

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 5月30日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21792020

研究課題名（和文）：口腔癌におけるMUC1遺伝子スプライシングバリエーションの発現とその意義

研究課題名（英文）：Expression of MUC1 splicing variants and its relationship with clinicopathological factors in oral squamous cell carcinoma.

研究代表者：浜田 倫史 (HAMADA Tomofumi)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・助教

研究者番号：00444894

研究成果の概要（和文）：本研究では、口腔癌におけるMUC1遺伝子のスプライシング異常の検出を行い、臨床病理学的事項との関連について明らかにすることを目的とした。まず、口腔癌症例の組織を用いて膜型ムチンの発現を検索し、MUC1およびMUC4の過剰発現は、口腔癌の有意な予後予測因子であることを明らかにした。その後細胞株や切除組織を用いて、MUC1のスプライシングバリエーションに対し個別の検討を開始した。その結果、それぞれの細胞株や症例により、発現バリエーションの種類およびその比率は大きな相違があることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：The goal of this study was to detect alternative splicing of MUC1 mucin in oral squamous cell carcinoma and to evaluate its relationship with clinicopathological factors. First, we investigate the expression level of membranous mucin in the resected tumor samples by immunohistochemistry and found that aberrant expression MUC1 and MUC4 was an independent prognostic factor indicating poor prognosis in patients with OSCC. Next, we have started to evaluate the expression level of each splicing variant of MUC1, using the specimen from surgically resected oral squamous cell carcinoma. The expression level and proportion of MUC1 splicing variants showed a huge variety in each specimen.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：MUC1、口腔癌、予後規定因子、選択的スプライシング、膜型ムチン、転移

1. 研究開始当初の背景

2001年のヒトゲノムプロジェクトの概要の発表により、十数万程度と予測されていた

ヒトの遺伝子の総数は25,000～35,000に過ぎないことが明らかになり、予想以上に少ない遺伝子が多数の多様なタンパク質を生み

出していることが判明した。また2001年、全遺伝子の約7割が選択的スプライシングを受けており、この機構がヒトのタンパク質の多様性を生み出す原因の一つであることが明らかになった。また近年、ヒト癌において、転写因子や細胞接着、シグナル伝達などに関わる多数の重要な蛋白質がスプライシング異常を起こしていることが報告され、スプライシング異常の結果産生された異常バリエーションは治療のターゲットとなりうる可能性が示唆されている。われわれは既に、口腔癌において、MUC1を含む膜型ムチンの異常高発現がリンパ節転移の危険因子になり、さらに予後不良と相関する傾向にあることを見いだしている。

さらにわれわれはMUC1遺伝子のスプライシングバリエーションの発現を、RT-PCRや独自開発したスプライシング特異的マイクロアレイを用いて検出する方法を開発し、ヒト消化器癌においてこれらが異常発現することを確認した。しかし、口腔癌において癌関連遺伝子のスプライシング異常を検討した報告は少なく、特にMUC1遺伝子に関する報告は行われていない。これらのことから、MUC1遺伝子スプライシング異常と口腔癌の発癌・転移・予後などの関連性の検討が今後の推進すべき重要な研究課題と思われ、今回の着想に至った。

2. 研究の目的

口腔顎顔面領域の悪性腫瘍は、その解剖学的位置から比較的発見しやすい部位に発症する。しかし早期の口腔癌などはしばしば自覚症状が乏しく、大きくなるまで放置される傾向があり、早期発見・治療という点では必ずしも満足できる現状にあるとは言えない。また口腔癌は、比較的早い時期から顎骨などの隣接組織に浸潤拡大しリンパ節転移をきたすことがあり、これらは予後不良の原因となる。このような背景から、口腔癌の病態に直接関与し、早期発見や治療方針の決定に有用であり、かつ治療のターゲットとなる強力な分子マーカーの登場が待たれている。真核生物において、mRNA前駆体からイントロンを除去しエクソン同士をつなぎ合わせるスプライシングは、遺伝子発現に必須な過程である。高等真核生物では、多くの遺伝子が多数のエクソンから構成され、その組み合わせにより複数種類の遺伝子産物を産生する(=選択的スプライシング)。また近年、悪性腫瘍を含むヒト疾患において、いくつかの蛋白質は異常な選択的スプライシング(=スプライシング異常)によってその機能が変化しているとの報告が増えつつある。MUC1は数種

類存在する膜型ムチンのひとつで、細胞表面に発現し細胞接着や細胞増殖に関与する。消化器系を中心としてヒトの多くの悪性腫瘍に異常発現し、予後不良因子として広く認識されており、また治療のターゲットとして多くの臨床治験が進められている。さらにMUC1遺伝子には数十種類のスプライシングバリエーションが確認されており、特にそのうちのいくつかのバリエーションは膵癌などのヒト悪性腫瘍において異常に高発現していることが報告されている。そこで今回我々は、口腔癌におけるMUC1遺伝子のスプライシング異常の検出を行い、浸潤・転移・予後などの臨床病理学的事項との関連について検討し、その結果を早期発見および治療方針の決定へ反映し、また分子標的治療のターゲットを見いだすことで、治療成績の向上に寄与することを目的とした。

3. 研究の方法

まず、1992年から2008年までに当科を受診した口腔扁平上皮癌206例を対象とし、これらの症例の臨床病理学的事項を検索するとともに予後を追跡調査し生存率を算出した。MUC1およびMUC4の発現は免疫組織化学的に検討した。抗体はそれぞれモノクローナル抗体を使用し、通法通り行った。その後、陽性であった腫瘍細胞の腫瘍全体に占める割合をカウントし、5%以上の発現を発現陽性群とした。その後膜型ムチンの発現と臨床病理学的事項、特に予後との関連性を統計的に解析した。

口腔癌細胞株におけるMUC1スプライシングバリエーションの発現状況を検討した。細胞からmRNAを抽出し、独自に設計したプライマーを用いて、RT-PCRまたはリアルタイムRT-PCRにて発現状況を検索した。良好な結果が得られたため、この予備実験で得られたプロトコルを臨床検体にも使用することとした。

次に、インフォームドコンセントを得られた患者の摘出腫瘍および口腔含嗽液を採取し、RT-PCRにてMUC1スプライシング異常の検出を行った。実験の至適条件を決定以後、(I)原発腫瘍におけるMUC1遺伝子のスプライシング異常と再発・予後などを含む臨床病理学的パラメータとの関連を評価し、実際に腫瘍マーカーや治療方針決定の指標となり得るかを明らかにする。さらに、(II)転移との関連性を検討するために《原発腫瘍vs転移巣》においてMUC1スプライシング異常の相違を検討する。また、(III)発

癌のリスクファクターや早期発見のための腫瘍マーカーとして使用できる異常バリエーションを見つけるために《正常歯肉 vs 前癌病変 vs 口腔癌》での比較も行う。

4. 研究成果

われわれはまず、口腔癌症例の組織を用いてMUC1およびMUC4ムチンの発現を検索し、臨床病理学的事項との関連性を検討することで、これらの膜型ムチンの多くのバリエーションを含む包括的なタンパクレベルでの発現が口腔扁平上皮癌の予後予測因子になりうるか200例以上の切除組織を用いて検討した。その結果、膜型ムチンであるMUC1およびMUC4の過剰発現は、口腔扁平上皮癌の新しい有意な予後予測因子であることを明らかにした (Int J Cancer. 2012. 130:1768-76.、Cancer. 2012. in press)。その後、口腔癌細胞株や切除組織を用いて、MUC1ムチンの数多く存在するスプライシングバリエーションに対し個別の検討を開始した。その結果、それぞれの細胞株や症例により、MUC1発現バリエーションの種類およびその比率は大きな相違があることが明らかになった。今後は症例数を増やしたのち統計解析を行い、口腔癌の予後不良因子であるMUC1のうち、直接的に予後に関連し治療の標的となりうるバリエーションを見いだしていく予定である。

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8件)

①Tomofumi Hamada, Tsunenobu Wakamatsu, Mayumi Miyahara, Satoshi Nagata, Masahiro Nomura, Yoshiaki Kamikawa, Norishige Yamada, Surinder K. Batra, Suguru Yonezawa, Kazumasa Sugihara. MUC4: a novel prognostic factor of oral squamous cell carcinoma. International Journal of Cancer. 5;130(8):1768-76. 2012. 査読有

②Tomofumi Hamada, Masahiro Nomura, Yoshiaki Kamikawa, Norishige Yamada, Surinder K. Batra, Suguru Yonezawa, Kazumasa Sugihara. DF3 epitope expression on MUC1 Mucin is Associated with Tumor Aggressiveness, Subsequent Lymph Node

Metastasis and Poor Prognosis in Oral Squamous Cell Carcinoma. Cancer 2012 Mar 20. doi: 10.1002/cncr.27542. 査読有

③Satoshi Nagata, Tomofumi Hamada, Norishige Yamada, Seiya Yokoyama, Sho Kitamoto, Yuji Kanmura, Masahiro Nomura, Yoshiaki Kamikawa, Suguru Yonezawa, Kazumasa Sugihara. Aberrant DNA methylation of tumor-related genes in oral rinse: A noninvasive method for detection of oral squamous cell carcinoma. 2012 Jan 17. doi: 10.1002/cncr.27417. 査読有

④Takanobu Kusumoto, Tomofumi Hamada, Norishige Yamada, Satoshi Nagata, Yuji Kanmura, Izumi Houjou, Yoshiaki Kamikawa, Suguru Yonezawa, Kazumasa Sugihara. Comprehensive Epigenetic Analysis Using Oral Rinse Samples: A Pilot Study. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery. 2012. 査読有 Jun;70(6):1486-94.

[学会発表] (計12件)

①浜田倫史
MUC4: 口腔扁平上皮癌の新しい独立予後因子
第4回鹿児島大学大学院医歯学総合研究科
口腔先端科学教育研究センター 歯系大学院
生研究発表会 (鹿児島市) (歯学部同窓
会奨励賞受賞発表) 2011. 12. 10

②浜田倫史
口腔扁平上皮癌のエピジェネティック異常
について
第21回日本口腔粘膜学会総会・学術集会
(鹿児島市) (教育講演)
2011. 9. 25

③浜田倫史
含嗽液による癌関連遺伝子の異常メチル化
を指標とした口腔癌の早期診断法の確立
第65回NPO法人日本口腔科学会学術集会
2011. 4. 22 (東京都)

④若松常信、浜田倫史、宮原麻由美、上村祐
二、永田聡、野村昌弘、杉原一正
口腔扁平上皮癌におけるMUC1、MUC4膜型ムチ
ン発現の検討
第64回NPO法人日本口腔科学会学術集会
2010. 6. 24 (東京都)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浜田 倫史 (HAMADA Tomofumi)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・

助教

研究者番号：00444894

(2) 研究協力者

山田宗茂 (YAMADA Norishige)

Cincinnati Children' s Hospital Medical
Center

永田聡 (NAGATA Satoshi)

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科顎顔面
疾患制御学分野

若松常信 (WAKAMATSU Tsunenobu)

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科顎顔面
疾患制御学分野

野村昌弘 (NOMURA Masahiro)

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科顎顔面
疾患制御学分野