

るピークを検出した。

(7) マルチプレックスサスペンションアレイ解析

被検者より治療前後の血漿サンプルを採取し、Milliplex®Map Human Cytokine / Chemokine Kit (Milipore 社) を使用し、マルチプレックスサスペンションアレイ

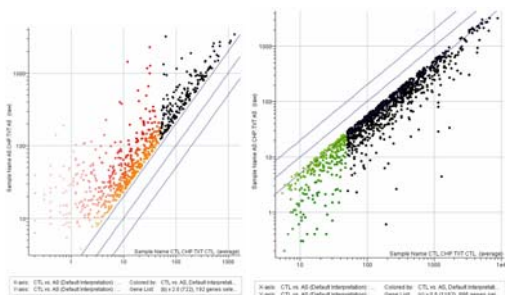
(Luminex®200 System, Luminex) で検出しプロテオーム解析を行った。

(8) 統計学的解析

2 群間の測定値比較の統計学的解析は Mann - Whitney U 検定を用い、2 群間の頻度比較は  $\chi^2$  検定を行った (SPSS-14.0J)。p<0.05 を有意差ありと判断した。

4. 研究成果

(1) ヒト口腔癌培養細胞 5 株および正常上皮から RNA を抽出し cDNA を合成し、マイクロアレイを用いてアノテーション済みの遺伝子について、ゲノムワイドに遺伝子発現を網羅的に分析した。



TOS-5AS 細胞の遺伝子発現プロファイル。上左図の黒点は正常粘膜上皮細胞に比べ 2 倍以上上昇、上右図の黒点は 0.5 倍未満のものを示す。

腫瘍部と正常部とで比較し有意に発現が上昇していたのは、次の表に示すように 69 遺伝子 (細胞増殖系が 20 遺伝子、細胞増殖・分化系が 22 遺伝子、その他が 27 遺伝子)、減少していたのは 142 遺伝子 (細胞増殖系が 34 遺伝子、細胞増殖抑制・分化系が 35 遺伝子、その他が 73 遺伝子) であった。下の表に詳細を示す。

腫瘍部での発現上昇遺伝子群

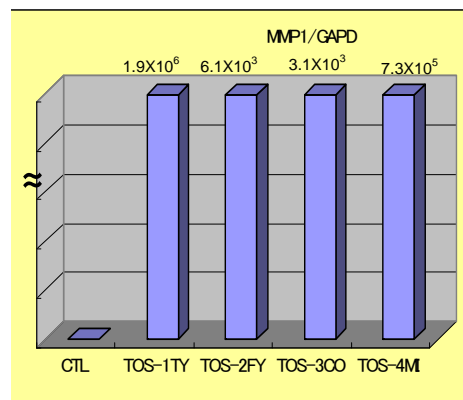
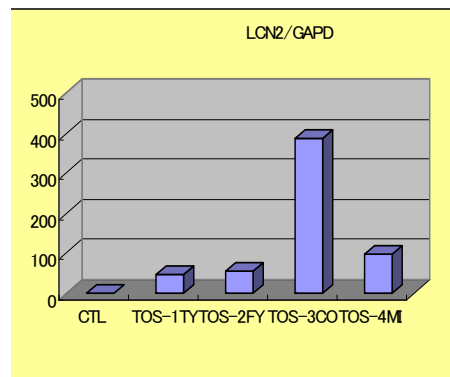
Gene Groups	Functions	Gene number	Gene Symbols
Growth factors	Oncogenes・Transformation	6	<b>LCN2</b> , BLCA, CTSH, etc.
	Cell proliferation	4	DUSP10, MDK, etc.
	Cell growth factors	3	<b>IGFBP3</b> , DTR, etc.
	Cell invasion, metastasis	3	<b>MMP1</b> , CD44, etc.
	regeneration of vessels	1	AMOTL2
	Signal transduction・Protein kinase	3	FZD6, PLAUR, etc.
		total	20
Inhibition of cell growth, Differentiation	Epidermal differentiation	1	RAI3
	Inframation promotion・Tumor	1	C3, CXCL1, DAF, etc.
	Tumor Suppressor gene	2	LOXL2, TP53BP2
	Metastasis suppressor・Cell	5	CLDN7, ITGA2, etc.
	Stress response・Chaperon	3	CANX, PPP1R15A, etc.
		total	22
Others	Drug / alcohol metabolism	3	ALDH1A3, TXNRD1, etc.
	Structural protein metabolism(collagen metabolism)	1	P4HA1
	Membrane structural proteins (lipoprotein・ion channel)	6	ATP1B1, MMD, etc.
	Others	17	LOC57018, NET-6, etc.
		total	27

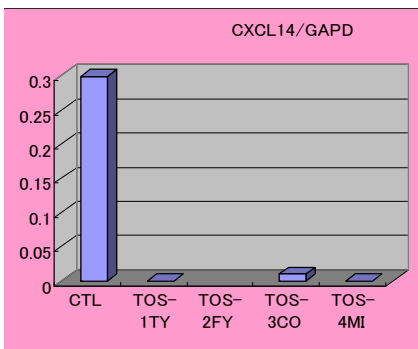
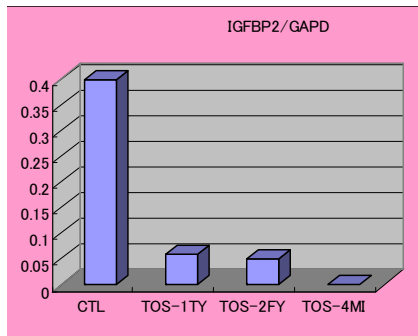
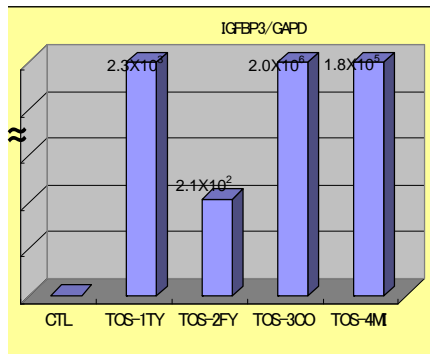
腫瘍部での発現低下遺伝子群

Gene Groups	Functions	Gene number	Gene Symbols	
Growth factors	Oncogenes・Transformation	7	RAB31, TIP47, etc.	
	Cell proliferation	2	FGFR3, SCD	
	Cell growth factors	2	<b>IGFBP2</b> , HBP17	
	Cell invasion・metastasis	4	IL18, P8, etc.	
	Transcription・translaton activating factor	7	ELL2, HAT, etc.	
	Signal transduction・Protein	12	IGBL, PER1, etc.	
		total	34	
Inhibition of cell growth, Differentiation	Epidermal differentiation	6	KRT6A, KRT5, etc.	
	Inframation promotion・Tumor immunology	7	<b>CXCL14</b> , CA12, etc.	
	Tumor Suppressor gene	4	LOH11CR2A, BAP1, etc.	
	Metastasis suppressor・Cell adhesion	10	PKP1, LPXN, etc.	
	Induction of apoptosis	2	BAX, ASC	
	Stress response・Chaperon	1	APG-1	
	Repair of DNA damage	4	XPC, UBE1, etc.	
	Cell cycle regulation	1	DIA1	
			total	35
Others	Drug / alcohol metabolism	6	CYP27B1, GSTA4, etc.	
	Structural protein metabolism(collagen metabolism)	10	MAP4, ZYX, etc.	
	Membrane structural proteins (lipoprotein・ion channel)	9	LAD1, AQP3, etc.	
	Mitochondria activity	13	ACAA2, CKMT1, etc.	
	Nucleic acid metabolism	2	ARL5, SNRPN	
	Proteinase inhibitor	1	SPINK5	
	Stability of chromosome	1	PGPL	
	Others	31	PBP, PPIH, etc.	
			total	73

それらのうち、平均値の差の大きいものから 12 遺伝子ずつ定量-リアルタイム PCR により分析を行ったところ、発現上昇・低下の検証がなされた。結果を次の図に示す。定量-リアルタイム PCR にて測定した各遺伝子の mRNA の相対発現量を示す。

内部標準として GAPDH 遺伝子の各検体における発現量に対する発現量を相対発現量とし正常上皮細胞と比較した。その結果、少なくとも 24 遺伝子において RNA 発現に異常が見られることが示唆された。



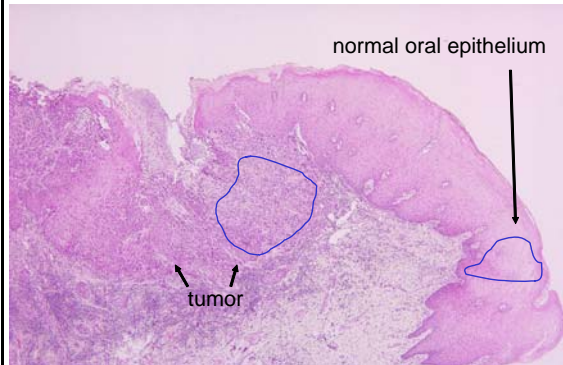


DNA マイクロアレイで正常上皮細胞と比較し最も高発現していた遺伝子は細胞成長因子、組織浸潤・転移に関わる遺伝子および癌遺伝子としての機能が報告されているものであった。このことは癌細胞としての特性を裏付けるものであった。一方、最も発現低下していた遺伝子は口腔癌での腫瘍増殖の阻害に関与するものや、細胞成長因子としての機能がある遺伝子であった。これは、個々の遺伝子の実際には知られていない機能がある可能性や、癌化による遺伝子変異が起こり機能に変化を伴っている可能性が示唆された。

(2) ヒト口腔癌 47 症例および健常者 47 名から末梢血を採取し、DNA を抽出し SNPs 多型解析を行った。既に今回の分析対象と異なる集団での口腔癌の case-control study をセミゲノムワイド (6800SNPs) に行っており有意に多型分布率に差が見られた 55SNPs についてのアレル頻度と、それらのハプロタイプ頻度の解析を行った。その結果、有意にアレル頻度に差が認められた単一 SNP は、7 番染色体と X 染色体上の 3SNPs であった。また、ハプロ

タイプブロックでは 7 番染色体と 13 番染色体上のハプロタイプ頻度に有意差が認められた。

(3) 凍結腫瘍切片から腫瘍部および正常上皮の LCM(Laser capture microdissection) サンプルからタンパク質を抽出した。



SELDI-TOF-MS 解析により、同一個体内で発現の増減を見た結果では、有意な変化が 51 ピークに見られた。

そのピーク情報から Database(TagIdent, ExPASy)で候補を抽出し、さらにマイクロアレイでの発現と一致する挙動のもの 12 種類のタンパク質に対する市販抗体を用い、Western blotting 解析を行った。OSCC 細胞株 12 例からタンパク質を抽出し、発現を確認した結果、少なくとも 2 遺伝子のタンパク質発現が過剰であることが示され、バイオマーカーとしての可能性が示唆された。そこでさらに 12 症例の腫瘍抽出凍結サンプルで検証したところ、有意差は認められず、最終的にマーカーと判定されるには到らなかった。今回は症例数が少なかったため統計解析の信頼度が得られなかった可能性も考えられるので、今後症例を増やした集団での検証が必要と思われた。

(4) マイクロアレイの結果では炎症に関連するサイトカインの活性化がうかがえる結果であったので、検証するため患者血漿サンプルにおいて、バイオマーカー候補タンパク質の発現を腫瘍群と対照群との 2 群での比較を行ったが、サンプルの症例数が十分に得られず、比較ができなかった。そこで、同一個体の 1 症例での治療前後で変動を示す候補タンパク質について、Milliplex®Map Human Cytokine / Chemokine Kit を用い、マルチプレックスサスペンションアレイ (Luminex200 system, Luminex 社) で検出する系で 42 種類のタンパク質についてのプロテオーム解析によるスクリーニングを行った。その結果、サイトカインや炎症に共通の代謝産物が候補物質として絞り込まれた。今後症例数を増

やし、診断に有用であるかを検討する必要があると思われる。

#### 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)

[学会発表] (計2件)

- ①発表者名: 村松祐理、神谷洋子、大島朋子、  
佐藤寛子、斎藤督、塚原祐輔  
発表標題: VeraCode テクノロジーを使用した LowPlexSNP ジェノタイピングの試み  
学会等名: 第16回日本遺伝子診療学会大会  
発表年月日: 2009. 7. 30~8. 1  
発表場所: ホテル札幌ガーデンパレス
- ②発表者名: Y. Kamiya, T. Ohshima, T. Sato, K. Satomura  
発表標題: Analysis of the specific expression determined by DNA-Microarray and SELDI-TOF-MS in the oral squamous cell carcinoma  
学会等名: 第68回日本癌学会学術総会  
発表年月日: 2009. 10. 1~3  
発表場所: パシフィコ横浜

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

大島 朋子 (OHSHIMA TOMOKO)  
鶴見大学・歯学部・准教授  
研究者番号: 50233101

##### (2) 研究分担者

神谷 洋子 (KAMIYA YOKO)  
鶴見大学・歯学部・非常勤講師  
研究者番号: 10460213

##### (3) 研究連携者

なし