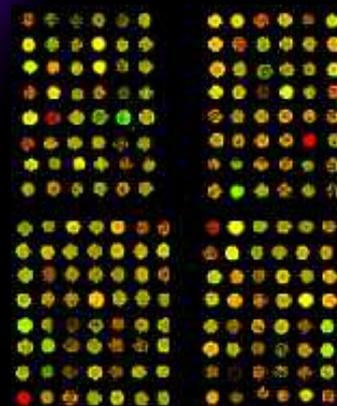
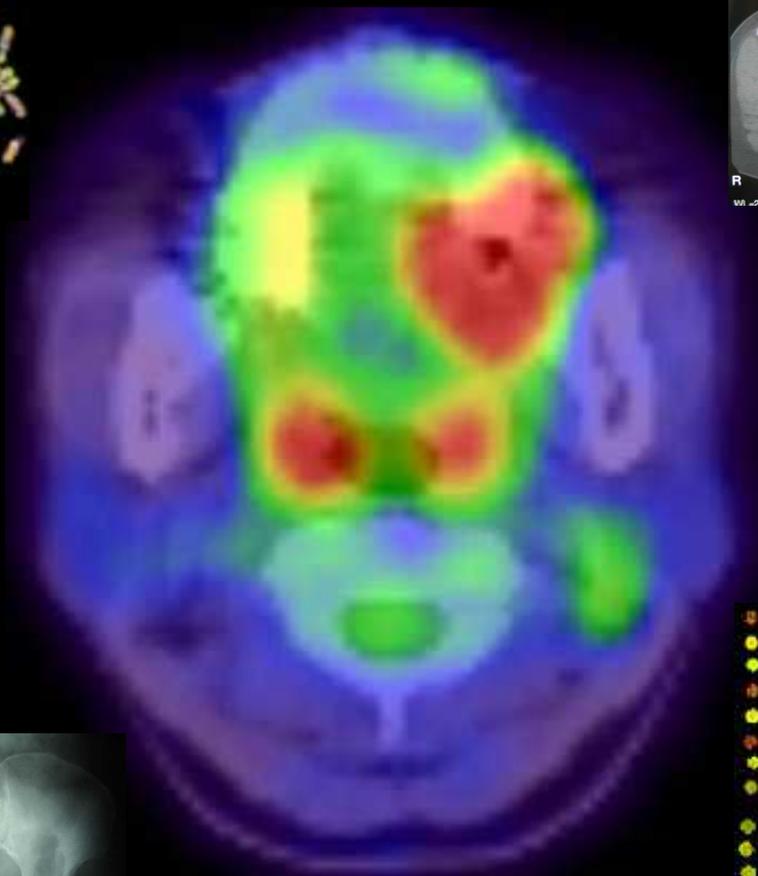


国立大学法人 東京医科歯科大学

第2回 硬組織疾患ゲノムセンター・シンポジウム

抄録集

開催日：平成20年11月25日(火) 午後1時～午後5時25分
場所：歯学部特別講堂(歯学部外来棟4F)



第2回 硬組織疾患ゲノムセンター・シンポジウム プログラム

開催日時: 11月25日 火曜日 午後1時～午後5時25分

場所: 歯学部特別講堂 (歯学部外来棟4F)

学長挨拶 (13:00-13:05)

大山喬史 学長

<Session I> 骨粗鬆症、骨軟部腫瘍のゲノム解析 (座長: 石田 剛、三木義男)

1. 硬組織疾患ゲノムセンター活動の概要 (13:05-13:15)

硬組織疾患分子医科学部門 野田政樹 センター長

2. ヒト滑膜間葉幹細胞の軟骨分化過程におけるDNAメチル化の解析 (13:15-13:45)

硬組織疾患分子医科学部門 江面陽一 准教授

3. 遺伝子発現情報のクラスター解析による腫瘍分類 (13:45-13:55)

硬組織疾患ゲノム機能解析部門 三木義男 教授

4. 患肢機能に重点をおいた骨軟部腫瘍切除法と再建法 (13:55-14:05)

先端的治療法開発部門 四宮謙一 教授

5. 分子生物学的手法による高分化型脂肪肉腫の鑑別診断の試み (14:05-14:15)

先端的治療法開発部門 五木田茶舞 先生

6. 上皮性分化を示す骨腫瘍: 稀少例の経験から (14:15-14:25)

骨軟部疾患・病理情報解析部門 石田 剛 研究教授

<特別講演-1>

7. 口腔扁平上皮癌の遺伝子およびタンパク発現解析 レーザーマイクロダイセクション法を用いた組織切片内の少数標的細胞からの発現解析を中心として (14:25-15:10)

昭和大学 歯学部 口腔病理学 立川哲彦 教授

休憩 (15:10-15:25)

<特別講演-2> (座長: 津田 均、稲澤讓治)

8. 網羅的解析からの骨軟部腫瘍へのアプローチ (15:25-16:10)

京都大学 再生医科学研究所 再生医学応用研究部門 組織再生応用分野 戸口田淳也 教授

<Session II> 口腔癌のゲノム解析

9. 顎顔面の多発奇形を伴う先天異常症の統合的ゲノム解析 (16:10-16:20)

硬組織疾患ゲノム構造解析部門 稲澤讓治 教授

10. 口腔癌における癌抑制microRNAの腫瘍特異的DNAメチル化異常 (16:20-16:30)

硬組織疾患ゲノム構造解析部門 小崎 健一 特任准教授

11. 腫瘍骨転移および口腔癌における分子変化の検索 (16:30-16:40)

口腔領域疾患・病理情報解析部門 津田 均 研究教授

12. 口腔癌はここまで治る (16:40-16:50)

先端的診断法開発部門 小村 健 教授

13. 口腔癌における予防・診断・予測・治療のための分子基盤解析 (16:50-17:00)

先端的診断法開発部門 森田圭一 助教

14. 顎顔面先天異常に対する歯科矯正学的アプローチ (17:00-17:10)

未来医療展開部門 森山啓司 教授

15. 先天性多数歯欠損におけるPAX9とMSX1の相互作用 (17:10-17:20)

未来医療展開部門 小川卓也 先生

閉会の辞 (17:20-17:25)

野田政樹 センター長

司会: 小崎 健一

第2回 硬組織疾患ゲノムセンター・シンポジウム 抄録

1. 硬組織疾患ゲノムセンター活動の概要

野田政樹^{1,2}

¹東京医科歯科大学 硬組織疾患ゲノムセンター 硬組織疾患分子医科学部門

²東京医科歯科大学 難治疾患研究所 分子薬理学分野



本プロジェクトにおいては、東京医科歯科大学における硬組織疾患研究の臨床ならびに基礎の研究集団を有機的に結集し全学の横断的な研究の集合体として疾患情報と病態情報、さらにはこれらの基盤となる分子生命科学的な情報を基盤とした疾患科学研究を推進することを目的としている。

本研究の組織としては、1. 硬組織疾患分子医科学研究部門、2. 硬組織疾患ゲノム構造解析部門、3. 硬組織疾患ゲノム機能解析部門、4. 骨軟部疾患・病理情報解析部門、5. 口腔領域腫瘍疾患・病理情報解析部門、6. 先端的診断法開発部門、7. 先端的治療法開発部門の7部門(センター長 野田政樹)より成る。すなわち 医学部・歯学部・研究所の融合的な横断組織の研究が開始され二人の特任教員を採用し、ゲノムセンター構成員による研究推進会議を開催し、臨床データならびにゲノムデータの双方からの情報を解析する研究を展開している。すでに国際評価パネルのもとに方針の評価を行って頂き、サイエンスレベルならびに研究費の使用の方向性などの上で高い評価を受けるとともに、今後の研究の方針についてもアドバイスを頂き研究の推進がなされている。

硬組織疾患ゲノムセンターにおいては、硬組織疾患のテーラーメイド医療の実現を目指すとともに、硬組織疾患のトランスレーショナルリサーチへの発展を視野に入れた活動を行い、本研究センターは硬組織におけるベンチからベットサイドへの医療の貢献を目指して全学の統合的な全学的組織として研究を展開している。

2. ヒト滑膜間葉幹細胞の軟骨分化過程におけるDNAメチル化の解析

江面陽一^{1,2}、関矢一郎³、宗田大⁴、野田政樹^{1,2}

¹東京医科歯科大学 硬組織疾患ゲノムセンター 硬組織疾患分子医科学部門

²東京医科歯科大学 難治疾患研究所 分子薬理学分野

³東京医科歯科大学大学院 医歯学総合研究科 支持分子制御学講座(軟骨再生学分野)

⁴東京医科歯科大学大学院 医歯学総合研究科 運動器外科学分野



ヒト間葉系幹細胞(MSCs)の軟骨細胞への分化誘導系においては、様々な遺伝子の特徴的な発現変動が観察される。このような変化のすくなくとも一部には細胞系譜に特異的な遺伝子サイレンシング機構が働くものと推定される。我々は、MSCsの軟骨細胞への分化誘導中におけるエピジェネティックな発現制御をうける候補標的遺伝子の選別として、3通りのカテゴリー、すなわち(A)「軟骨細胞分化に際して重要な関与の知られる転写因子遺伝子」、(B)「MSCsの軟骨細胞分化に際して発現の漸増する軟骨特異的遺伝子」、(C)「MSCsの軟骨細胞に際して発現抑制をうける遺伝子」を想定して、ゲノムDNAのメチル化修飾を介した発現調節に関して以下の検討を行なった。

まず、(A)「分化制御に関わる候補転写因子」の候補遺伝子のうち、遺伝子転写開始点(TSS)を含むCpGアイランドをもつ遺伝子はRUNX2およびSOX9の2遺伝子であった。これらの遺伝子上流から「CpG部位の豊富な」(「高CpG」)約200塩基対の領域を決定し、バイサルファイトシーケンス法によるゲノムDNAのメチル化修飾の状態の解析を、ヒト滑膜由来MSCsの軟骨細胞への分化誘導前および3週間の分化誘導後に行なった。その結果、両遺伝子座における解析領域はいずれも極めて低いメチル化状態を示し、軟骨細胞への分化誘導によっても低メチル化状態は維持された。またこのような低メチル化状態は、ヒト関節軟骨の各層におけるゲノ

△DNAの解析によっても観察された。MSCsにおける両遺伝子座の低DNAメチル化レベルの維持は、これらの細胞の多分化能が特定の細胞系譜への分化誘導後も一部保持されることと関連するものと推察された。

次にカテゴリー(BおよびC)の候補選択のため、ヒトMSCsの軟骨細胞分化誘導過程のDNAマイクロアレイ解析を行ない、発現増加もしくは低下を示した代表的40遺伝子のうち、TSS上流にCpGアイランドをもつ8遺伝子(CHM-1, FGFR4, CHAD, MATN4およびSOX4, GREM1, GPR39, SDF1)を選別して、合計9箇所のDNA領域のメチル化について解析した。「高CpG」と判断された8遺伝子領域のうちSDF1遺伝子をのぞく7領域は、分化誘導前のMSCsにおける低メチル化状態が示されたが、軟骨細胞分化に伴い発現の抑制されるSDF1遺伝子上流の解析領域については「高CpG」領域であるにもかかわらず分化誘導前のメチル化は約85%と高かった。さらにSDF1と同様に分化誘導に伴い発現の抑制されたSOX4、GREM1、GPR39遺伝子座の低メチル化レベルは分化誘導後も低く維持されたが、SDF1遺伝子座における高メチル化を受けた高CpG領域は軟骨分化誘導後には約60%へと減少した。このようなメチル化レベルの変化は、ヒト関節軟骨における各層別に検討したメチル化解析によっても支持された。したがって、SDF1遺伝子上流領域は分化制御にともなうDNAメチル化制御に対して感受性をもつものと推定され、MSCsの未分化段階の維持または軟骨細胞分化誘導に関して積極的な意味をもつものと推測された。このメチル化レベルの変動は遺伝子発現レベルとは必ずしも逆相関しなかったことから、発現制御に関して補足的なチェック機構として作用するものと推測されるが、その具体的な意義について検討をすすめる必要があると思われる。

3. 遺伝子発現情報のクラスター解析による腫瘍分類

三木義男^{1,2,3}

¹東京医科歯科大学 硬組織疾患ゲノムセンター 硬組織疾患ゲノム機能解析部門

²東京医科歯科大学 難治疾患研究所 分子遺伝分野

³(財)癌研究会ゲノムセンター



乳がんの化学療法感受性の予測を目的とし、術前化学療法を受ける患者を対象に化学療法前のがん組織におけるトランスクリプトーム解析を行い、化学療法感受性を規定する遺伝子群を検討した。このような網羅的解析は複数の予測モデルを生みだすが、その中から高精度のシステムを構築することは容易ではない。そのような背景を踏まえ、われわれは現在、乳がんの薬剤感受性など特定の病態を高精度に予測し臨床応用するため2種のシステム開発を進めている。第一は候補遺伝子の機能を理解した遺伝子の選定である。そのために、細胞アレイ(transfection array ;TFA)を用いて、候補遺伝子を機能解析により絞込み、真の予測システムの同定を試みた。第二は遺伝子発現情報のクラスター解析による乳がんの分類である。乳がんの大部分は腺がんであるが、病理学的形態や生物学的性質は均一ではなく、患者により多様な姿をとる。しかし、決してすべてが個別ではなくその形成機序に関して幾つかの類型が存在する。われわれは乳がんの2万7千種の遺伝子発現情報を利用し、unsupervisedなクラスター解析により5種のサブグループに分類した。これはSorlie分類として報告されたものと類似したものであるが、あるサブグループのすべての症例は抗がん剤抵抗性を示した。どのような細胞機能がこの分類を特徴付けているのかまだ、明確ではないが、乳がんの基本となる分類である可能性を探っている。このような乳癌化学療法の感受性予測の臨床応用について紹介する。

4. 患肢機能に重点をおいた骨軟部腫瘍切除法と再建法

四宮謙^{1,2}

¹東京医科歯科大学 硬組織疾患ゲノムセンター 先端治療法開発部門

²東京医科歯科大学大学院 医歯学総合研究科 整形外科学分野



バリアーの概念を導入した切除縁評価法に基づく手術計画により悪性骨軟部腫瘍の局所制御性は満足すべきものになってきた。今後骨軟部腫瘍の治療成績を向上させるためには転移病巣を制御することで生存率を上昇させ、さらに患肢機能をいかに温存、回復させるかが重要である。転移病巣の治療は従来の化学療法では既に限界がみえており、分子標的療法や免疫療法などの新しいコンセプトに基づいた治療法を開発することが必要である。一方、整形外科医として治療の目指すべき方向は腫瘍切除後に良好な患肢機能を獲得させることにある。すなわち安全に切除縁を縮小しつつよりよい患肢機能を温存し、さらに再建するための手術法を開発することが重要である。最近我々グループが新規に応用、開発してきた手術、再建法をここに紹介する。

1. 患肢機能温存のためには、腫瘍の局所制御性を損なうことなく広範切除を行う一方で、安全に切除縁を縮小していく工夫が必要とされる。*In situ preparation*法(ISP)の開発。
2. 人工関節置換を行った患肢の機能を改善する目的でポリプロピレンメッシュを用いた靭帯、筋附着部と人工物との接合の獲得をめざした生物学的enthesi^sの工夫。
3. 腫瘍切除による大容量骨欠損に対する生物学的再建法の開発と応用

5. 分子生物学的手法による高分化型脂肪肉腫の鑑別診断の試み

五木田茶舞^{1,4}、阿江啓介^{1,4}、下地 尚⁵、石田 剛^{2,7}、三木義男^{3,5,6}、四宮謙^{1,4}

¹東京医科歯科大学 硬組織疾患ゲノムセンター 先端治療法開発部門

²東京医科歯科大学硬組織疾患ゲノムセンター 骨軟部疾患・病理情報解析部門

³東京医科歯科大学 硬組織疾患ゲノムセンター 硬組織疾患ゲノム機能解析部門

⁴東京医科歯科大学大学院 医歯学総合研究科 整形外科学分野

⁵東京医科歯科大学 難治疾患研究所 分子遺伝学

⁶(財)癌研究会ゲノムセンター 遺伝子発現解析部門

⁷国立精神・神経センター国府台病院 臨床検査部



<目的> 高分化型脂肪肉腫発生頻度が高い成人軟部肉腫であるが、臨床画像や病理組織学的に良性の脂肪腫と類似しており、両者の鑑別が困難なため治療方針に苦慮することが多い。本研究の目的は、両者の鑑別に有用な新規の遺伝子群を網羅的遺伝子発現解析により同定し、また**high-resolution DNA mapping array**を用いた1次構造解析により、いわゆる”borderline”領域の高分化型脂肪肉腫のDNA増幅パターンを検討し、分子生物学的手法による両者の鑑別を試みることである。

<進捗状況> 2002年7月から2005年12月までに外科的切除をされた脂肪腫および高分化型脂肪肉腫の凍結材料を使用する。脂肪肉腫29例、脂肪腫30例について **Affymetrix expression array** を用いた発現解析を行った結果、高分化型脂肪肉腫において高発現しているとされる**CDK4**、**MDM2** の発現が確認された。**DNA**の抽出は脂肪肉腫37例、脂肪腫35例について **Affymetrix 500K mapping array** を用いて実験をおこなった。健常人血液から採取した **unpaired-reference DNA**を用いてコピー数を検討した症例のうち代表例を報告する。リング/マーカー染色体陽性の脂肪肉腫では、5例中全例に12番染色体の増幅を認めた。このうち3例では1番染色体の増幅を同時に認めた。一方、リング染色体陰性の脂肪肉腫でも、7例中4例で12番染色体の増幅を認め、内3例では1番染色体の増幅を伴い、リング陽性の脂肪肉腫とほぼ同様の増幅パターンを示した。7例中3例では明らかなコピー数異常は認めなかった。脂肪腫においては、4例中3例で明らかなコピー数増幅は認めなかったが、1例で12番及び1番染色体の増幅を認め、これは脂肪肉腫のパターンと類似していた。

6. 上皮性分化を示す骨腫瘍：稀少例の経験から

石田 剛^{1,2}

¹東京医科歯科大学硬組織疾患ゲノムセンター 骨軟部疾患・病情報解析部門

²国立精神・神経センター国府台病院 臨床検査部



骨は間葉系組織であるので、非上皮性間葉系腫瘍が骨腫瘍として発生する。しかし、一部の骨腫瘍では上皮性分化が見られることがあり、上皮性マーカーである**cytokeratin (CK)**の発現として、免疫組織化学的に比較的容易に確認できる。間葉系腫瘍における上皮性分化という現象を検索することは鑑別診断上有益であるだけでなく、腫瘍の多様な分化や起源解明の手がかりを与うるもので腫瘍細胞生物学的に重要と考えられる。一口に上皮性分化といってもその内容は多様であり、次の3群に大別される。すなわち、**1)**一部の腫瘍細胞が**aberrant**にCKの発現が見られるもの(骨肉腫、Ewing肉腫、平滑筋肉腫など)、**2)**腫瘍細胞が類上皮形態を示し、かつCKの発現を認めるもの(脊索腫、類上皮血管内皮腫、類上皮血管肉腫など)、**3)**上皮索、腺管形成など上皮性分化が明らかな腫瘍(長管骨アダマンチノーマ、滑膜肉腫など)である。

今回の発表では、これらの腫瘍を通覧し、上皮性分化を手がかりに明らかになった長管骨アダマンチノーマと骨線維性異形成(**osteofibrous dysplasia**)との関係を示す。また、近年経験したきわめて稀な上皮性分化を示した骨腫瘍2例を呈示する。1例は、二次性悪性骨巨細胞腫で、悪性成分が骨肉腫と扁平上皮癌の像を示した癌肉腫の症例で、もう1例は、**Gardner**症候群に骨内毛母腫を発生したものである。尚、骨内発生のも母腫はこれまでに報告がない。

<特別講演-1> 7. 口腔扁平上皮癌の遺伝子およびタンパク発現解析

レーザーマイクロダイセクション法を用いた組織切片内の少数標的細胞からの発現解析を中心として

立川哲彦¹

¹昭和大学 歯学部 口腔病理学



癌細胞は細胞分化度、細胞増殖度、さらには浸潤態度などで著しい多様性がみられる。これらはさらにそのステージにより大きく異なる。このような細胞の多様性は本来の病変の診断、進行および予後判断の難しさがあり、さらには治療法の選択にも影響する。そこで、病変を形成する細胞の性状解析が重要となり、その中でも細胞の分子的解析が必要となる。これらの分子生物学的解析は**morphological genomics**という。特に、遺伝子のプロファイリングを定義づけることは組織の発生、疾病のメカニズムの解明につながり、病変の多様性の解明において重要な点となる。一方、口腔扁平上皮癌の発生は扁平上皮の基底細胞から始まり、基底細胞層内の細胞異型性を増加させ、上皮内での形質転換として発生する上皮内癌、さらには形質転換した細胞が基底膜を破壊し、上皮結合組織中に浸潤する初期浸潤癌の形態がある。これらの形質転換過程には様々な形態変化、蛋白形成変化、遺伝子変化が認められ、特に、細胞自身の悪性転換は遺伝子の変化がその主役を担っている。さらに、形質転換後の癌細胞の浸潤や転移にも遺伝子変化の機能に基づく結果として表現されることが考えられる。そこで、本研究ではマイクロダイセクション法(LMD法)を用い、口腔扁平上皮癌細胞の細胞分化における遺伝子的特徴およびタンパク発現を検索し、前癌病変の形質転換における遺伝子解析することを目的とした。検索材料は手術により摘出された口腔扁平上皮癌の凍結切片を用いた。浸潤形態の違いによる遺伝子発現を検索するために、形態学的に3つのパターンに分類した。**INF** は大きな胞巣構造を形成して膨張性に発育するタイプで、このタイプは比較的予後が良いとされている。**INF** は胞巣から枝を出すように浸潤するタイプ。**INF** は癌細胞がビマン性に広がり浸潤するタイプで、このタイプは最も予後が悪いとされている。この3つのタイプにおいてLMD法を用い、標的癌細胞を回収し、マイクロアレイにて遺伝子発現を検索した。その結果、どのタイプの癌でというよりも癌の浸潤状態で遺伝子発現の様相が大きく異なることが判明した。また、マイクロアレイで検索した遺伝子の中で、**KIAA14**は転移実験においても有意に増加し、転移遺伝子の一つであることが示唆された。さらに、癌の浸潤タイプによる**Rad21**の発現を検索した結果、浸潤度が強くなるに

従いRad21遺伝子の発現が減少していた。特に、臨床的にも転移をきたした扁平上皮癌では有意にRad21の発現は抑制されていた。また、Rad21タンパクの発現をLMD法とウエスタンブロットング法で検索した場合でも、Rad21の発現は、浸潤度が強い癌細胞では発現の低下が見られた。以上のことから、癌細胞の発生および進展における遺伝子特性を検索した結果、扁平上皮癌の遺伝子発現の多様性を見出したが、中でもKIAA14やRad21は癌細胞の浸潤転移に強い相関を示す遺伝子であることが示唆された。

<特別講演-2> 8. 網羅的解析からの骨軟部腫瘍へのアプローチ

戸口田淳也¹

¹京都大学 再生医科学研究所 再生医学応用研究部門 組織再生応用分野



上皮系組織に発生した悪性腫瘍である癌腫に比べて、肉腫の発生頻度は1万分の1程度であり、極めて稀な病態である。加えて発生部位、画像所見、病理所見、臨床動態のいずれも極めて多様であり、症例毎に個別の戦略を考慮しなければならない。つまり肉腫専門医は個々の症例は少ないが、肺癌、乳癌や前立腺癌など、全ての癌腫を相手にしている癌専門医に相当し、癌腫全てを一つのものとして捉えることが不合理であると同様に、肉腫全体を一つのものとして取り扱うこと自体が不合理である。肉腫は分子病態から融合遺伝子に代表される腫瘍特異的変異をもつ腫瘍と非特異的変異が主体の腫瘍に分類することができる。前者は、遺伝子診断が可能であり、分子標的治療へのアプローチも現実性がある。問題は後者であり、特に軟部発生の紡錘形腫瘍群は極めて多様である。我々を含めいくつかのグループが遺伝子発現プロファイルからの分類を試みているが、診断という点で病理学的解析を上回る情報が得られたものは少ない。そこで我々は病理学的分類に関係なく、臨床上的悪性度と相関する遺伝子を探索し、一つの機能未知の遺伝子を同定した。単離した遺伝子がコードする蛋白の機能は*in vitro*及び*in vivo*の実験により、細胞運動に関連するものであり、講演ではその詳細を紹介したい。

発現プロファイルからの解析は組織幹細胞との関連性に関しても情報を与えてくれる。間葉系組織における幹細胞である間葉系幹細胞は、同時に肉腫に発生起源細胞にもなりうるが、発現プロファイルからみると肉腫とは大きな隔たりがある。いわゆる肉腫幹細胞が組織幹細胞としての多分化能を維持する必要があるかどうかは議論のあるところであるが、組織幹細胞としての特質の一つが細胞死シグナルに対する抵抗性であれば、両者は共通している可能性があり、この話題に関してもいくつかのデータを紹介したい。

9. 顎顔面の多発奇形を伴う先天異常症の統合的ゲノム解析

稲澤譲治^{1,2}、林 深¹、本田尚三¹、井本逸勢^{1,2}

¹東京医科歯科大学硬組織疾患ゲノムセンター 硬組織疾患ゲノム構造解析部門

²東京医科歯科大学 難治疾患研究所 分子細胞遺伝



顎顔面の多発奇形を伴う精神遅滞 (MCA/MR)などの非定型的な臨床像を示す先天異常疾患は潜在的ゲノム構造異常が病態形成の背景に存在すると考えられる。我々は全国20施設と形成したコンソーシアムで収集したMCA/MR症例を対象に、既知染色体異常症の原因領域と全染色体のサブテロメア領域を対象としたGenome Disorder-Array (GDアレイ)による一次スクリーニングを行い、異常が検出されなかった症例を対象に全ゲノムアレイ(Whole Genome Array-4500 ; WG4500)を用いて二次スクリーニングを行った。GDアレイでは378症例中39症例 (10.3%)に、さらにGDアレイ陰性の75症例中20症例 (26.7%)においてWG4500解析でゲノムコピー数異常を検出した。これらの結果はアレイCGHが既存の染色体検査を代替・補完する診断ツールとして有用であるばかりでなく、原因不明のMCA/MRの病態解明にも極めて有用であることを示している。

10. 口腔癌における癌抑制microRNAの腫瘍特異的DNAメチル化異常

小崎健一^{1,2}、井本逸勢^{1,2}、稲澤譲治^{1,2}

¹東京医科歯科大学硬組織疾患ゲノムセンター 硬組織疾患ゲノム構造解析部門

²東京医科歯科大学 難治疾患研究所 分子細胞遺伝



全ゲノムの95%以上を占める非コード(non-coding)領域から転写されるnon-coding RNAは蛋白質には翻訳されないRNAであるため、non-coding領域はゲノム上で役に立たないジャンク領域とされてきた。しかし、近年、non-coding RNAによる遺伝子発現制御機構が明らかにされたことから、従来の遺伝情報の流れに関する一方向の直線的なセントラルドグマに加えて、機能性RNAによって制御される高次のゲノム情報発現ネットワークが存在すると考えられるようになった。特に、蛋白質をコードしない機能性小分子RNAであるmicroRNA(miRNA)に関しては、標的mRNAに対する配列特異的な翻訳阻害などのRNAサイレンシングにより、癌遺伝子あるいは癌抑制遺伝子として機能することが明らかにされたことから、ゲノム情報発現系の新たな調節・制御分子として注目されている。一方、癌細胞におけるDNAメチル化異常は、遺伝子変異(mutation)や欠失(deletion)といったゲノムの一次構造異常と同様に、癌抑制遺伝子の不活化機構に重要なエピゲノム異常として知られているが、癌抑制的に働く数種類のmiRNA遺伝子の癌細胞における発現がDNAメチル化異常によって抑制されていることが相次いで報告され、エピゲノム異常による癌抑制miRNA遺伝子不活化機構の重要性が明らかにされつつある。我々も、最近、口腔扁平上皮癌(OSCC)細胞株18株および正常口腔粘膜上皮由来不死化細胞株RT7における148種類のmiRNAに関する定量的発現解析にDNAメチル化解析を組み合わせた絞り込みと、OSCC患者の癌部・非癌部組織を用いた詳細な解析によって、癌特異的なDNA過剰メチル化により発現抑制される癌抑制遺伝子型miRNAとしてmiR-137とmiR-193aを見出した。さらに、miR-137は細胞増殖抑制作用を、miR-193aはアポトーシス誘導作用を有すること、また、各々の標的分子が細胞増殖に重要な癌遺伝子として知られているCDK6とE2F6であることを明らかにした。以上の如く、蛋白質をコードする既知の癌遺伝子・癌抑制遺伝子と同様に多数のmiRNAが癌の発症・進展過程へ直接的あるいは間接的に深く関与すること、特に、癌抑制遺伝子型miRNAによるRNAサイレンシングが腫瘍特異的DNAメチル化異常による遺伝子サイレンシングを受けることが示されたことから、癌におけるmiRNA研究は今後も飛躍的に進展すると予想される。

11. 腫瘍骨転移および口腔癌における分子変化の検索

津田 均^{1,2,3}、菊池良子²、大橋一輝^{2,4}

¹東京医科歯科大学 硬組織疾患ゲノムセンター 口腔領域疾患・病情報解析部門

²防衛医科大学校 病態病理学

³国立がんセンター中央病院 臨床検査部 病理検査室

⁴防衛医科大学校 整形外科



Receptor activator of nuclear factor B ligand (RANKL)やosteoprotegerin (OPG)は生体の骨リモデリングにおける骨吸収を担う破骨細胞の分化、活性化にかかわる分子として注目されている。免疫組織化学法により転移性脊椎腫瘍でRANKLとOPGの発現を検索したところ、腎癌、前立腺癌、リンパ系腫瘍で高頻度にRANKL発現を認めた。いっぽう検索したほとんどの腫瘍でOPGの発現を認めた。腫瘍の骨転移巣形成にRANKL、OPGは重要な役割を果たしているものと考えられた。Connective tissue growth factor (CTGF)は卵巣癌の進展に関与することが示されたが、口腔癌において免疫組織化学的に発現を検討したところ興味深い知見が得られたので報告する。

12. 口腔癌はここまで治る

小村 健^{1,2}

¹東京医科歯科大学 硬組織疾患ゲノムセンター 先端診断法開発部門

²東京医科歯科大学大学院 歯医学総合研究科 顎口腔外科学分野



今日、口腔癌の治療成績は、画像診断の進歩による癌診断精度の向上や癌化学療法の進歩に加え、再建手術の導入による手術適応の拡大などによりその5年生存率は**60～70%**にまでに向上してきている。

わが国においては癌治療の均てん化が唱えられ、口腔癌治療においてもエビデンスに基づいた標準的な治療が提唱されている。しかし、その中で、口腔が摂食、咀嚼、嚥下、構音など日常生活を営んでゆく上で極めて重要な機能を担っていることもあり、治療に伴う障害が**QOL**に大きく影響を与えることから、個々の患者に応じた術前治療、術前治療効果に応じた原発巣切除範囲の縮小、頸部リンパ節転移に対する郭清範囲の縮小、超選択的動注療法などの低侵襲治療により、術後の**QOL**を確保しつつ根治をはかる治療法が応用されている。こうした状況の下、**2001年～2007年**までに東京医科歯科大学顎口腔外科で加療した新鮮口腔癌症例(**n=556**)の5年累積生存率は、T進行度別では**T1: 98.1% (n=180)**、**T2: 89.4% (n=237)**、**T3: 80.8% (n=73)**、**T4: 66.8% (n=66)**であり、Stage別では**Stage Ⅰ: 98.1% (n=175)**、**Stage Ⅱ: 91.5% (n=200)**、**Stage Ⅲ: 82.9% (n=66)**、**Stage Ⅳ: 71.8% (n=115)**と良好であった。部位別では舌: **93.6% (n=274)**、下顎歯肉: **92.9% (n=76)**、上顎歯肉: **84.8% (n=45)**、頬粘膜: **83.5% (n=56)**、口腔底: **96.2% (n=35)**などであった。これらの治療成績の向上には、術前の**CT**、**MRI**、**PET**、**US**等を併用した画像診断精度の向上とともに、進行癌に対する術前の**TS-1**同時併用放射線療や術後の**CDDP + 5FU**同時併用放射線療法などの補助療法が治療成績の向上に寄与していると考えられた。また、局所進行癌に対しては積極的に遊離組織移植(前腕皮弁、腹直筋皮弁、肩甲骨皮弁、腓骨皮弁)による再建手術を併施し(**n=243**)、頸部リンパ節転移に関してはセンチネルリンパ節生検により予防的頸部郭清を省略することにより、術後の**QOL**が確保されていた。

13. 口腔癌における予防・診断・予測・治療のための分子基盤解析

森田圭一^{1,2}、伊東大典^{1,2}、小村 健^{1,2}

¹東京医科歯科大学 硬組織疾患ゲノムセンター 先端診断法開発部門

²東京医科歯科大学大学院 歯医学総合研究科 顎口腔外科学分野



われわれは、口腔癌治療においてさらなる治療成績の向上を目指し、エビデンスに基づいた予防・診断・予測・治療を実現するための研究を行っている。予防については、含嗽液による口腔癌・前癌病変の早期発見に関する試みで、これは、癌が口腔に存在する特徴から、含嗽によって剥離する細胞をターゲットに**SCCA**をマーカーとして**PCR**法により口腔癌・前癌病変を検出するもので、当科での検討では、口腔癌において**94.1%**の陽性率があり、大規模で簡便な検診が実現可能と考えている。また、前癌病変である口腔白板症の上皮性異型性程度を遺伝子発現パターンによって診断するシステムの構築を目指し、マイクロアレイ解析による診断マーカー候補が抽出された。これは将来的な癌化マーカーの開発につながる成果と考えられる。一方、診断においては、上記検診システムや微小リンパ節転移検出のためのバイオマーカーについて、口腔扁平上皮癌**102**症例の検討から、**CK17**が有用な検出マーカーとして抽出された。これらバイオマーカーを用いて口腔癌におけるセンチネルリンパ節概念の成立を検証し、正確な診断に基づいた手術療法における**minimal invasive surgery**の実践をすすめている。一方、画像診断や病理組織学的診断などの臨床データから後発転移の有無や予後のある程度予測できるものの、オーダーメイド治療につながるような正確な予後予測は難しく、これらを実現すべくバイオマーカーの探求をすすめた。その1つとして、舌扁平上皮癌組織標本の免疫組織染色により**clAP-1**の発現が頸部リンパ節転移を予測する新規バイオマーカーとして有用であることが示された。これら予防・診断・予測のシステム開発とともに、口腔癌の悪性化や浸潤・転移メカニズムを解明することにより新たな治療法が確立されることを目指し、われわれが独自に開発した骨浸潤モデルマウスを用いた浸潤メカニズムの解析をすすめている。

14. 顎顔面先天異常に対する歯科矯正学的アプローチ

森山啓司^{1,2}

¹東京医科歯科大学 硬組織疾患ゲノムセンター 未来医療展開部門

²東京医科歯科大学大学院 医歯学総合研究科 顎顔面矯正学分野



一般に先天異常を有する患者の約7割に、何らかの顎顔面奇形が生じるといわれている。口腔顎顔面領域に生じる奇形は、咀嚼、嚥下、呼吸といった生命を維持する上で大切な生理機能に影響を及ぼすだけでなく、快適な社会生活を営む上で欠かせないコミュニケーションにも障害を引き起こすことから、患者・家族の心理社会的負担は大きなものとなる。

当分野は、昭和55年に歯科矯正学第二講座として発足以来、口唇裂・口蓋裂を始めとした先天異常患者や顎変形症患者の成長過程において顎口腔領域に表出してくる種々の形態異常や機能障害に対し、チーム医療の一環として歯科矯正学的立場からアプローチを行うとともに、これに関連した教育・研究活動を行ってきた。また近年では、医療保険制度の改正により、昭和57年に唇顎口蓋裂の歯科矯正治療に健康保険が適用されたのを皮切りに、平成14年に第一・第二鰓弓症候群、鎖骨頭蓋異骨症、Crouzon症候群、Treacher Collins症候群、Pierre Robin症候群、Downs症候群の6種類の先天異常、さらに平成16年にはRussell-Silver症候群、Turner症候群、Beckwith-Wiedemann症候群、Apert症候群の4種類を加えた計10種類(唇顎口蓋裂を含めると11種類)の先天異常に対する歯科矯正治療にも保険適用の枠が拡大されたことにより、先天異常患者のQOL向上に貢献できる機会もさらに拡大された。一方、近年の分子生物学的研究の飛躍的進歩により、多くの疾患の原因遺伝子が解明されるようになった。先天異常を含めた種々の疾患患者の臨床データや検体をバイオリソースとしてデータベース化することで、今後新たな治療法開発の糸口を見いだす可能性も出てくると期待される。本講演では当科を受診した先天異常患者の概要について紹介するとともに、治験例についても供覧してみたい。

15. 先天性多数歯欠損におけるPAX9とMSX1の相互作用

小川卓也^{1,2}

¹東京医科歯科大学 硬組織疾患ゲノムセンター 未来医療展開部門

²東京医科歯科大学大学院 医歯学総合研究科 顎顔面矯正学分野



永久歯胚の先天欠損は、顎顔面領域に見られる最も頻度が高い疾患の一つである。先天欠如歯が多数にわたる場合、咀嚼、摂食、発音といった口腔機能に重大な影響を与え、機能回復のための治療は大変複雑になり、長期にわたる治療、多大な治療費といったさまざまな負担を患者に強いることになる。近年、転写因子であるMSX1やPAX9の変異によって常染色体性優性に家族性に先天性多数歯欠損が引き起こされることが明らかにされた。しかし、遺伝子にまったく同じ変異を持つ同一家系内において、欠損部位が異なるなど、臨床的な多様性を示すことが知られている。この多様性は、一つの遺伝子の変異により欠損部位が特定されるのではなく、その遺伝子の機能を修飾する別の遺伝子、修飾遺伝子(Modifier Gene)の作用によるものと推測される。家系内の多様性は、遺伝相談にとっても大きな問題であり、修飾遺伝子の同定は臨床的に重要な課題である。今回、多数歯欠損を引き起こすPAX9の変異タンパクの機能解析を行い、その病因論を明らかにすると共に、MSX1がPAX9の修飾遺伝子になりうる可能性について述べたい。PAX9遺伝子の突然変異にはアミノ酸置換、フレームシフトなどさまざまなものがみられ、それらはDNA結合ドメインに集中している。今回、DNA結合ドメイン内のミスセンス変異であるIle87Pheの変異に注目した。Ile87PheをCOS7細胞に強制発現させたところ、核内で安定して発現しているものの、変異タンパクにおいてDNA結合能が失われているのが認められた。また、変異タンパクは正常タンパクの機能を阻害しなかった。一方、免疫沈降により、Pax9とMsx1の相互作用(protein-protein interaction)を認め、歯胚の分化に重要なBmp4のプロモーターを相互に制御しているのが明らかにされた。さらに、PAX9の変異を有する多数歯欠損の一家系においてMSX1の多型を同定した。以上のことより、転写因子としてのPAX9の機能が喪失することによって、多数歯欠損が引き起こされ、ハプロ不全(haploinsufficiency)を示しているのが明らかにされた。ハプロ不全による表現系は修飾因子の影響を受けやすいことが知られており、MSX1との相互作用がこのような多様な発現様式を示していると推測される。

硬組織疾患ゲノムセンター 各部門の紹介

硬組織疾患分子医科学研究部門



教授 野田政樹

<併任, センター長、難治疾患研究所長、
難治疾患研究所 分子薬理学 教授>



准教授 江面陽一

<併任, 難治疾患研究所 分子薬理学 准教授>

硬組織疾患におけるゲノム解析に対応する分子病態生理学として形態学、分子生物学の観点から細胞増殖・細胞接着関連分子機能や、硬組織細胞の増殖・分化制御、骨浸潤・骨転移の病態生理の解明を目指す。また最も罹病率の高い硬組織疾患のうち骨粗鬆症について、その基盤となる骨量調節機構に関わる遺伝的な素因を探求しながら、そこで働く分子機構を明らかにしてゆくことで、有効な治療・予防法の開発に役立つ成果を目指している。

硬組織疾患ゲノム構造解析部門



教授 稲澤譲治

<併任, 難治疾患研究所 分子細胞遺伝 教授>



特任准教授 小崎健一



准教授 井本逸勢

<併任, 難治疾患研究所 分子細胞遺伝 准教授>

ゲノム情報を基盤に疾患の新しい診断、治療、予防法の開発、ならびに基礎研究で得られた成果を臨床医学に展開する「トランスレーションリサーチ」に期待が寄せられている。当部門では、独自に開発した**MCG (Molecular Cytogenetics)**の略)アレイを用いて、口腔癌を対象としたゲノム一次構造異常やエピゲノム遺伝子制御機構、体系的遺伝子発現解析など統合的ゲノム解析を推進し、口腔癌の原因遺伝子探索と病態の解明、さらに、悪性度診断(個性診断)のバイオマーカーや治療の新規分子標的の単離・同定とそれらの分子メカニズムを明らかにすることによって、口腔癌の新たな診断法、治療法、予防法を開発し、テーラーメイド医療の実現に資する成果を目指している。また、顎顔面の形成異常などを伴う遺伝疾患を対象に、疾患遺伝子の探索や治療法開発に向けた病態解明研究を実施している。

硬組織疾患ゲノム機能解析部門



教授 三木義男

<併任, 難治疾患研究所 分子遺伝 教授>

口腔がんおよび骨軟部腫瘍を対象にゲノム科学を応用することによって発がん機構の解明をめざす。特にトランスクリプトーム情報を基盤に生命現象としてのがんの解明と同時に、その過程で得られる情報をがん治療に応用し、オーダーメイド医療の実現を目指した研究を展開する。具体的にはがんの抗がん剤感受性診断やリンパ節易転移性診断、良性悪性診断のための新規システムを構築し臨床応用を目指している。

骨軟部疾患・病理情報解析部門



研究教授 石田 剛
<併任, 国立精神・神経センター国府台病院 臨床検査部>

骨軟部腫瘍は種類が多いうえに発生頻度が低く、また、分類も複雑である。さらに骨腫瘍の病理診断には、画像所見との対比が必須であるため、病理医には特に専門的知識と豊富な経験が要求される場所である。

骨軟部腫瘍において、遺伝子解析などの研究を展開するにあたり、あつまっている腫瘍の病理診断に誤りがないことが大前提となるが、病理情報解析部門では、研究対象の腫瘍の正確な病理診断を保証し、遺伝子解析研究を基礎から支援する役割を担っている。また、形態学的アプローチを通じて研究の側面支援も本部門の重要な役割である。

口腔領域疾患・病理情報解析部門



研究教授 津田 均
<併任, 国立がんセンター中央病院 臨床検査部 病理検査室>

形態学的なアプローチにより硬組織腫瘍の研究を進めている。ヘマトキシリン・エオジ (HE)染色の検鏡や免疫組織化学法による分子変化の同定を行い、定量RT-PCR法やウエスタンブロット法によるmRNAや蛋白質のデータと比較している。またFISH法やPCR-LOH法

により腫瘍におけるゲノムレベルの異常を同定し、肺癌や卵巣癌の診断マーカーや治療標的分子を見出した。腫瘍の骨転移巣や口腔癌でも同様のアプローチによる検討を行っている。

先端診断法開発部門



教授 小村 健
<併任, 口腔機能再構築学系 口腔機能再建学講座 顎口腔外科学分野 教授>

口腔癌に対する治療において根治性を確保するために、癌病巣そのものの摘除とともに、一定の安全域を設けた切除、転移の可能性のある頸部リンパ節の予防郭清が行われ、これに放射線・化学療法を組み合わせた治療が行われてきた。しかし、これまでの診断技術を駆使しても、潜在性リンパ節転移や生命予後を完全に予測することは難しく、治療後のQOL確保を目途とする低侵襲治療やオーダーメイド治療の実現のためには、より正確な予測を可能にする診断技術が必要とされている。

そこで当部門としては、口腔癌および口腔前癌病変を対象とし、豊富な臨床データをもとに基礎と臨床のトランスレーショナルリサーチを推進し、エビデンスに基づいた予防・診断・治療の実現を目標としている。現在、臨床における病変組織のサンプリングおよびデータベース化をすすめ、同組織サンプルや培養細胞株を用いた遺伝子解析を行っている。その中には、マイクロアレイを用いた新たな口腔前癌病変診断法の検討、網羅的解析により抽出した遺伝子の機能解析、癌検出のためのバイオマーカー開発やリンパ節転移予測マーカーの検討が含まれる。これらバイオマーカーを用いて、含嗽液による口腔癌・前癌病変の早期発見に関する研究をすすめ、将来の大規模で簡便な口腔癌検診の実現を目指している。また、口腔癌におけるセンチネルリンパ節概念の成立を検証し、正確な診断に基づいた手術療法における**minimal invasive surgery**を実践している。さらに口腔癌における顎骨浸潤に関しては、動物モデルを確立し分子生物学的解析をすすめている。また、硬組織疾患ゲノムセンター内のそれぞれの研究部門との密な協力体制のもと、様々な視点から口腔癌に関する解析をすすめており、今後、これらを統合した分子生物学的個人情報に基づいたオーダーメイド治療、低侵襲外科治療の実現を目指して行く予定である。



特任講師 伊東大典

先端治療法開発部門



教授 四宮謙一
<併任, 先端医療開発学系
先端外科治療学
整形外科学 教授>



助教 阿江啓介
<併任, 先端医療開発学系
先端外科治療学
整形外科学 助教>

整形外科領域の腫瘍、骨軟部腫瘍の診断、治療の研究を行っている。骨軟部腫瘍の発生頻度は他の癌種と比べ低い但其分類は多岐にわたり、多彩な組織像を呈するため病理診断にも難渋することが多い。治療に対する応答性もさまざまであるため、治療効果の統計学的判定や予測も困難である。このような腫瘍を研究するためには多数の症例を集積する必要がある。そこで我々はまず多施設共同の骨軟部腫瘍バンクを設立して腫瘍の新鮮凍結標本の集積を行っている。これらの

標本と付随する臨床情報をもとに、マイクロアレイ技術をもちいて個々の腫瘍の分化の方向性、増殖、侵潤、転移などの悪性形質、薬剤、放射線応答性などを規定する遺伝子群を抽出し、これをもちいて多彩な形態、生物学的態度を有する骨軟部腫瘍のオーダーメイド治療を行うことを目指している。一方、手術療法ではバリアーの概念を用いた広範切除手術により局所制御に関しては満足すべき成績が得られてきた。そこで我々は患肢機能をいかに温存し回復させるかに主眼を置いて研究を進めている。すなわち、患肢機能を温存するために切除縁を縮小しつつ、局所制御率を下げることにない手術法の開発である。さらに手術により欠損した骨軟部組織を恒久的、機能的再建法の開発を目指して研究を行っている。

未来医療展開部門



教授 森山啓司
<併任, 顎顔面顎部機能再建学系
顎顔面機能修復学
顎顔面矯正学分野 教授>

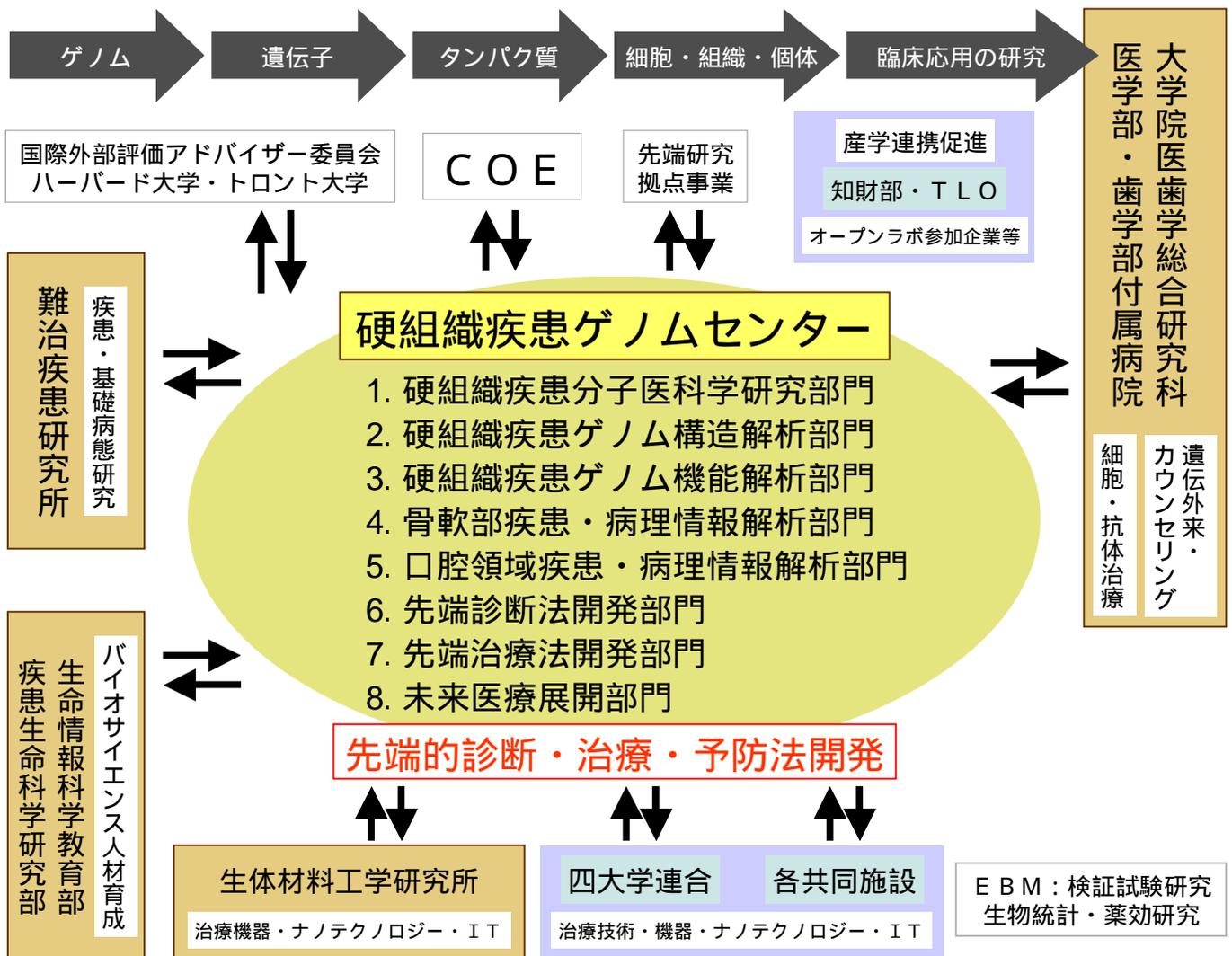
未来医療展開部門(顎顔面矯正学分野)では、顎顔面矯正治療が対象とする疾患に即したグループ分けが行われており、各グループにおいて、その疾患の原因の解明、検査診断や治療法の改良を目的とした研究が行われている。その内容は、口腔顎顔面頭蓋における先天

異常のメカニズムの解明ならびに、上顎骨ならびに歯槽骨骨延長治療法の開発、高圧酸素治療の適用効果など基礎研究から臨床研究にわたっている。さらに、顎顔面口腔機能の中枢性評価を行うために機能的磁気共鳴画像法(functional MRI)を用いた研究も行っている。下記が硬組織疾患にかかわる研究として、当分野で行っている研究である。 頭蓋骨縫合早期癒合症の病態成立機構解明と治療法開発への基礎的研究: **FGFR2**の機能獲得型突然変異によって引き起こされる**Apert**症候群のモデルマウスを作製、解析を行い、このモデル動物に対する可溶性**FGFR2**の有効性を*in vivo*にて検討している。また、**Saethre-Chotzen** 症候群の責任遺伝子**TWIST1**に関しても、発現制御機構、上皮間葉移行における役割に関する研究を行っている。 マルフアン症候群の歯周疾患における著しい歯槽骨吸収の機構解明: マルフアン症候群は、重篤な歯周疾患が多発するが、その発症機構は不明である。そこで責任遺伝子で弾性線維構成タンパクをコードする**fibrillin-1**の遺伝子改変マウスを用いて、歯周病原菌**P.gingivalis**を播種し、著しい歯槽骨吸収をみるモデル動物を作製し、このモデル系により重篤化のメカニズム解明を行っている。 鎖骨頭蓋異形成症にみられる過剰歯や家族性多数歯欠損にみられる欠損部位の**genotype-phenotype correlation**: 鎖骨頭蓋異形成症や家族性多数歯欠損の家系から、**X線**、歯の石膏模型を採得、さらに、ゲノム**DNA**を抽出し変異解析を行うことで、鎖骨頭蓋異形成症にみられる過剰歯や家族性多数歯欠損にみられる欠損部位の**genotype-phenotype correlation**を明らかにしている。 上顎骨ならびに歯槽骨延長術の治療法の改良ならびに、術後の高圧酸素治療の適用効果の検討や、超音波画像診断の応用: 延長術の装置の改良、適切な活性化および保定期間について検討すると共に、仮骨の促進が期待される高気圧酸素療法の至適化を図っている。さらに、術後の硬組織変化を検討するため**X線被爆**がない超音波画像診断を行っている。

硬組織疾患ゲノムセンターの組織構成

1. 硬組織疾患分子医科学研究部門: 教授 野田政樹(併任; センター長)、准教授 江面陽一(併任)
2. 硬組織疾患ゲノム構造解析部門: 教授 稲澤讓治(併任)、准教授 井本逸勢(併任)、特任准教授 小崎健一
3. 硬組織疾患ゲノム機能解析部門: 教授 三木義男(併任)
4. 骨軟部疾患・病情報解析部門: 研究教授 石田 剛(併任)
5. 口腔領域疾患・病情報解析部門: 研究教授 津田 均(併任)
6. 先端診断法開発部門: 教授 小村 健(併任)、特任講師 伊東大典
7. 先端治療法開発部門: 教授 四宮謙一(併任)、助教 阿江啓介(併任)
8. 未来医療展開部門: 教授 森山啓司(併任)

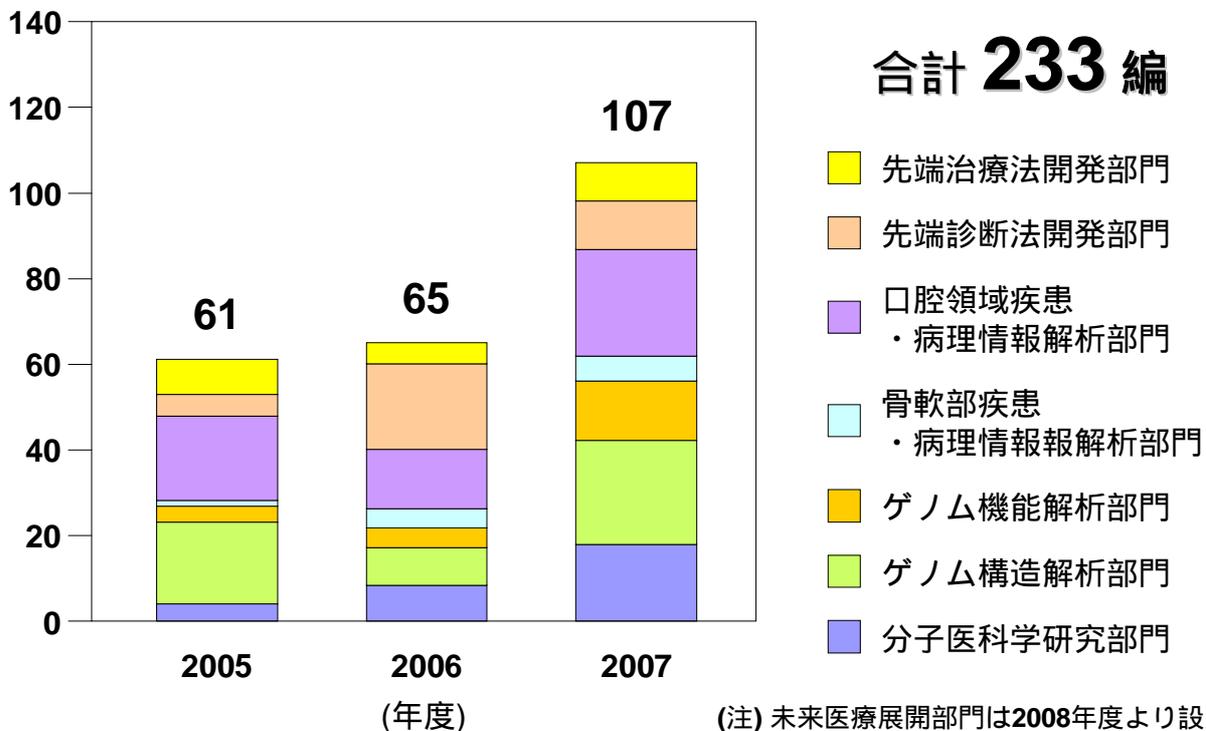
硬組織疾患研究プロジェクトの概念図



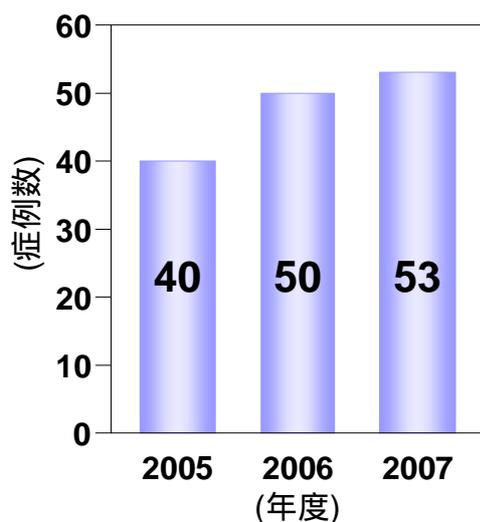
硬組織疾患ゲノムセンターの実績 (2005年度 ~ 2007年度)

(編)

国際誌英文原著発表論文数

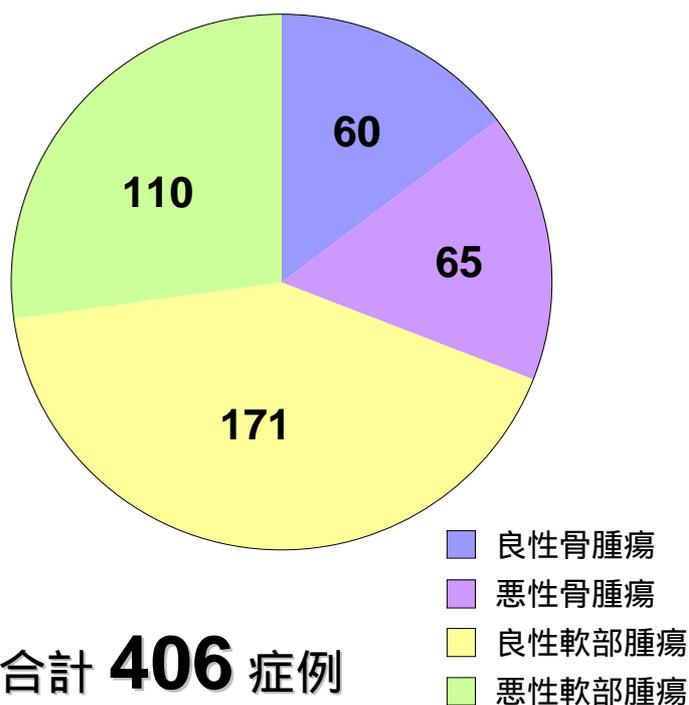


収集・保存された口腔扁平上皮癌症例数



合計 **143** 症例

収集・保存された骨軟部腫瘍症例数



合計 **406** 症例